



C (15) Patentti myönnetty
Pat. 601/1992 A 03 02 1993

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 07H 17/04

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	883596
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	01.08.88
(24) Alkuperäinen - Löpdrag	01.08.88
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	05.02.89
(44) Nähtävöksiäpanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	13.11.92
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
04.08.87 US 081493 P	27.05.88 US 199731 P

(71) Hakija - Sökande

1. Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, N.Y. 10154, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Saulnier, Mark G., 1225 Randolph Road, Middletown, Conn. 06104, USA, (US)
2. Senter, Peter D., 211 Summit Avenue East, Apt. 421, Seattle, Wash. 98102, USA, (US)
3. Kadow, John F., 66-201 Meetinghouse Village, Meriden, Conn. 06450, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

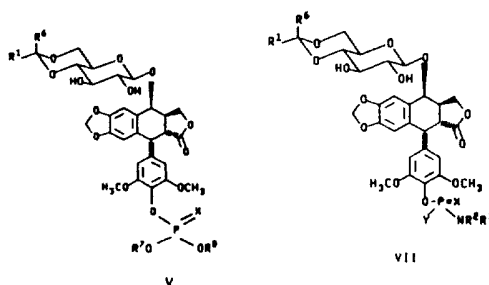
(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kasvainten vastaisten epipodofyllotoksiiniglukosidi-4'-fosfaattijohdannaisten valmistamiseksi
Förfarande för framställning av epipodofyllotoxinglukosid-4'-fosfatderivat med antitumör effekt

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

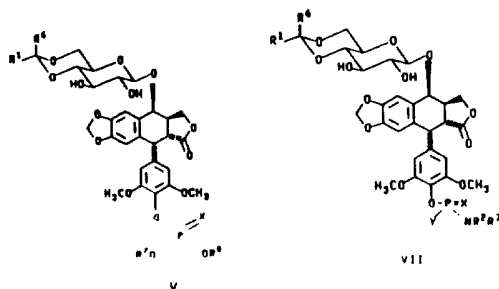
Keksintö koskee menetelmää kasvaimen vastaisten 4'-demetyyliepi-podofyllotoksiiniglukosidien fosfaattijohdannaisten valmistamiseksi, joilla on kaava (V) tai (VII) :



joissa R^6 on vety ja R^1 on alkyyli, alkenyyli, sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, C_6-10 -aryyli, C_7-14 -aralkyyli tai C_8-14 -aralkenyyli, joissa aromaattiset renkaat voivat olla halogeeni-, alkyyli-, alkoksi-, hydroksi-, nitro- ja/tai aminosubstituoituja, tai R^1 ja R^6 merkitsevät kumpikin alkyyliä tai muodostavat yhdessä niiden välillä olevan hiiliatomin kanssa sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki; ja R^7 ja R^8 merkitsevät vetyä, aralkyyli-, alkyyliryhmiä tai alkyylialkyyli-ryhmää tai mahdollisesti hydroksilla, alkoksilla, alkanoyylioksilla, syaanilla, aminolla, alkyyliaminolla, dialkyyliaminolla, karboksilla, alkyylitiolla, merkaptolla, merkaptotiolla, nitropyridyylidisulfidilla, alkanoyyliaminolla, alkanoyylillä, karbamoyylillä, nitrolla ja/tai halogeenilla substituoitua alkyyli-, sykloalkyyli-, aryyli- tai aralkyyli-ryhmää, sekä uuden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi. Lisäksi keksintö koskee vastaavia, väliaineina käyttökelpoisia fosforodiklorideja.

87790

Uppfinningen avser ett förfarande för framställningen av tumör-hämmande fosfatderivat av 4'-demetylepipodofyllotoxinglukosider med formeln (V) eller (VII) :



vari R^6 är väte och R^1 är alkyl, alkenyl, cykloalkyl, 2-furyl, 2-tienyl, C_{6-10} -aryl, C_{7-14} -aralkyl eller C_{8-14} -aralkenyl, vari de aromatiska ringarna kan vara substituerade med halogen, alkyl, alkoxi, hydroxi, nitro och/eller amino, eller R^1 och R^6 betecknar vardera alkyl eller de bildar en cykloalkylgrupp med kolatomen mellan dem; X är syre eller svavel; och R^7 och R^8 betecknar väte eller en aralkyl-, alkylaryl- eller alkylaralkylgrupp eller eventuellt med hydroxi, alkoxi, alkanoyloxi, cyan, amino, alkylamino, dialkylamino, karboxi, alkyltiom merkaptotio, nitropyridyldisulfid, alkanoylamino, alkanoyl, karbamoyl, nitro och/eller halogen substituerad alkyl, cykloalkyl, aryl eller aralkyl, samt av farmaceutiskt godtagbara salt därav. Uppfinningen avser även motsvarande fosforodiklorider, användbara som mellanprodukter.

Menetelmä kasvainten vastaisten epipodofyllotoksiiniglukosidi-4'-fosfaattijohdannaisten valmistamiseksi

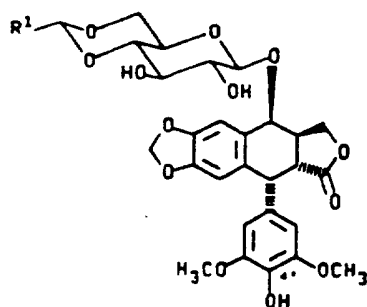
Tämä keksintö koskee kasvainten vastaisten epipodofyllotoksiiniglukosidien 4'-fosfaattijohdannaisten valmistusta ja niiden valmistuksessa käyttökelpoisia välituotteita.

Etoposidi (VP-16, I) ja teniposidi (VM-26, II) ovat kliinisesti käyttökelpoisia syövän vastaisia aineita, jotka ovat luonnossa esiintyvän lignaanin, podofyllotoksiini (III):n johdannaisia; yhdisteiden luokasta, joihin sisältyvät etoposidi ja teniposidi, on joskus käytetty nimitystä 4'-demetyyliepipodofyllotoksiiniglukosidit. Etoposidi ja teniposidi ovat aktiivisia aineita hoidettaessa erilaisia syöpiä, mukaan lukien kives-, piensolukeuhko-, munasarja-, rinta-, kilpirauhas-, rakko- ja aivosyöpää, ei-lymfosyyttistä leukemiaa ja Hodgkin'in tautia.

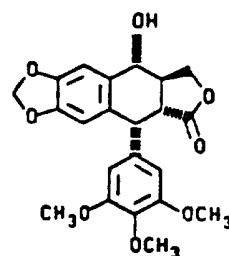
Yhdisteitä (I) ja (II) ja menetelmä niiden valmistamiseksi on kuvattu US-patentissa 3 408 441, Wartburg et al., ja US-patentissa 3 524 844, Keller-Juslen et al. Niissä kuvattuja yhdisteitä, erityisesti etoposidia ja teniposidia, käytetään lähtöaineina keksinnön mukaisten epipodofyllotoksiiniglukosidi-4'-fosfaattijohdannaisten valmistamiseksi.

25

30



(I) $R^1 = \text{CH}_3$
 (II) $R^1 = 2\text{-tienyyli}$



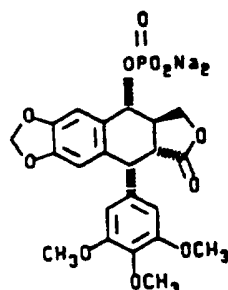
(III)

35

Hydroksyyliiryhmän sisältävien terapeuttisten aineiden fosforylointia on käytetty keinona lääkkeen tekemiseksi.

si latentiksi; fosforyloidut johdannaiset voidaan sitten lohkaista in vivo fosfataasin avulla aktiivisen kantamolekyylin vapauttamiseksi. Lyhyt esitys fosfaateista mahdollisina esilääkkeinä sisältyy yleiskatsausartikkeliin, jonka otsikkona on "Rational for Design of Biologically Reversible Drug Derivatives: Prodrugs" (Sinkula and Yalkowsky, J. Pharm. Sci., 1975, 64:181-210, 189-191). Esimerkkejä fosfaateista, jotka ovat tunnettuja kasvainten vastaisia aineita, ovat kamptosiini (Japan Kokai 21-95, 394 ja 21-95, 393, Derwent Abst. Nro 87-281016 ja 87-281015, vastaavasti) ja daurorubisiini (US-patentti 4 185 111).

Podofyllotoksiinifosfaatti-dinatriumsuolaa (IV) valmistivat Seligman et al. Kuitenkaan fosfaatti ei hydrolysoitunut eturauhashappo-fosfataasin vaikutuksesta eikä sen toksisuus osoittautunut alhaisemmaksi kuin kanta-podofyllotoksiinin (Cancer Chemotherapy Reports Part I, 1975, 59:233-242).



(IV)

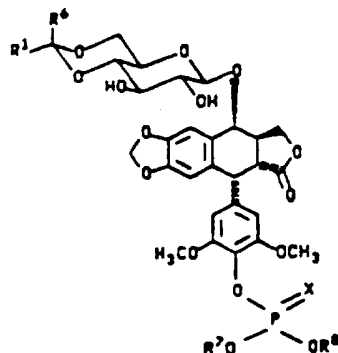
Tämä keksintö antaa käyttöön 4'-demetyyliepipodofyllotoksiiniglukosidien fosfaattiestereitä, jotka ovat aktiivisia kasvainten vastaisia aineita. Erityisesti 4'-demetyyliepipodofyllotoksiiniglukosidien divetyfosfaatti ja sen suolat ovat hyvin vesiliukoisia merkiten ylivoimaista farmaseuttista etua nykyisiin tämän luokan terapeuttisiin aineisiin, etoposidiin ja teniposidiin verrattuna, joiden vesiliukoisuus on minimaalinen.

Keksinnön kohteena on menetelmä kaavan (V) mukaisen, kasvainten vastaisten epipodofyllotoksiiniglykosidi-

4'-fosfaattijohdannaisten ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi

5

10



(V)

15

20

25

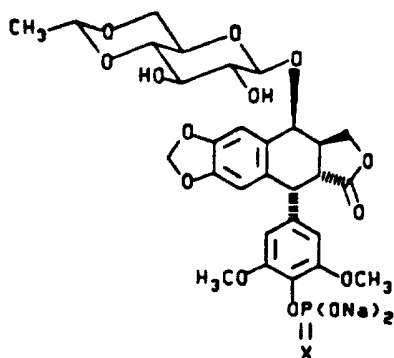
30

jossa R^6 on H ja R^1 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (C_{1-10}) -alkyyli, (C_{2-10}) -alkenyyl, (C_{5-6}) -sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, (C_{6-10}) -aryyli, (C_{7-14}) -aralkyyli ja (C_{8-14}) -aralkenyyl, jolloin jokainen aromaattisista renkaista voi olla substituoimaton tai niissä voi olla substituenttina yksi tai useampia ryhmiä sarjasta halogeeni, (C_{1-8}) -alkyyli, (C_{1-8}) -alkoksi, hydroksi, nitro ja amino; tai R^1 ja R^6 ovat kumpikin (C_{1-8}) -alkyyli; tai R^1 ja R^6 ja hiiliatomi, johon ne ovat sitoutuneet, muodostavat (C_{5-6}) -sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki; R^7 ja R^8 on itsenäisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat H, (C_{1-5}) -alkyyli, A-substituoitu (C_{1-5}) -alkyyli, (C_{3-6}) -sykloalkyyli, A-substituoitu (C_{3-6}) -sykloalkyyli, (C_{6-10}) -aryyli, A-substituoitu aryyli, alkyyli-substituoitu aryyli, (C_{7-14}) -aralkyyli, A-substituoitu aralkyyli ja alkyyli-substituoitu aralkyyli, jolloin mainittuina A-substituentteina on yksi tai useampia ryhmiä sarjasta hydroksi, alkoksi, alkanoyylioksi, syaano, amino, alkyyliamino, dialkyyliamino, karboksi, alkyyliitio, merkaptio, merkaptotio, nitropyridyylidisulfidi, alkanoyyliamino, alkanoyyli, karbamoyyli, nitro ja halogeeni.

35

Yhdisteen (V) suoloja ovat sekä monoanioni- että dianionisuolat. Kationi voi olla metalli-ioni, kuten alkalimetalli- tai maa-alkalimetalli-ioni, tai muu tavallinen

metalli-ioni tai orgaaninen typpipitoinen ryhmä, kuten ammonium, mono-, di- tai trialkyyliammonium tai pyridinium. Kationi on ensisijaisesti natrium, kalium, litium, cesium, magnesium, kalsium, aluminium, ammonium tai mono-, di- tai trialkyyliammonium. Ensisijaisena kohteena ovat kaavan (V) mukaiset yhdisteet, joissa R^7 ja R^8 ovat kumpikin H, ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävät suolat. Ensisijaisimpana kohteena ovat etoposidi-4'-divetyfosfaatti ja -tiofosfaatti ja niiden vastaavat dinatrium-

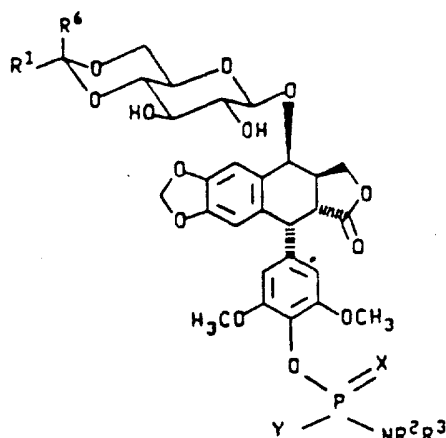


(VI)

a: X = O
b: X = S

Ensisijaisena kohteena ovat edelleen kaavan (V) mukaiset yhdisteet, joissa R^7 ja R^8 ovat samoja ja ne on valittu ryhmästä, jonka muodostavat 2,2,2-trihalogeenietyyli, 2-syaanoetyyli, (C_{1-5}) -alkyyli, fenyyli ja fenyylialkyyli, jolloin fenyyliarenkaassa on mahdollisesti substituenttina alkyyli, halogeeni tai nitro.

