



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt



(10) DE 37 90 581 B4 2004.12.23

(12)

Patentschrift

(21) Deutsches Aktenzeichen: P 37 90 581.3
(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US87/01412
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 88/02366
(86) PCT-Anmeldetag: 16.06.1987
(87) PCT-Veröffentlichungstag: 07.04.1988
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung
in deutscher Übersetzung: 25.08.1988
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 23.12.2004

(51) Int Cl.⁷: C07D 253/10
C07D 405/12, C07D 413/12, A61K 31/53,
A61K 31/535, A61K 31/675
// C07D
405/12,253:08,307:52,413/12,253:08,265:30