Keksinnön kohteena on myös menetelmä kaavan (VII) mukaisten, kasvainten vastaisten fosforoamidaattijohdannaisien ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi,



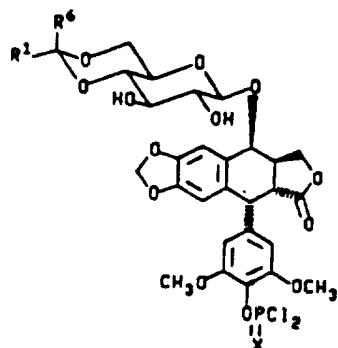
(VII)

10

jossa R^6 on H ja R^1 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (C_{1-10}) -alkyyli, (C_{2-10}) -alkenylyli, (C_{5-6}) -sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, (C_{6-10}) -aryyli, (C_{7-14}) -aralkyyli ja (C_{8-14}) -aralkenylyli, jolloin jokainen aromaattisista renkaista voi olla substituimaton tai niissä voi olla substituenttina yksi tai useampia ryhmiä sarjasta halogeeni, (C_{1-8}) -alkyyli, (C_{1-8}) -alkoksi, hydroksi, nitro ja amino; tai R^1 ja R^6 ovat kumpikin (C_{1-8}) -alkyyli; tai R^1 ja R^6 ja hiiliatomi, johon ne ovat sitoutuneet, muodostavat (C_{5-6}) -sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki; Y on Cl, OH tai NR^4R^5 ; R^2 , R^3 , R^4 ja R^5 on kukin itsenäisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat H, (C_{1-5}) -alkyyli, (C_{2-5}) -alkenylyli, (C_{3-6}) -sykloalkyyli, A-substituoitu (C_{1-5}) -alkyyli, A-substituoitu (C_{2-5}) -alkenylyli, A-substituoitu (C_{3-6}) -sykloalkyyli; tai R^2 , R^3 ja typpi, johon ne ovat sitoutuneet, merkitsevät yhdessä 3-6 jäsenistä rengasta; tai R^4 , R^5 ja typpi, johon ne ovat sitoutuneet, merkitsevät yhdessä 3-6-jäsenistä rengasta; jolloin mainittuina A-substituentteina on yksi tai useampia ryhmiä sarjasta hydroksi, alkoksi, alkanoyylioksi, syaano, amino, alkyylimino, dialkyylimino, karboksi, alkyylitio, merkaptio, merkaptotio, nitropyridyylidisulfidi, alkanoyylimino, alkanoyyli, karbamoyyli, nitro ja halogeeni.

Keksinnön kohteena ovat lisäksi kaavan (VIII) mukaiset dikloorifosfaattiväliaineet, joissa R^1 , R^6 ja X

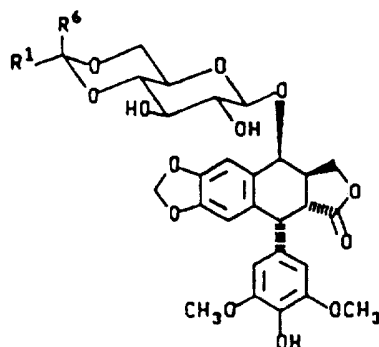
ovat edellä määriteltyjä; nämä aineet ovat käyttökelpoisia valmistettaessa kaavan V mukaisia yhdisteitä.



(VIII)

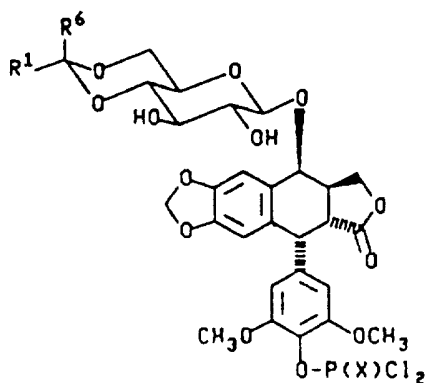
Kaavan (V) mukaisia yhdisteitä valmistetaan keksinnön mukaisesti siten, että

(I) (a) yhdisteen, jonka kaava (1) on



(1)

jossa R¹ ja R⁶ ovat edellä määriteltyjä, annetaan reagoida yhdisteen kanssa, jonka kaava on P(X)Cl₃, jossa X on edellä määritelty, ja vetyakseptorin läsnäollessa, jolloin muodostuu kaavan (2) mukainen väliyhdiste;

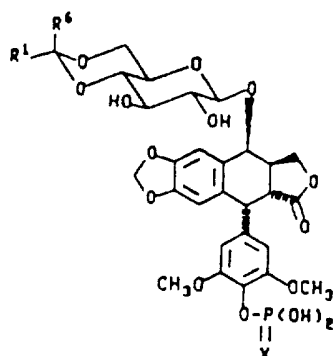


(2)

ja

(b) hydrolysoidaan kaavan (2) mukainen yhdiste mahdollisesti emäksen läsnä ollessa, jolloin muodostuu kaavan (3) mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola;

10



(3)

15

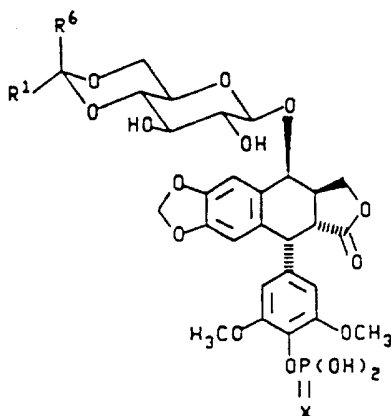
tai

(c) kaavan (2) mukaisen yhdisteen annetaan reagoida ainakin yhden ekvivalentin kanssa sekä R⁷OH:ta että R⁸OH:ta, jossa R⁷ ja R⁸ merkitsevät samaa kuin edellä, edellyttäen, että R⁷ ja R⁸ eivät molemmat ole H, ja vetyakseptorin läsnä ollessa; ja kun toinen R⁷:stä tai R⁸:sta on H, yhdiste muutetaan mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi käsittelemällä emäksellä, tai

20

(II) yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on

25

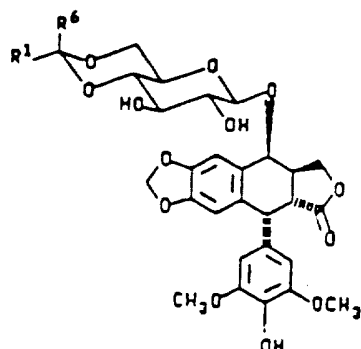


30

jossa R¹, R⁶ ja X ovat edellä määritellyjä, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi

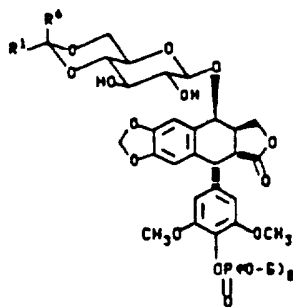
35

(a) muutetaan kaavan (IX) mukainen yhdiste



(IX)

yhdisteeksi, jonka kaava (X) on



(X)

jossa R¹, R⁶ ja X ovat edellä määritellyjä, ja G on fosfaattisuojarahmā;

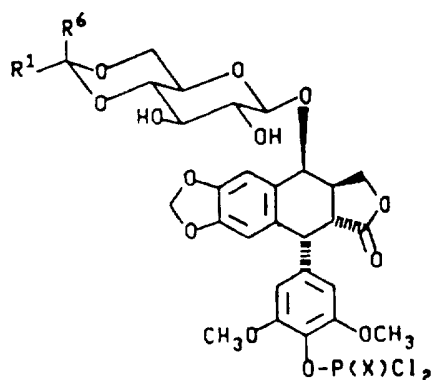
(b) poistetaan fosfaattisuojarahmā; ja

(c) vaiheen (b) tuote muutetaan mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

Fosfaattisuojarahmia ovat, näihin kuitenkin rajoittumatta, R⁷:n määritelmän yhteydessä edellä mainitut ryhmät, H:ta lukuunottamatta.

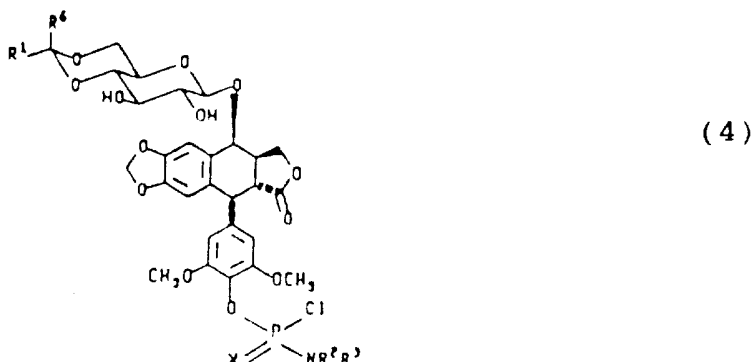
Kaavan (VII) mukaisia yhdisteitä valmistetaan keksinnön mukaisesti siten, että

(a) kaavan (2) mukaisen väliyhdisteen



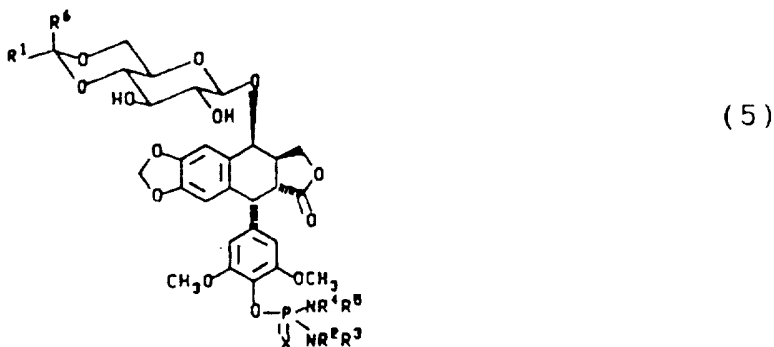
(2)

annetaan reagoida amiinin kanssa, jonka kaava on HNR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat edellä määriteltäjiä, tai sen happoadditiosuolan kanssa, jolloin muodostuu kaavan (4) mukainen yhdiste;



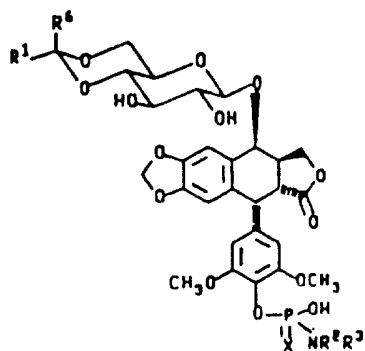
ja

(b) kaavan (4) mukaisen yhdisteen annetaan mahdollisesti reagoida toisen amiinin kanssa, jonka kaava on HNR^4R^5 , jossa R^4 ja R^5 ovat edellä määriteltäjiä, tai sen happoadditiosuolan kanssa, jolloin muodostuu kaavan (5) mukainen yhdiste;



tai

(c) hydrolysoidaan kaavan (4) mukainen yhdiste mahdollisesti emäksen läsnä ollessa, jolloin muodostuu kaavan (6) mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.



(6)

Tässä käytettynä, ellei toisin ole erityisesti mainittu, termi "alkyyli" merkitsee suorasivuketjuisia tai haaroittuneita hiiliketjuja; "halogeeni" on bromi, kloori, fluori ja jodi; "etopofos" on yhdiste etoposidi-4'-fosfaattidinaatriumsuola (s.o. yhdiste VIa).

4-demetyyliepipodofyllotoksiiniglukosidien fenoli-ryhmä voi olla fosforyloitu fosforioksikloridilla ja tiofosforyylikloridilla, jolloin saadaan vastaavaa dikloorifosfaattia ja vastaavasti diklooritiofosfaattia (kaava VIII). Fosforylointireaktio suoritetaan sopivassa vedettömässä orgaanisessa liuottimessa, esimerkiksi asetonitrilissä ja ensisijaisesti tertiäärisen amiini-emäksen, esimerkiksi N,N-di-isopropyylietyyliamiinin läsnäollessa. Reaktion kulkua voidaan valvoa ohkokromatografian avulla (TLC), jolloin optimireaktioaika voidaan päätellä tuotteen ilmaantumisen tai lähtöaineen katoamisen tai kummankin perusteella. Reaktioaika voi olla noin 4 tuntia - noin 72 tuntia. Tarvittavan reaktioajan pituus näyttää riippuvan käytetyn fosfori-reagenssin laadusta.

Kaavan VIII mukaiset 4'-dikloorifosfaatit ovat monikäyttöisiä väliyhdisteitä, jotka voivat myöhemmin reagoida nukleofiilisten aineiden kanssa, jolloin saadaan erilaisia fosfaatti- ja tiofosfaattijohdannaisia. Täten välituotteet voidaan hydrolysoida, jolloin saadaan fosfaatteja, ja emäksenläsnä ollessa saadaan fosfaattisuoloja. Esimerkiksi, yhdisteestä VIII käsittelemällä ylimäärin käytetyn natriumvetykarbonaatin vesiliuoksen kanssa saa-

daan vastaavia 4'-fosfaattidinaatrium- ja 4'-tiofosfaattidinaatriumsuoloja, myöskin muiden kationien, kuten kaliumin ja ammoniumin vetykarbonaatteja voidaan käyttää kyseisten suolojen saamiseksi. Dikloorifosfaattiväliyhdisteen VIII

5 voidaan antaa reagoida amiinien kanssa, jolloin saadaan joko vastaavaa fosforodiamidaattia tai kloorifosforomonoamidaattia. Esimerkkejä sopivista amiineista ovat, näihin

10 kuitenkin rajoittumatta, ammoniakin, primääriset amiinit kuten etyyliamiini, kloorietyyliamiini, allyyliamiini, dimetyyliaminopropyyliamiini, hydroksietyyliamiini, sykloheksyyliamiini ja aminosykloheksanoli ja sekundääriset

15 amiinit, kuten dietyyliamiini, piperidiini, etyyli-metyyliamiini, metyyliaminoetanoli, etyylibutyliamiini, ja näiden kaltaiset amiinit. Käytettävän amiinin määrää epipodofyllotoksiinidikloorifosfaatin määrään nähden voidaan

20 säädellä jomman kumman reaktiotuotteen suosimiseksi. Esimerkiksi käytettäessä suurta ylimäärää amiinia suhteessa epipodofyllotoksiinin määrään, saadaan symmetristä fosforodiamidaattia, s.o. kaavan VII mukaisia yhdisteitä, joissa Y on sama kuin NR^2R^3 ; kloorifosforomonoamidaattia, s.o.

25 kaavan VII mukaisia yhdisteitä, joissa Y on kloori, voidaan valmistaa käytettäessä kontrolloidumpaa määrää amiinia. Kloorifosforomonoamidaatti voidaan hydrolysoida, jolloin saadaan kaavan VII mukaisia yhdisteitä, joissa Y on

OH, tai sen suoloja, tai sen voidaan antaa reagoida edelleen toisen amiinin kanssa, jolloin saadaan epäsymmetristä fosforodiamidaattia, s.o. kaavan VII mukaisia yhdisteitä, joissa Y on NR^4R^5 ja on erilainen kuin NR^2R^3 .

Edellä selostettu menetelmä on kuvattu seuraavassa reaktiokaaviossa.

5

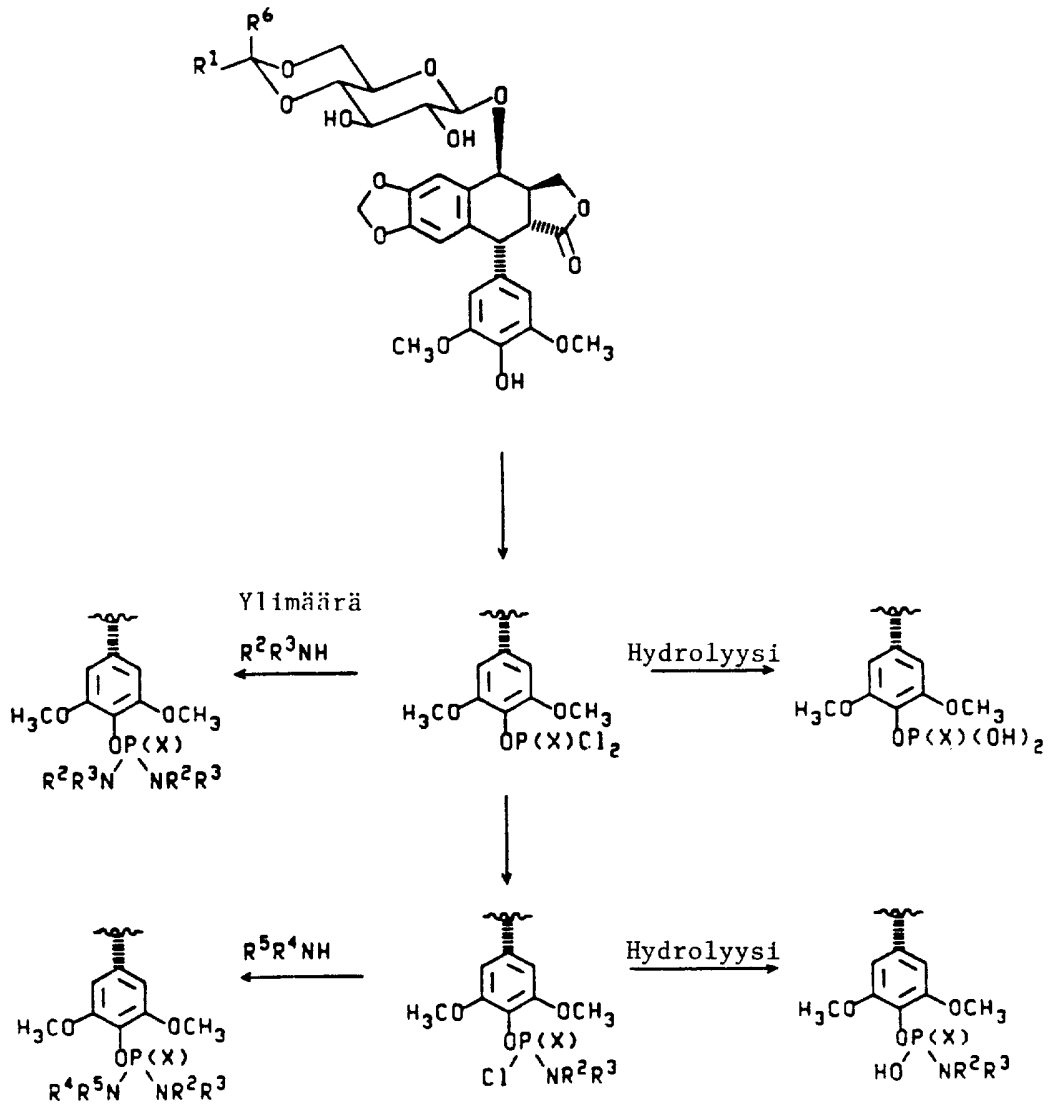
10

15

20

25

30



Fosfaattitriesterit ovat kaavan V mukaisia yhdisteitä, joissa R^7 ja R^8 eivät ole H ja niitä voidaan valmistaa käsittelemällä 4'-demetyyliepipodofyllotoksiiniglukosidia halogeenifosfaattidiesterin [esim.

- 5 Hal-P(X)(OR⁷)(OR⁸)] kanssa. On keksitty, että tämä reaktio on suoritettavissa tehokkaimmin asetonitriilissä orgaanisen trialkyyliamiiniemäksen läsnä ollessa; ensisijainen emäs on di-isopropyylietyyliamiini. Halogeenifosfaattia ja amiiniemästä käytetään ainakin yksi ekvivalentti, mutta
- 10 molempia reagensseja käytetään ensisijaisesti mooliekvivalentteina hieman ylimäärin epipodofyllotoksiiniglukosidireagenssiin nähden. Reaktio voidaan suorittaa missä tahansa tuotteen muodostumiseen johtavassa lämpötilassa; kuitenkin lievästi kohotetut lämpötilat, esim. 30-40 °C, näyttävät helpottavan reaktiota, joka voi kestää useita päiviä
- 15 tapahtuakseen loppuun. Symmetrisiä halogeenifosfaattidiestereitä (s.o. $R^7=R^8$) voidaan valmistaa tarkoituksenmukaisesti alkoholista ja esim. fosforyylikloridista ja epäsymmetrisiä sellaisia (esim. $R^7=R^8$) voidaan valmistaa alkoholista ja dihalogeenifosfaattiesteristä. Fosfaattitriestereitä on mahdollista valmistaa myös muita teitä, esimerkiksi muuttamalla ensin fenoli fosfiittiesteriksi, esim.
- 20 antamalla reaktion tapahtua sellaisen reagenssin kuten $(PhCH_2O)_2PN(i-pr)_2$:n kanssa ja hapettamalla sen jälkeen fosfaatti fosfaattiesteriksi käyttämällä esim. m-kloori-perbentsoehappoa.
- 25

- Fosfaattitriesterit voivat lisäksi toimia väliyhdisteinä valmistettaessa kaavan V mukaisia yhdisteitä ja niiden suoloja. Täten, esimerkiksi, dihydroksifosfaattia
- 30 (V, $R^7=R^8=H$) saadaan suorittamalla difenyyliesterin (V, $R^7=R^8=$ fenyyli) katalyyttinen hydraus. Muita sopivia fosfaattisuojarahmiä ovat, näihin kuitenkin rajoittumatta, 2,2,2-trikloorietyyli, bentsyyli, syaanoetyyli, p-nitrosubstituoitu fenyyli, bentsyyli, fenetyyli ja p-bromifenyyli. Dihydroksifosfaatti (V, $R^7=R^8=H$) muutetaan emässuo-
- 35

loiksi antamalla reaktion tapahtua sopivan emäksen, esim. natriumvetykarbonaatin, ammoniumvetykarbonaatin tai orgaanisten amiinien kanssa. Vaihtoehtoisesti, suoloja voidaan myös muodostaa eluoimalla dihydroksifosfaatti kolonnin läpi, jossa on haluttua kationia sisältävää ioninvaihtohartsia.

Vaikkakin tämän keksinnön yhteydessä käytetään fosforylointireagenssina fosforioksikloridia, halogeenifosfaattidiestereitä ja niiden vastaavia rikkianalogeja, on selvää, että voidaan käyttää myös muita fosforireagensseja, jotka pystyvät fosforyloimaan fenoleja, ja sopivat reaktio-olosuhteet ja väliaine voidaan valita valitun fosforylointiaineen mukaisesti. Yleiskatsausartikkeli, jonka otsikkona on "Current Methods of Phosphorylation of Biological Molecules" (Synthesis, 1977, 737-52) sisältää lisäesimerkkejä fosforylointiaineista, ja liitetään tähän viitteenä.

Biologisia ominaisuuksia

Tyypillisten tämän keksinnön yhdisteiden kasvaimen vastainen vaikutus arvioitiin hiiren P388-leukemiasiiroteeseen. Kaikissa kokeissa käytettiin naaras-CDF₁-hiiriä, joihin oli istutettu kasvainistutteenä 10⁶ hiiren P388-leukemian vesivatsasolua. Kokeissa, joissa käytettiin etoposidi-4'-fosfaattia, sen natriumsuolaa ja etoposidi-4'-tiofosfaattidinatiatriumsuolaa, kasvaimen isuttaminen ja lääkekäsittely tapahtuivat molemmat iv-tietä. Kaikissa muissa kokeissa kasvaimen istutus ja lääkekäsittely tapahtuivat ip-tietä. Kaikissa tapauksissa, kuitenkin, positiivinen kontrolli, etoposidi, annettiin ip-tietä. Kokeet kestivät 28-46 päivää, jonka ajan kuluttua laskettiin eloon jääneiden lukumäärä. Kasvaimen vastainen vaikutus on ilmoitettu %:na T/C, joka on lääkkeellä käsitellyn ryhmän keskimääräisen eloonjäämisajan (MST) suhde suolalla käsitellyn kontrolliryhmän MST:hen. Yhdisteellä, jonka T/C-%-arvo on 125 tai suurempi, katsotaan yleensä olevan merkittävä kas-

vaimen vastainen vaikutus P388-kokeessa. Taulukko I esittää tulokset edellä selostetusta arvioinnista; siinä on ilmoitettu suurimmat T/C-%-arvot ja annokset, jotka antavat tuon vaikutuksen

5

Taulukko I

Kasvaimen vastainen vaikutus hiiren
P388-leukemiaan

Annos*

10

<u>Yhdiste</u>	<u>(mg/kg/inj.)</u>	<u>Antotie</u>	<u>MST(d)</u>	<u>T/C-%</u>
----------------	---------------------	----------------	---------------	--------------

Kasvainsolut istutettu laskimonsisäisesti

15

Esimerkki 1	140	IV	29,0	363
(Etoposidi)	50	IP	20,5	256
Esimerkki 4	200	IP	18,0	225
(Etoposidi)	100	IP	21,5	269
Esimerkki 8	125	IV	24,5	306
(Etoposidi)	100	IP	29,5	369

20

Kasvainsolut istutettu vatsaontelonsisäisesti

25

Esimerkki 2	240	IP	16,5	165
(Etoposidi)	60	IP	25,0	250
Esimerkki 3	200	IP	15,5	155
(Etoposidi)	100	IP	27,0	270
Esimerkki 7	240	IP	25,0	Annos* 250
(Etoposidi)	100	IP	26,0	260
Esimerkki 9	150	IP	19,5	217
(Etoposidi)	100	IP	24,0	267

30

* Lääkkeet annettiin päivänä 5 ja 8 ellei toisin ole erikseen mainittu (päivän 1 ollessa kasvaimen istutuspäivä).

35

Tämän keksinnön kasvaimen vastaisten yhdisteiden on osoitettu olevan aktiivisia istutettuja kasvaimia vastaan koe-eläimissä. Erityisesti kaavan VIa ("etopofos") mukaisella yhdisteellä osoittautui olevan merkittävästi suurem-

pi kasvaimen vastainen vaikutus kuin etoposidilla P388-kokeessa. Tämä selektiivinen aine edustaa erittäin vesiliuukoista etoposidin esilääkettä, jolla on vähäisempi kasvaimen vastainen vaikutus in vitro ja joka lohkeaa nopeasti alkaalisen fosfataasin ansiosta, minkä seurauksena etoposidi vapautuu. Vapautuva etoposidi omaa identtisen sytotoksisuuden kantälääkkeen kanssa.

Kasvainterapiassa annetaan tehokas määrä kasvainta ehkäisevää kasvaimen vastaista kaavan V tai VII mukaista yhdistettä kasvaimesta kärsivälle potilaalle. Tähän tarkoitukseen lääkettä voidaan antaa tavanomaisia teitä, mukaan lukien, niihin rajoittumatta, laskimonsisäisesti, lihaksensisäisesti, kasvaimensisäisesti, valtimonsisäisesti, imukudoksensisäisesti ja suun kautta.

Kasvainten vastainen farmaseuttinen koostumus voidaan tehdä mihin tahansa farmaseuttiseen muotoon, joka soveltuu haluttua tietä annettavaksi. Esimerkkejä sellaisista koostumuksista ovat kiinteät suun kautta annettavat koostumukset, kuten tabletit, kapselit, pillerit, jauheet ja rakeet, nestekoostumukset suun kautta annettavaksi, kuten liuokset, suspensiot, siirapit tai eliksiirit ja parenteraalisesti annettavat valmisteet, kuten steriilit liuokset, suspensiot tai emulsiot. Ne voidaan valmistaa myös steriilien kiinteiden koostumusten muotoon, jotka voidaan liuottaa steriiliin veteen, fysiologiseen suolaliuokseen tai muuhun steriiliin injektoitavaan väliaineeseen välittömästi ennen käyttöä.

Tietylle nisäkäspotilaalle annettavat optimiannokset ja ohjeet ovat alan asiantuntijan helposti todettavissa. Täysin ymmärrettävää on tietenkin, että käytettävä annos vaihtelee riippuen tietystä formuloidusta koostumuksesta, tietystä käytettävästä yhdisteestä, antotavasta ja tietystä käsiteltävästä kohdasta, potilaasta ja sairaudesta. Monet tekijät, jotka modifioivat lääkkeen vaikutusta, on otettava huomioon, mukaan lukien ikä, paino, sukupuoli,

ruokavalio, antoaika, antotie, erityisnopeus, potilaan tila, lääkeyhdistelmät, reaktioherkkyydet ja sairauden vakavuus.

Seuraavat esimerkit ovat ainoastaan kuvaamistarkoituksessa esitettyjä eikä niitä pidä katsoa keksinnön piiriä rajoittaviksi.

Seuraavissa esimerkeissä protoni- ja hiili-ydinmagneettiset resonanssi (NMR)-spektrit (käyttämällä sisäisenä vertailuna CDCl_3 :a tai D_2O :ta) ja fosfori NMR-spektrit (käyttämällä sisäisenä vertailuna 85-prosenttista H_3PO_4 :n vesiliuosta) määritettiin Bruker WM360-spektrometrillä. Infrapuna-spektrit (IR) määritettiin Perkin-Elmer 1800 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer'illä. "Flash-kromatografia" viittaa menetelmään, jota on selostanut Still (Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A.; J. Org. Chem., 1978, 43, 2923) ja suoritettiin käyttämällä E. Merck'in silikageeliä (230-400 mesh). Käänteisfaasikromatografointi suoritettiin positiivisessa typpipaineessa käyttämällä silikageeliin sidottua valmistetta C 18 (oktadekyyilisilaani) (40 - μm läpimitta, toimittaja J. T. Baker).

Esimerkki 1

Etoposidi-4'-fosfaattidinatriumsuola (yhdiste VIa)

Magneettisesti sekoitettua suspensiota, jossa oli etoposidia (2,30 g, 3,91 mmoolia) kuivassa asetonitriilissä (210 ml), lämmitettiin kunnes liukeneminen oli tapahtunut lähes täydellisesti. Liuoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan, ja lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (2,36 ml, 13,5 mmoolia). Seos jäähdytettiin sitten 0 °C:seen ja 30 sekunnin aikana lisättiin ruiskun avulla POCl_3 :a (666 mg, 4,34 mmoolia). Seoksen annettiin kohota hitaasti 2-3 tunnin aikana huoneen lämpötilaan ja sekoittamista jatkettiin huoneen lämpötilassa 63 tuntia. Tämän ajan kuluttua seoksesta poistettiin 20 tilavuusprosenttia ja käsiteltiin dietyyliamiinin kanssa esimerkissä 2 selos-

tetulla tavalla. Jäljellä olevaa osaa käsiteltiin natrium-
vetykarbonaatin liuoksen (6,0 g, 71,4 mmoolia) kanssa
deionoidussa H_2O :ssa (100 ml), seosta sekoitettiin huoneen
lämpötilassa 80 minuuttia, ja jaettiin sitten kyllästetyl-
5 lä natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella (20 ml) deioni-
soituun H_2O :hon (125 ml) ja etyyliasetaattiin (350 ml) liu-
keneviin osiin. Orgaaninen kerros uutettiin edelleen deio-
noidulla H_2O :lla (1 x 50 ml) ja yhdistetyt vesikerrokset
pestiin etyyliasetaatilla (250 ml) ja käsiteltiin sitten
10 0,5 mm:n vakuuissa huoneen lämpötilassa tunnin ajan
liuennneiden liuottimien poistamiseksi. Vesiosa pantiin
sitten 4 cm:n läpimittaiseen kolonniin, jossa oli 15 cm
oktadekyyilisilaanilla sidottua silikageeliä, joka oli pa-
kattu metanolissa ja tasapainoitettu H_2O :lla. Koko vesi-
15 osan lisäämisen jälkeen kolonni eluoitiin H_2O :lla (175 ml)
epäorgaanisten suolojen poistamiseksi ja sitten tuote
eluoititiin H_2O :n ja CH_3OH :n seoksella 4:1. Haihduttamalla
liuotin pois 0,5 torrin vakuuissa saatiin 744 mg (36 %)
puhdasta otskikon yhdistettä värittömänä kiinteänä ainee-
20 na. Vaihtoehtoisesti lyofilisoimalla saadaan puhdasta ot-
sikön yhdistettä hyvin kuohkeana pienitiheyksisenä kiin-
teänä aineena.

IR (KBr) 3426, 1775, 1593, 1505, 1486, 1337, 1239,
1191, 1122, 1078, 1034, 983, 927, 888, 876, 851, 840, 697,
25 684, 664, 547 cm^{-1} .

360 MHz 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),
30 4,47-4,35 (m, 2H), 4,24 (dd, 1H, $J=4,4$ ja 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,
35 100,4, 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.

146 MHz ^{31}P NMR (D_2O) δ 3,79

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

Analyysi:

5 Laskettu yhdisteelle $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{Na}_2\text{O}_{16}\text{P}$:

C 48,89; H 4,39; Na 6,45

Saatu* C 48,72; H 4,56; Na 6,56

* Säädetty 8,16 %:ille H_2O :ta, määritettynä Karl Fischer'in analyysimenetelmällä.

10 Esimerkki 2

Etoposidi-4'-(bis[N,N-dietyyli]fosfoniamidi) (VII, X=O, R^1 =metyyli, R^6 =H, Y=N(Et) $_2$, R^2 = R^3 =Et)

Esimerkissä 1 mainitulla tavalla 20 tilavuus-% etoposidin ja POCl_3 :n reaktiotuoteseosta lisättiin dietyyliamiiniin (4 ml) ja sekoitettiin huoneen lämpötilassa 3 tuntia. Liuotin haihdutettiin pois vakuuissa ja vaaleanpunakeltainen jäännös puhdistettiin flashkromatografioimalla silikageelillä. Eluoimalla seoksella 4 % metanolia metyleenikloridissa saatiin 271,3 mg (46,9 %) puhdasta otsikon yhdistettä vaaleankeltaisena kiinteänä aineena.

IR (KBr) 3408, 2974, 2936, 2877, 1774, 1598, 1508, 1486, 1467, 1421, 1383, 1339, 1234, 1191, 1162, 1130, 1098, 1079, 1037, 902, 858, 795, 713, 700, 544 cm^{-1} .

25 360 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, $J=3,2\text{Hz}$), 4,71 (q, 1H, $J=5,1\text{Hz}$), 4,61 (d, 1H, $J=7,6\text{Hz}$), 4,57 (d, 1H, $J=5,2\text{Hz}$), 4,39 (dd, 1H, $J=9,1$ and $10,2\text{Hz}$), 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, $J=5,1\text{Hz}$), 1,10 (m, 12H).

146 MHz ^{31}P NMR (CDCl_3) δ 16,49.

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

35

Esimerkki 3Etoposidi-4'-(N,N-[2-kloorietyyli]fosforyylikloridi)(VII, R¹=metyyli, R⁶=H, X=O, Y=Cl, R²=R³=CH₂CH₂Cl)

Magneettisesti sekoitettua etoposidin (2,00 g, 3,40 mmoolia) suspensiota kuivassa asetonitriilissä (220 ml) lämmitettiin kunnes liukeneminen oli tapahtunut lähes täydellisesti. Seos jäähdytettiin huoneen lämpötilaan ja käsiteltiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinin (2,05 ml, 11,8 mmoolia) kanssa. Seos jäähdytettiin sitten 0 °C:seen N₂:n suojaamana ja ruiskun avulla lisättiin 30 sekunnin kuluessa fosforioksikloridia (624 mg, 4,07 mmoolia). Seosta sekoitettiin magneettisesti 0 °C:ssa 2,5 tuntia ja sitten huoneen lämpötilassa vielä 1,5 tuntia. Sitten lisättiin nopeasti bis-(2-kloorietyyliamiini)hydrokloridia (1,82 g, 10,2 mmoolia) ja sen jälkeen heti lisää N,N-di-isopropyylietyyliamiinia (2,10 ml, 12,0 mmoolia). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 85 minuuttia, konsentroitiin vakuuissa noin 5 ml:n tilavuiseksi, ja liuotettiin etyyliasetaatettiin (400 ml) ja metanoliin (5 ml). Saatu liuos pestiin pH 5-puskurilla (2 x 200 ml), vedellä (150 ml) ja suolaliuoksella (150 ml) ja kuivattiin Na₂SO₄/MgSO₄-seoksella. Haihduttamalla liuotin pois saatiin keltaista-oranssinväristä kiinteätä ainetta, joka puhdistettiin flash-kromatografioimalla silikageelillä 3-4 % metanolia sisältävällä metyleenikloridilla, jolloin saatiin 1,25 g (45,4 %) puhdasta otsikon yhdistettä värittömänä kiinteänä aineena.

360 MHz ¹H NMR (CDCl₃) 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 ³¹P NMR (CDCl₃) δ 11,16 ja 10,96 (kaksi piikkiä kiertävästä fosforista johtuen).

Massaspektri (FAB), m/e, 812, 810, 808.
 $C_{33}H_{39}Cl_3NO_{14}P$ edellyttää M^+ (^{35}Cl) 809.

Esimerkki 4

Etoposidi-4'-tiofosfaattidinatriciumsuola (yhdiste VIb)

5 Magneettisesti sekoitettua etoposidin (2,04 g, 3,47 mmoolia) suspensiota kuivassa asetonitriilissä (175 ml) lämmitettiin kunnes liukeneminen oli tapahtunut lähes täydellisesti. Liuoksen annettiin jäähtyä huoneen lämpötilaan ja sitten siihen lisättiin N,N-di-isopropyylietyyliamiinia
 10 (2,00 ml, 11,5 mmoolia). Seos jäähdytettiin sitten 0 °C:seen ja ruiskun avulla lisättiin 30 sekunnin aikana tiofosforyylikloridia (0,720 g, 4,17 mmoolia). Seoksen annettiin lämmetä hitaasti huoneen lämpötilaan 2-3 tunnin kuluessa ja sekoittamista jatkettiin huoneen lämpötilassa
 15 16 tuntia. Seos lämmitettiin sitten 30-35 °C:seen ja pidettiin tuossa lämpötilassa vielä 4 tuntia. TLC:ssä (5 % CH_3OH :ta CH_2Cl_2 :ssa) havaittiin suurehko uusi täplä, jonka R_f -arvo oli suurempi kuin etoposidin. Reaktioseosta käsiteltiin kiinteään natriumvetykarbonaatin (7,4 g) kanssa ja
 20 sitten lisättiin deionisoitua H_2O :ta (100 ml). Seosta sekoitettiin 28-25 °C:ssa 1,5 tuntia ja huoneen lämpötilassa 1,5 tuntia. Seos jaettiin kyllästetyllä natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella (30 ml) deionisoituun H_2O :hon (200 ml) ja etyyliasetaattiin (300 ml) liukeneviin osiin.
 25 Jatkokäsittely ja käänteisfaasi-kromatograafinen käsittely suoritettiin esimerkissä 1 kuvatus menetelmän mukaisesti, jolloin saatiin 1,03 g (40,8 %) puhdasta otsikon yhdistettä värittömänä kiinteänä aineena.

30 360 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, $J=4,3$ ja 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).

35

Massaspektri (FAB), m/e 728 (M^+), 706 ($M^+ + H - Na$)
 $C_{29}H_{31}Na_2O_{15}PS$ edellyttää M^+ , 728

Esimerkki 5

Etoposidi-4'-[[N,N-bis(2-kloorietyyli)amino]-[N-3-hydrok-
sipropyyli)amino]]fosfaatti (VII, X=O, R¹=metyyli, R⁶=H,
R²=R³=2-kloorietyyli, Y=-NH(CH₂)₃OH

- 5 Magneettisesti sekoitettua liuosta, jossa oli esi-
merkin 3 yhdistettä (280 mg, 0,346 mmoolia) CH₂Cl₂:ssa
(3 ml), käsiteltiin liuoksen kanssa, jossa oli 3-amino-1-
propanolia (33,5 mg, 0,446 mmoolia) CH₂Cl₂:ssa (1 ml).
5 minuutin kuluttua lisättiin vielä 3-amino-1-propanolia
10 (31,0 mg, 0,413 mmoolia) absoluuttisessa metanolissa
(0,5 ml). Reaktioseos puhdistettiin panemalla suoraan
4:lle preparatiiviselle TLC-levylle (1 mm, E. Merck silica
gel), jotka kehitettiin käyttämällä 5-8 % CH₃OH:a sisältä-
vää CH₂Cl₃:a. Eluoimalla haluttu tuotevyöhyke käyttämällä
15 5 % CH₃OH:a sisältävää etyyliasetaattia ja haihduttamalla
sen jälkeen kuiviin vakuuissa ja kuivaamalla sitten edel-
leen 0,1 torr:n vakuuissa saatiin 185 mg (63 %) puhdasta
otsikon yhdistettä värittömänä kiinteänä aineena (diaste-
reomeerien seosta, fosforin kohdalla).
- 20 360 MHz ¹H NMR (CDCl₃) δ 7,20 (br s, 1H), 6,80 (s, 1H),
6,50 ja 6,48 (2s, 1H), 6,26 ja 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).
- 25 Massaspektri (FAB), m/e, 849, 851 (M⁺ + H, ³⁵Cl,
³⁷Cl). C₃₆H₄₇Cl₂O₁₅P edellyttää M⁺ 848 (³⁵Cl) ja 850
(³⁷Cl).

Esimerkki 6Etoposidi

- 30 4'-[[N,N-bis(2-kloorietyyli)amino]-[N-[2-[(3-nitropyridyl-
2-yyli)disulfidi]etyyli]]amino]fosfaatti (VII, X=O,
R¹=metyyli, R⁶=H, R²=R³=2-kloorietyyli, Y=NH(CH₂)₂-SS-(3-nit-
ropyridyl-2-yyli)

- 35 Seosta, jossa oli esimerkin 3 yhdistettä (248 mg,
0,306 mmoolia) ja 2-(3-nitropyridyyli)-1-(2-aminoetyyli)-

disulfidihiydrokloridia (105 mg, 0,393 mmoolia), käsiteltiin CH_2Cl_2 :n (7 ml) kanssa, minkä jälkeen lisättiin diisopropyylietyyliamiinia (100 μl , 0,570 mmoolia) ja kuivaa metanolia (0,5 ml). Saatua liuosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1,5 tuntia ja sen jälkeen puhdistettiin panemalla tuote suoraan neljälle preparatiiviselle TLC-levylle (1 mm, E. Merck silica gel), jotka kehitettiin käyttämällä 4-5 % CH_3OH :ta sisältävää etyyliasetaattia. Eluoimalla haluttu tuotevyöhyke käyttämällä 4-5 % CH_3OH :a sisältävää etyyliasetaattia ja haihduttamalla sen jälkeen kuiviin vakuuissa ja kuivaamalla sitten edelleen 0,1 torrin vakuuissa, saatiin 231,7 mg (75,3 %) puhdasta otsikon yhdistettä keltaisen-ruskeana kiinteänä aineena (diastereomeerin seosta, fosforin kohdalla).

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 ja 8,77 (2m, 1H), 8,48 (m, 1H), 7,33 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,51 ja 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, 19 H), 2,68 (br s, 1H, OH), 2,37 (br s, 1H, OH), 1,37 (d, 3H).

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

Esimerkki 7

Etoposidi

4'-difenyylifosfaatti ($\text{R}^1=\text{CH}_3$, $\text{R}^6=\text{H}$, $\text{R}^7=\text{R}^8=\text{fenyyli}$)

Magneettisesti sekoitettua suspensiota, jossa oli etoposidia (10,50 g, 17,84 mmoolia, kuivattu P_2O_5 :lla 80 °C:ssa/0,5 torria) kuivassa asetonitriilissä (450 ml), käsiteltiin di-isopropyylietyyliamiinin (4,20 ml, 24,1 mmoolia) kanssa ja sitten lisättiin huolellisesti ruiskun

avulla difenyylikloorifosfaattia (2,00 ml, 9,65 mmoolia). Seosta sekoitettiin N_2 :n suojaamana kaksi tuntia 50 °C:ssa, jolla kohdalla kaikki etoposidi oli liuennut. Lisättiin vielä difenyylikloorifosfaattia (1,80 ml, 8,68 mmoolia) ja reaktioseosta pidettiin 45 °C:ssa 72 tuntia. Sen jälkeen kun oli lisätty enemmän amiiniemästä (0,75 ml, 4,3 mmoolia) ja difenyylikloorifosfaattia (0,80 ml, 3,86 mmoolia), seosta sekoitettiin 40-45 °C:ssa 27 tuntia, käsiteltiin lisätyn difenyylikloorifosfaatin (0,40 ml, 1,93 mmoolia) kanssa, ja pidettiin 40-45 °C:ssa 22 tuntia. Sitten lisättiin isopropanolia (20 ml), liuotin haihdutettiin pois vakuuissa ja kiinteä jäännös liuotettiin CH_2Cl_2 :iin (500 ml), ja erotettiin H_2O :n (400 ml) kanssa. Vesikerrosta uutettiin edelleen CH_2Cl_2 :n (100 ml) kanssa ja yhdistetyt orgaaniset uutteen pestiin suolaliuoksella (250 ml) ja kuivattiin ($Na_2SO_4/MgSO_4$). Haihduttamalla pyörivässä haihduttimessa ja suorittamalla sen jälkeen flash-kromatografointi silikageelillä käyttämällä 2-3 % CH_3OH :a sisältävää CH_2Cl_2 :a, saatiin 12,50 g (85 %) puhdasta otsikon yhdistettä värittömänä kiinteänä aineena.

FAB MS m/e (suhteellinen intensiteetti) 820 ($M+H$)⁺

IR (KBr) 3460, 2925, 1775, 1601, 1490 cm^{-1} .

1H NMR ($CDCl_3$) 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).

Analyysi:

Laskettu yhdisteelle $C_{41}H_{41}O_{16}P$:

C 60,00, H 5,04;

Saatu: C 60,20, H 5,16

Esimerkki 8

Etoposidi 4'-fosfaatti (V; $R^1=CH_3$; $R^6=H$, $R^7=R^8=H$)

Platinaoksidia (0,198 g, 0,87 mmoolia) lisättiin vasta avatusta pullostasta (Aldrich Chemical Co.) liuokseen,

jossa oli etoposidi-4'-difenyylifosfaattia (esimerkin 7 tuotetta; 0,79 g, 0,962 mmoolia) 95 ml:ssa absoluuttista etanolia. Liuosta hydrattiin Parr'in laitteessa 45-50 psi:n (n. 310-340 kPa:n) paineessa 4 tuntia huoneen lämpötilassa. Reaktioseos suodatettiin Celite-patjan läpi käyttämällä eluenttina etanolia. Konsentroimalla vakuuissa ja kuivaamalla P_2O_5 :n päällä 14 tuntia vakuuissa saatiin haluttua tuotetta valkeana kiinteänä aineena (0,627, 94 %):

FAB MS m/e (suhteellinen intensiteetti) 669 (M+H)⁺

10 IR (KBr) 3440, 2930, 1778, 1604, 1498 cm^{-1} .

¹H NMR (DMSO- d_6) 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).

15 ¹³C NMR (DMSO- d_6) 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.

20 **Analyysi:**

Laskettu yhdisteelle: $C_{29}H_{33}O_{16}P$. 0,85 % H_2O :

C 50,95; H 5,11;

Saatu: C 51,42; H 4,97

Esimerkki 9

25 Etoposidi-4'-bis(2,2,2-trikloorietyyli)fosfaatti (VIII;
 $R^6=CH_3$, $R^1=H$, $R^7=R^8=CH_2CCl_3$)

Toistettiin esimerkissä 7 selostettu menettely käyttämällä bis(2,2,2-trikloorietyyli)kloorifosfaattia, jolloin saatiin otsikon yhdistettä 100 %:n saannoin väritömänä kiinteänä aineena silikageelillä flash-kromatografioinnin jälkeen.

30 IR (KBr) 1780, 1610, 1490, 1415, 1345, 1240, 1040, 960, 725 cm^{-1} .

35

3,43 (dd,1H), 3,34-3,24 (m,3H), 2,91-2,82 (m,1H), 1,38 (d,3H,J=4,9Hz).

Massaspektri (FAB, m/e = 928,9848 (M'+H)).

C₃₃H₃₆Cl₆O₁₆P edellyttää 928,9872.

5

Esimerkki 10

Etoposidi-4'-fosfaattidinatriciumsuola etoposidi-4'-fosfaatista

Menetelmä A

10 Vetymuodossa olevaa kaupan olevaa Dowex 50 x 8-100 kationinvaihtajahartsia (20 g, Aldrich Chemical Co.) käsiteltiin ylimäärin käytetyn 1-norm. NaOH:n kanssa. Muodostunut Na⁺-muodossa oleva hartsi pakattiin 2 cm:n kolonniin ja tasapainotettiin vedellä. Pakatun kolonnin yläpäähän pantiin etoposidi-4'-fosfaattia (esimerkin 8 tuotetta, 1,25 g, 1,87 mmoolia) liuotettuna 25 ml:aan deionisoitua vettä ja kolonni eluoiitiin vedellä. Otsikon yhdistettä sisältävät fraktiot yhdistettiin, suodatettiin ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 1,15 g otsikon yhdistettä valkeana ja kuohkeana aineena.

20

Menetelmä B

2,90 g:aan (4,34 mmoolia) raakaa etoposidi-4'-fosfaattia (esimerkin 8 tuotetta) lisättiin deionisoitua vettä (50 ml) ja natriumvetykarbonaattia (3,00 g, 35,7 mmoolia). Seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 30 minuuttia, jonka ajan kuluessa CO₂:n kehittyminen lakkasi. Seos kromatografioitiin sitten esimerkissä 1 selostetulla tavalla. Eluoimalla deionisoidulla vedellä (300 ml) ja sitten H₂O/CH₃OH-seoksella 4:1, saatiin 1,90 g (61 %) puhdasta otsikon yhdistettä kuohkeana, valkeana kiinteänä aineena lyofilisoinnin jälkeen.

30

Esimerkki 11

35 Toistetaan esimerkissä 2 selostettu yleinen menetelmä paitsi, että siinä käytetty dietyyliamiini korvataan alla luetelluilla amiineilla, jolloin saadaan vastaavia etoposidi-4'-fosforodiamidaatteja.

<u>Amiini</u>		Yhdiste VII (X=O, R ¹ =metyyli, R ⁶ =H, Y=NR ² R ³)	
		<u>R²</u>	<u>R³</u>
	propyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
5	etanoliamiini	H	CH ₂ CH ₂ OH
	metoksietyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃
	N-asetyylietyleenidiamiini	H	CH ₂ CHNC(O)CH ₃
	2-metyyliallyyliamiini	H	CH ₂ CH(CH ₃)=CH ₂
	allyyliamiini	H	CH ₂ CH=CH ₂
10	dimetyyliaminopropyyliamiini	H	(CH ₂)N(CH ₃) ₂
	N-metyylietyleenidiamiini	H	CH ₂ CH ₂ NCH ₃
	trifluorietyyliamiini	H	CH ₂ CF ₃
	2-aminoetaanitioli	H	CH ₂ CH ₂ SH
	sykloheksyyliamiini	H	sykloheksyyli
15	2-amino-1-metoksipropaani	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
	2-(etyylitio)-etyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₃
	kloorietyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ Cl
	4-aminosykloheksanoli	H	4-OH-sykloheksyyli
	etyyli-metyyliamiini	CH ₃	CH ₂ CH ₃
20	etyylibutyliamiini	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃
	metyyliaminoetanoli	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	bis(2-kloorietyyli)amiini	CH ₂ CH ₂ Cl	CH ₂ CH ₂ Cl
	2-propyyliaminoetanoli	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	3-metyyliaminopropio-		
25	nitriili	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CN
	piperidiini	R ² +R ³ = -(CH ₂) ₅ -	

Esimerkki 12

30 Toistetaan esimerkissä 3 selostettu yleinen menetelmä paitsi, että siinä käytetty bis(2-kloorietyyli)-amiini korvataan alla luetelluilla amiineilla, jolloin saadaan vastaavia etoposidikloroformamidaatteja.

Yhdiste VII ($X=O$, R^1 =metyyli,
 $R^6=H$, $Y=Cl$)

		<u>R²</u>	<u>R³</u>
	propyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃
5	etanoliamiini	H	CH ₂ CH ₂ OH
	metoksietyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ OCH ₃
	N-asetyylietyleenidiamiini	H	CH ₂ CHNC(O)CH ₃
	2-metyyliallyyliamiini	H	CH ₂ CH(CH ₃)=CH ₂
	allyyliamiini	H	CH ₂ CH=CH ₂
10	dimetyyliaminopropyyliamiini	H	(CH ₂)N(CH ₃) ₂
	N-metyylietyleenidiamiini	H	CH ₂ CH ₂ NCH ₃
	trifluorietyyliamiini	H	CH ₂ CF ₃
	2-aminoetaanitioli	H	CH ₂ CH ₂ SH
	sykloheksyyliamiini	H	sykloheksyyli
15	2-amino-1-metoksipropaani	H	CH(CH ₃)CH ₂ OCH ₃
	2-(etyylitio)-etyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ SCH ₂ CH ₃
	kloorietyyliamiini	H	CH ₂ CH ₂ Cl
	4-aminosykloheksanoli	H	4-OH-sykloheksyyli
	etyylimetyyliamiini	CH ₃	CH ₂ CH ₃
20	etyylibutyliamiini	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃
	metyyliaminoetanoli	CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	dietyyliamiini	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃
	2-propyyliaminoetanoli	CH ₂ CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ OH
	3-metyyliaminopropioni-		
25	nitriili	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CN
	piperidiini	R ² +R ³ =	-(CH ₂) ₅ -

Toistetaan esimerkin 5 yleinen menetelmä paitsi, siinä käytetty 3-aminopropanoli korvataan seuraavilla amiineilla, jolloin saadaan vastaavia epäsymmetrisiä etoposidifosforodiamidaatteja.

Amiini

Yhdiste VII ($X=O$, $R^1=\text{metyyli}$,
 $R^6=H$, $Y=NR^4R^5$, $R^2=R^3=CH_2CH_2Cl$)

		<u>R^2</u>	<u>R^3</u>
	propyyliamiini	H	$CH_2CH_2CH_3$
5	etanoliamiini	H	CH_2CH_2OH
	metoksietyyliamiini	H	$CH_2CH_2OCH_3$
	N-asetyylietyleenidiamiini	H	$CH_2CHNC(O)CH_3$
	2-metyyliallyyliamiini	H	$CH_2CH(CH_3)=CH_2$
	allyyliamiini	H	$CH_2CH=CH_2$
10	dimetyyliaminopropyyliamiini	H	$(CH_2)N(CH_3)_2$
	N-metyylietyleenidiamiini	H	$CH_2CH_2NCH_3$
	trifluorietyyliamiini	H	CH_2CF_3
	2-aminoetaanitioli	H	CH_2CH_2SH
	sykloheksyyliamiini	H	sykloheksyyli
15	2-amino-1-metoksipropaani	H	$CH(CH_3)CH_2OCH_3$
	2-(etyylitio)-etyyliamiini	H	$CH_2CH_2SCH_2CH_3$
	kloorietyyliamiini	H	CH_2CH_2Cl
	4-aminosykloheksanoli	H	4-OH-sykloheksyyli
	etyylimetyyliamiini	CH_3	CH_2CH_3
20	etyylibutyliamiini	CH_2CH_3	$(CH_2)_3CH_3$
	metyyliaminoetanoli	CH_3	CH_2CH_2OH
	bis(2-kloorietyyli)amiini	CH_2CH_2Cl	CH_2CH_2Cl
	2-propyyliaminoetanoli	$CH_2CH_2CH_3$	CH_2CH_2OH
	3-metyyliaminopropio-		
25	nitriili	CH_3	CH_2CH_2CN
	piperidiini	$R^4+R^5=$	$-(CH_2)_5-$

Esimerkki 14

Toistetaan esimerkissä 7 selostettu yleinen menetelmä paitsi, että siinä käytetty difenyylikloorifosfaatti korvataan alla luetelluilla kloorifosfaateilla, jolloin saadaan vastaavia etoposide-4'-fosfaattidiestereitä ($X=O$, $R^1=\text{metyyli}$, $R^6=H$, $R^7=R^8=R$, alla esitetty).

Kloorifosfaatit [(RO)₂P(O)Cl]

R = metyyli

etyyli

bentsyyli

5 p-nitrobentsyyli

p-nitrofenyyli

p-bromibentsyyli

p-nitrofenetyyli

syaanoetyyli

10 o-(t-butyli)fenyyli

Esimerkki 15

Toistetaan esimerkeissä 1-16 selostetut yleiset menetelmät paitsi, että niissä käytetyt etoposide-lähtöaineet korvataan vastaavilla teniposideyhdisteillä, jolloin saadaan vastaavia teniposidetuotteita.

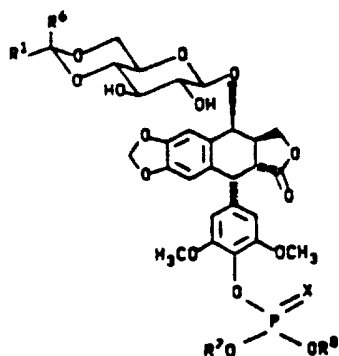
Esimerkki 16Teniposidi-4'-fosfaattidinatriumsuola

Magneettisesti sekoitettua suspensiota, jossa oli teniposidia (4,00 g, 6,10 mmol) kuivassa asetonitriilissä (340 ml), kuumennettiin, kunnes saatiin täydellinen liuos. Sen jälkeen liuos jäähdytettiin 0°C:seen ja lisättiin N,N-di-isopropylietyyliamiinia (3,72 ml, 21,34 mmol). Fosforioksidikloridia (1,04 g, 6,77 mmol) lisättiin seokseen ruiskun avulla yli minuutin aikana. Seoksen annettiin hitaasti palautua huoneen lämpötilaan yli 2-3 tunnin aikana, ja sekoitusta jatkettiin huoneen lämpötilassa 24 tuntia. Sen jälkeen lisättiin 30 ml deionisoitua vettä, ja kokonaistilavuus konsentroitiin 50 ml:ksi vakuumissa. Konsentroitua seosta käsiteltiin natriumbikarbonaattiliuoksella (9,36 g, 111,38 mmol) deionisoidussa vedessä (200 ml), seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 2 tuntia ja käsiteltiin sitten etyyliasetaatilla (3 x 100 ml). Vesipitoinen kerros saatettiin sitten 0,5 mm:n vakuumiin huoneen lämpötilassa liuenneiden liuottimien poistamiseksi. Sen jälkeen vesipitoinen osa johdettiin

- halkaisijaltaan 4 cm:n pylvääseen, joka sisälsi 15 cm si-
likageeliin sidottua oktadekyylisilaania, joka oli pakat-
tu metanoliin ja tasapainotettu vedellä. Sen jälkeen kun
5 vesipitoinen osa kokonaisuudessaan oli kaadettu pylvää-
seen, pylväs eluoitiin vedellä (300 ml) epäorgaanisten
suolojen poistamiseksi ja sen jälkeen H_2O/CH_3OH -seoksella
(4:1) tuotteen eluoimiseksi. Tuotefraktiot konsentroitiin
vakuumissa 300 ml:ksi ja sen jälkeen ne jäädytettiin ja
lyofilisoitiin, jolloin saatiin 1,09 g (23 %) puhdasta
10 otsikon mukaista yhdistettä nukkamaisena valkoisena kiin-
teänä aineena.
- 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}
- 15 360 MHz 1H NMR (D_2O) 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
20 Hz), 3,13 (m, 1H)
- Massaspektri (FAB), m/e , 781 (M^+H). $C_{32}H_{31}O_{16}SPNa_2$ vaatii M^+ ,
780
- Korkean resoluution massaspektri $C_{32}H_{31}O_{16}SPNa_2$
laskettu: 781,0944
25 löydetty: 781,0947.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kaavan (V) mukaisten, kasvainten vastaisten epipodofyllotoksiiniglykosidi-4'-fosfaattijohdannaisten ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi

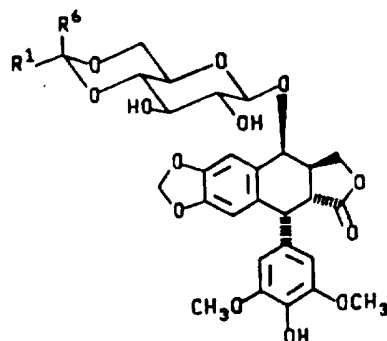


(V)

jossa R⁶ on H ja R¹ on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (C₁₋₁₀)-alkyyli, (C₂₋₁₀)-alkenyyl, (C₅₋₆)-sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, (C₆₋₁₀)-aryyli, (C₇₋₁₄)-aralkyyli ja (C₈₋₁₄)-aralkenyyl, jolloin jokainen aromaattisista renkaista voi olla substituoimaton tai niissä voi olla substituenttina yksi tai useampia ryhmiä sarjasta halogeeni, (C₁₋₈)-alkyyli, (C₁₋₈)-alkoksi, hydroksi, nitro ja amino; tai R¹ ja R⁶ ovat kumpikin (C₁₋₈)-alkyyli; tai R¹ ja R⁶ ja hiiliatomi, johon ne ovat sitoutuneet, muodostavat (C₅₋₆)-sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki; R⁷ ja R⁸ on itsenäisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat H, (C₁₋₅)-alkyyli, A-substituoitu (C₁₋₅)-alkyyli, (C₃₋₆)-sykloalkyyli, A-substituoitu (C₃₋₆)-sykloalkyyli, (C₆₋₁₀)-aryyli, A-substituoitu aryyli, alkyylisubstituoitu aryyli, (C₇₋₁₄)-aralkyyli, A-substituoitu aralkyyli ja alkyylisubstituoitu aralkyyli, jolloin mainittuina A-substituentteina on yksi tai useampia ryhmiä sarjasta hydroksi, alkoksi, alkanoyylioksi, syaano, amino, alkyyliamino, dialkyyliamino, karboksi, alkyylitio, merkaptio, merkaptotio, nitropyridyylidisulfiidi, alkanoyyliamino, alkanoyyli, karbamoyyli, nitro ja halogeeni, t u n n e t t u siitä, että

(I) (a) yhdisteen, jonka kaava (1) on

5

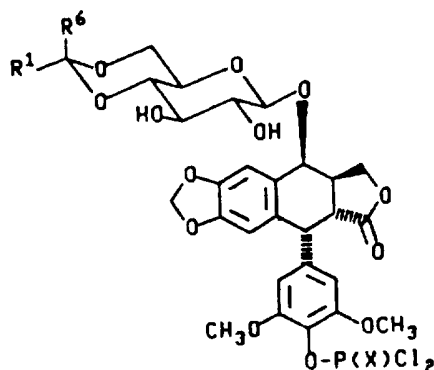


(1)

10

jossa R¹ ja R⁶ ovat edellä määriteltäviä, annetaan reagoi-
da yhdisteen kanssa, jonka kaava on P(X)Cl₃, jossa X on
edellä määriteltä, ja vetyakseptorin läsnäollessa, jol-
loin muodostuu kaavan (2) mukainen väliyhdiste;

15



(2)

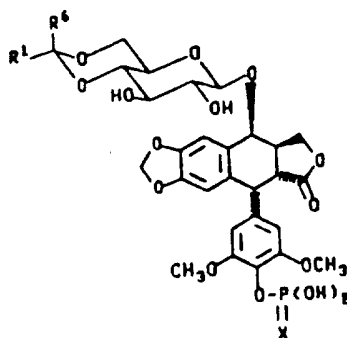
20

ja

25

(b) hydrolysoidaan kaavan (2) mukainen yhdiste
mahdollisesti emäksen läsnä ollessa, jolloin muodostuu
kaavan (3) mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hy-
väksyttävä suola;

30



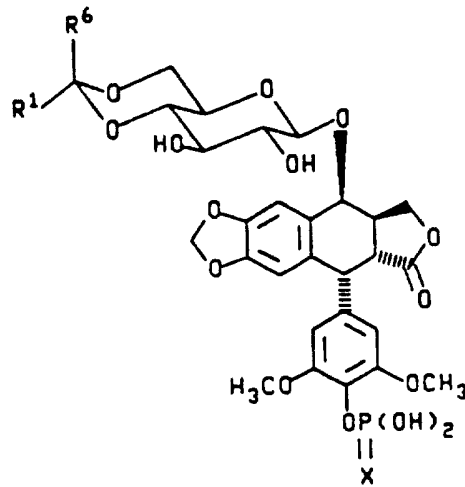
(3)

35

tai

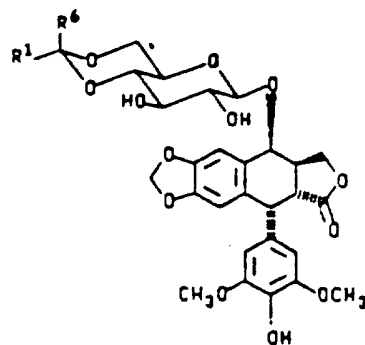
(c) kaavan (2) mukaisen yhdisteen annetaan reagoida ainakin yhden ekvivalentin kanssa sekä R^7OH :ta että R^8OH :ta, jossa R^7 ja R^8 merkitsevät samaa kuin edellä, edellyttäen, että R^7 ja R^8 eivät molemmat ole H, ja vetyakseptorin läsnä ollessa; ja kun toinen R^7 :stä tai R^8 :sta on H, yhdiste muutetaan mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi käsittelemällä emäksellä, tai

(II) yhdisteen valmistamiseksi, jonka kaava on



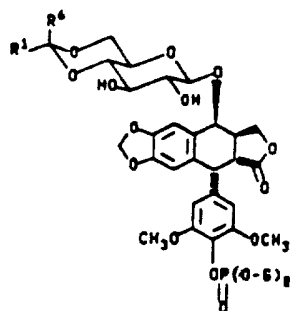
jossa R^1 , R^6 ja X ovat edellä määritellyjä, tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävän suolan valmistamiseksi

(a) muutetaan kaavan (IX) mukainen yhdiste



(IX)

yhdisteeksi, jonka kaava (X) on



(X)

5

jossa R^1 , R^6 ja X ovat aikaisemmin määriteltäjiä, ja G on fosfaattisuojarahmä;

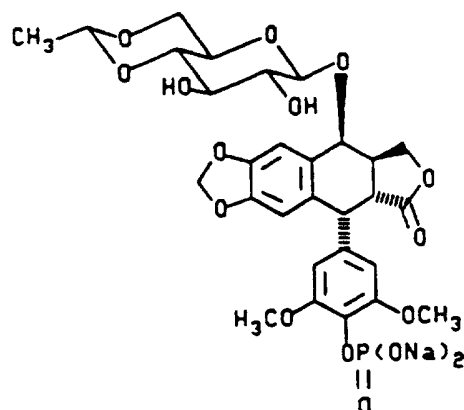
10

(b) poistetaan fosfaattisuojarahmä; ja

(c) vaiheen (b) tuote muutetaan mahdollisesti farmaseuttisesti hyväksyttäväksi suolaksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan etoposidi-4'-fosfaattidinaatriumsuola, jolla on kaava:

15

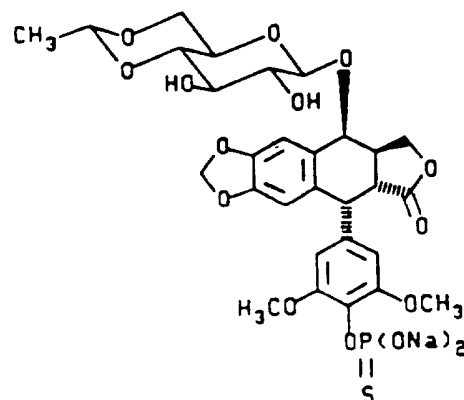


20

25

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että valmistetaan etoposidi-4'-tiofosfaattidinaatriumsuola, jolla on kaava:

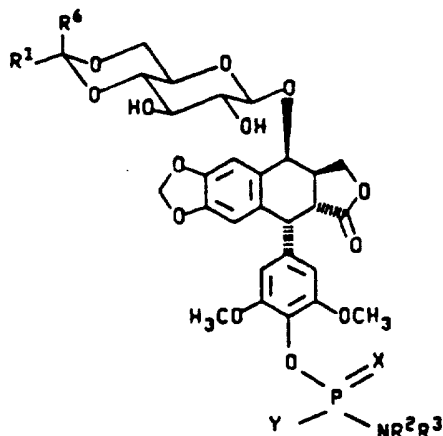
30



35

4. Patenttivaatimuksen 1 kohdan (II) mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vaiheessa (a) kaavan (IX) mukainen yhdiste saatetaan reagoimaan yhdisteen kanssa, jonka kaava on Hal-P(X)(O-G)_2 , jossa Hal on halogeeni ja X ja G ovat aikaisemmin määritellyjä, asetonitrilissä tai $(\text{C}_{2-5})\text{CN:n}$ kanssa ja trialkyyliamiinin läsnä ollessa.

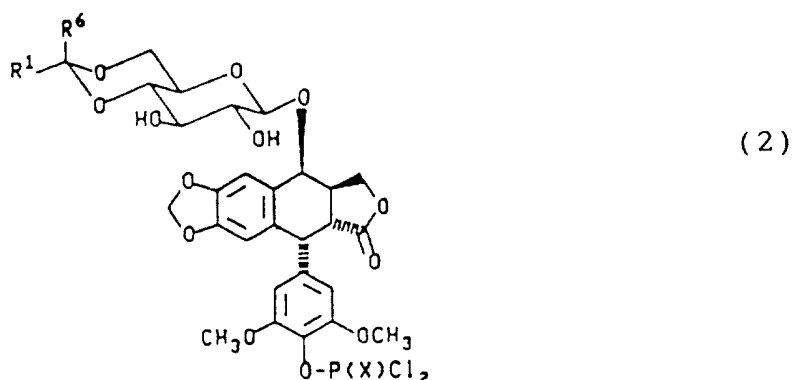
5. Menetelmä kaavan (VII) mukaisten, kasvainten vastaisten fosforoamidaattijohdannaisten ja niiden farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen valmistamiseksi,



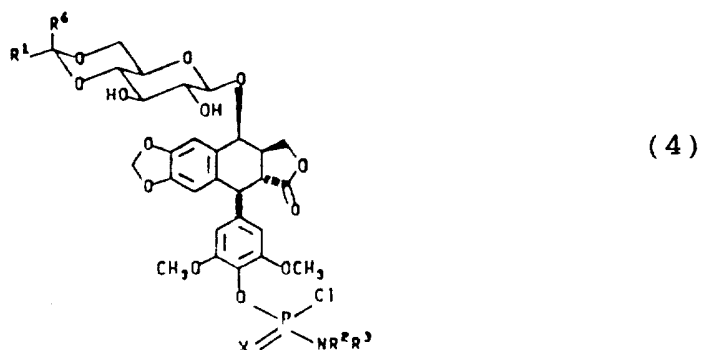
jossa R^6 on H ja R^1 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (C_{1-10}) -alkyyli, (C_{2-10}) -alkenylyli, (C_{5-6}) -sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, (C_{6-10}) -aryyli, (C_{7-14}) -aralkyyli ja (C_{8-14}) -aralkenylyli, jolloin jokainen aromaattisista renkaista voi olla substituoimaton tai niissä voi olla substituenttina yksi tai useampia ryhmiä sarjasta halogeeni, (C_{1-8}) -alkyyli, (C_{1-8}) -alkoksi, hydroksi, nitro ja amino; tai R^1 ja R^6 ovat kumpikin (C_{1-8}) -alkyyli; tai R^1 ja R^6 ja hiiliatomi, johon ne ovat sitoutuneet, muodostavat (C_{5-6}) -sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki; Y on Cl, OH tai NR^4R^5 ; R^2 , R^3 , R^4 ja R^5 on kukin itsenäisesti valittu ryhmästä, jonka muodostavat H, (C_{1-5}) -alkyyli, (C_{2-5}) -alkenylyli, (C_{3-6}) -sykloalkyyli, A-substituoitu (C_{1-5}) -alkyyli, A-substituoitu (C_{2-5}) -alkenylyli, A-substituoitu (C_{3-6}) -sykloalkyyli; tai R^2 , R^3 ja typpi, johon ne ovat sitoutuneet, merkitsevät

yhdessä 3-6 jäsenistä rengasta; tai R^4 , R^5 ja typpi, johon ne ovat sitoutuneet, merkitsevät yhdessä 3-6-jäsenistä rengasta; jolloin mainittuina A-substituentteina on yksi tai useampia ryhmiä sarjasta hydroksi, alkoksi, alkanoyylioksi, syaano, amino, alkyylimino, dialkyylimino, karboksi, alkyylitio, merkaptotio, nitropyridiylidisulfidi, alkanoyylimino, alkanoyyli, karbamoyyli, nitro ja halogeeni, t u n n e t t u siitä, että

(a) kaavan (2) mukaisen väliyhdisteen



annetaan reagoida amiinin kanssa, jonka kaava on HNR^2R^3 , jossa R^2 ja R^3 ovat edellä määriteltäviä, tai sen happoaditiosuolan kanssa, jolloin muodostuu kaavan (4) mukainen yhdiste;

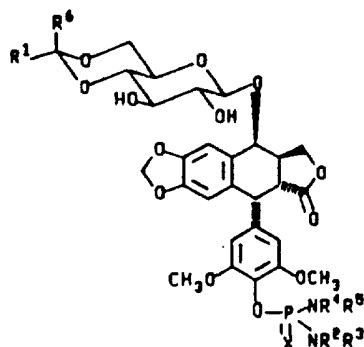


ja

(b) kaavan (4) mukaisen yhdisteen annetaan mahdollisesti reagoida toisen amiinin kanssa, jonka kaava on

HNR^4R^5 , jossa R^4 ja R^5 ovat edellä määriteltäviä, tai sen happoadditiosuolan kanssa, jolloin muodostuu kaavan (5) mukainen yhdiste;

5



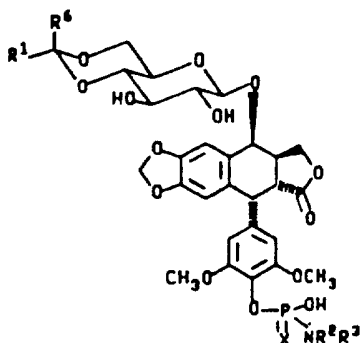
(5)

10

tai

(c) hydrolysoidaan kaavan (4) mukainen yhdiste mahdollisesti emäksen läsnä ollessa, jolloin muodostuu kaavan (6) mukainen yhdiste tai sen farmaseuttisesti hyväksyttävä suola.

15

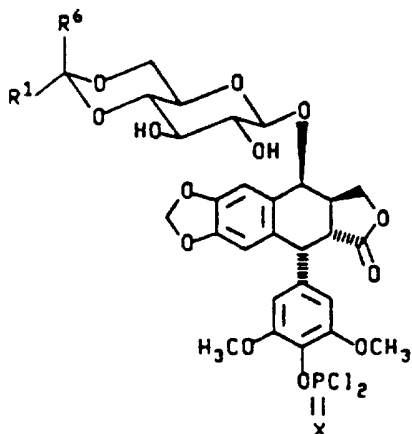


20

(6)

25

6. Väliyhdiste, jonka kaava on



30

(VIII)

35

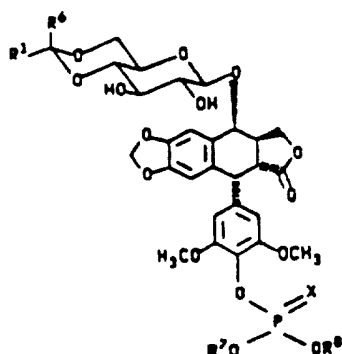
jossa R^6 on H ja R^1 on valittu ryhmästä, jonka muodostavat (C_{1-10}) -alkyyli, (C_{2-10}) -alkenyyli, (C_{5-6}) -sykloalkyyli, 2-furyyli, 2-tienyyli, (C_{6-10}) -aryyli, (C_{7-14}) -aralkyyli ja (C_{8-14}) -aralkenyyli, jolloin jokainen aromaattisista renkaista voi olla substituoimaton tai niissä voi olla substituenttina yksi tai useampia ryhmiä sarjasta halogeeni, (C_{1-8}) -alkyyli, (C_{1-8}) -alkoksi, hydroksi, nitro ja amino; tai R^1 ja R^6 ovat kumpikin (C_{1-8}) -alkyyli; tai R^1 ja R^6 ja hiiliatomi, johon ne ovat sitoutuneet, muodostavat (C_{5-6}) -sykloalkyyli-ryhmän; X on happi tai rikki.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R^6 on H; R^1 on metyyli ja X on happi.

8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen yhdiste, tunnettu siitä, että R^6 on H; R^1 on metyyli ja X on rikki.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av epipodofyllo-
toxinglukosid-4'-fosfatderivat med antitumör effekt, vil-
ka har formeln (V), och farmaceutiskt godtagbara salter
därav,

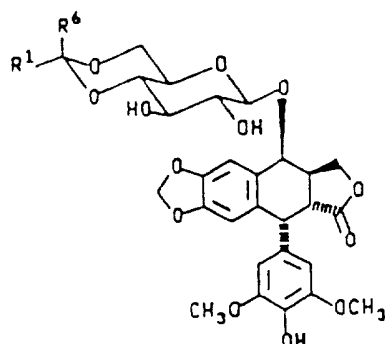


(V)

där R^6 är H och R^1 har valts från gruppen bestående av
(C_{1-10})-alkyl, (C_{2-10})-alkenyl, (C_{5-6})-cykloalkyl, 2-furyl, 2-
tienyl, (C_{6-10})-aryl, (C_{7-14})-aralkyl och (C_{8-14})-aralkenyl,
varvid varje aromatisk ring kan vara osubstituerad eller
de kan innehålla som substituent en eller flera grupper
från serien halogen, (C_{1-8})-alkyl, (C_{1-8})-alkoxi, hydroxi,
nitro och amino; eller R^1 och R^6 båda betecknar (C_{1-8})-al-
kyl; eller R^1 och R^6 och kolatomen, vid vilken de är bund-
na, bildar en (C_{5-6})-cykloalkylgrupp; X är syre eller sva-
vel; R^7 och R^8 självständigt har valts från gruppen be-
stående av H, (C_{1-5})-alkyl, en A-substituerad (C_{1-5})-alkyl,
(C_{3-6})-cykloalkyl, en A-substituerad (C_{3-6})-cykloalkyl,
(C_{6-10})-aryl, en A-substituerad aryl, en alkyl-substituerad
aryl, (C_{7-14})-aralkyl, en A-substituerad aralkyl och en al-
kyl-substituerad aralkyl, varvid nämnda A-substituenten
utgörs av en eller flera grupper från serien hydroxi, al-
koxi, alkanoyloxi, cyano, amino, alkylamino, dialkylami-
no, karboxi, alkyltio, merkaptotio, merkaptotio, nitropyri-
dyldisulfid, alkanoylamino, alkanoyl, karbamoyl, nitro och
halogen,

k ä n n e t e c k n a t därav, att
(I) (a) en förening med formeln (1)

5

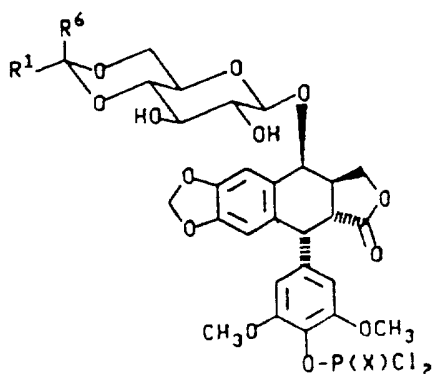


(1)

10

där R¹ och R⁶ är ovan definierade, omsätts med en före-
ning, som har formeln P(X)Cl₃, där X är ovan definierad,
och i närvaro av en väteacceptor, varvid bildas en mel-
lanprodukt med formeln (2):

20



(2)

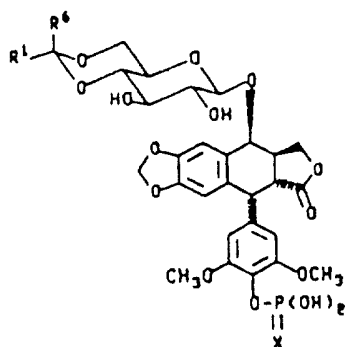
25

30

och

(b) föreningen med formeln (2) hydrolyseras, even-
tuellet i närvaro av en bas, varvid bildas en förening med
formeln (3) eller ett farmaceutiskt godtagbart salt där-
av;

35



(3)

5

10 eller

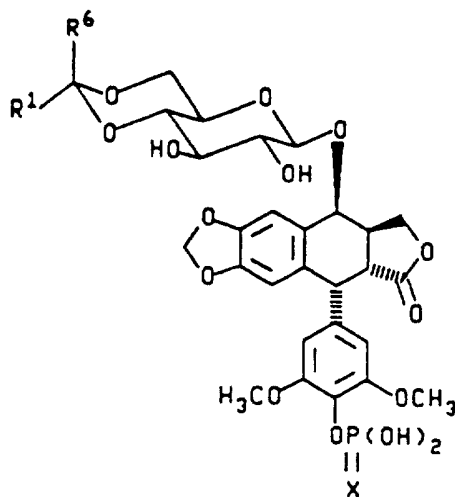
(c) föreningen med formeln (2) omsätts med åtminstone en ekvivalent av både R⁷OH och R⁸OH, där R⁷ och R⁸ betecknar samma som ovan, förutsatt, att R⁷ och R⁸ ej båda är H, och i närvaro av en väteacceptor; och då den ena av R⁷ och R⁸ är H, omvandlas föreningen eventuellt till ett farmaceutiskt godtagbart salt genom behandling med en bas,

15

eller

(II) för framställning av en förening med formeln

20



(II)

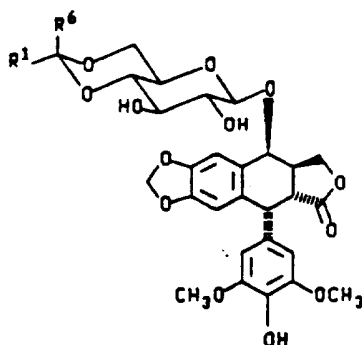
25

30

där R¹, R⁶ och X är ovan definierade, eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav

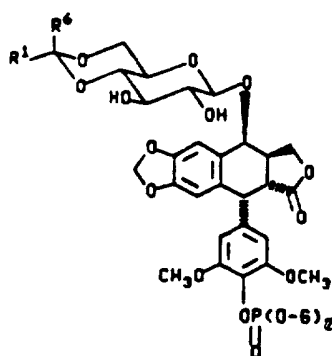
(a) omvandlas en förening med formeln (IX)

35



(IX)

till en förening med formeln (X)



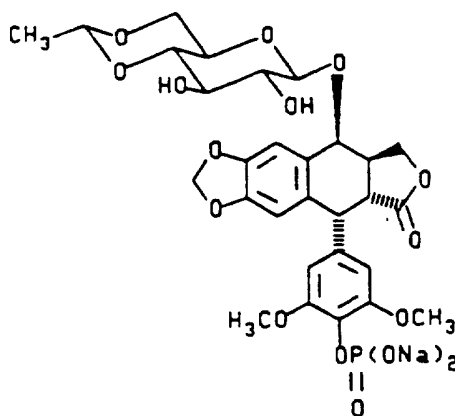
(X)

där R^1 , R^6 och X är ovan definierade och G är en fosfat-skyddsgrupp;

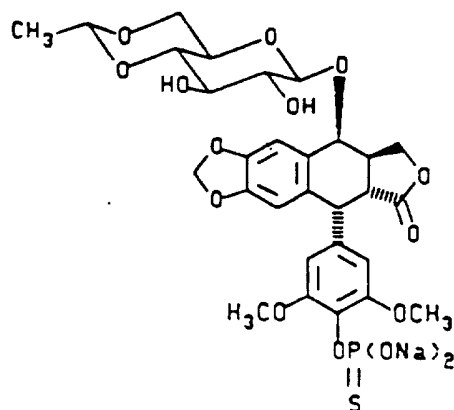
(b) fosfatskyddsgruppen avlägsnas; och

(c) produkten från steget (b) eventuellt omvandlas till ett farmaceutiskt godtagbart salt.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man framställer ett etoposid-4'-fosfatdinatriumsalt med formeln:

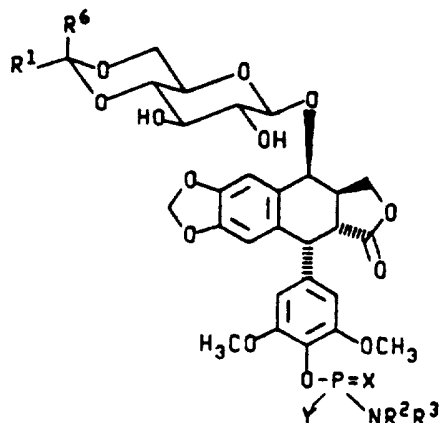


3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att man framställer ett etoposid
4'-tiofosfatdinatriumsalt med formeln:



4. Förfarande enligt patentkravet 1, punkt (II),
k ä n n e t e c k n a t därav, att i steget (a) omsätts
föreningen med formeln (IX) med en förening, som har for-
meln Hal-P(X)(O-G)_2 , där Hal är halogen och X och G är
ovan definierade, i acetonitril eller $(\text{C}_{2-5})\text{CN}$ och i när-
varo av trialkylamin.

5. Förfarande för framställning av fosforoamidat-
derivat med antitumör effekt, vilka har formeln (VII), och
farmaceutiskt godtagbara salter därav,



(VII)

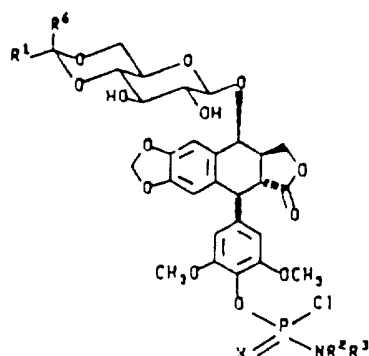
R^6 är H och R^1 har valts från gruppen bestående av (C_{1-10}) -
alkyl, (C_{2-10}) -alkenyl, (C_{5-6}) -cykloalkyl, 2-furyl, 2-tie-
nyl, (C_{6-10}) -aryl, (C_{7-14}) -aralkyl och (C_{8-14}) -aralkenyl,

20 k ä n n e t e c k n a t därav, att
(a) en mellanprodukt med formeln (2)



30

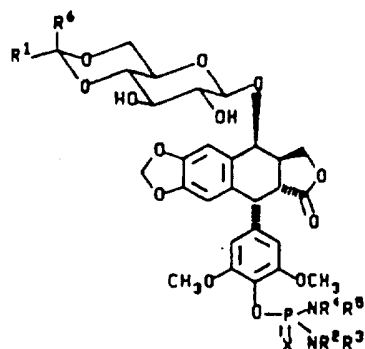
35



(4)

och

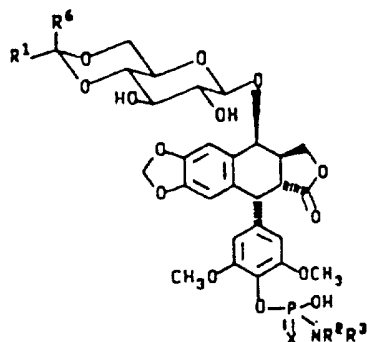
(b) föreningen med formeln (4) eventuellt omsätts med en annan amin, som har formeln HNR⁴R⁵, där R⁴ och R⁵ är ovan definierade, eller med ett syraadditionssalt därav, varvid bildas en förening med formeln (5);



(5)

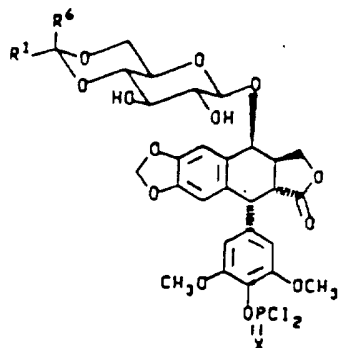
eller

(c) föreningen med formeln (4) hydrolyseras, eventuellt i närvaro av en bas, varvid bildas en förening med formeln (6) eller ett farmaceutiskt godtagbart salt därav.



(6)

6. Mellanprodukt med formeln



där R^6 är H och R^1 har valts från gruppen bestående av
 (C_{1-10}) -alkyl, (C_{2-10}) -alkenyl, (C_{5-6}) -cykloalkyl, 2-furyl, 2-
 tienyl, (C_{6-10}) -aryl, (C_{7-14}) -aralkyl och (C_{8-14}) -aralkenyl,
 varvid varje aromatisk ring kan vara osubstituerad eller
 de kan innehålla som substituent en eller flera grupper
 från serien halogen, (C_{1-8}) -alkyl, (C_{1-8}) -alkoxi, hydroxi,
 nitro och amino; eller R^1 och R^6 båda betecknar (C_{1-8}) -al-
 kyl; eller R^1 och R^6 och kolatomen, vid vilken de är bund-
 na, bildar en (C_{5-6}) -cykloalkylgrupp; och X är syre eller
 svavel.

7. Förening enligt patentkravet 6, k ä n n e -
 t e c k n a d därav, att R^6 är H; R^1 är metyl och X är
 syre.

8. Förening enligt patentkravet 6, k ä n n e -
 t e c k n a d därav, att R^6 är H; R^1 är metyl och X är
 svavel.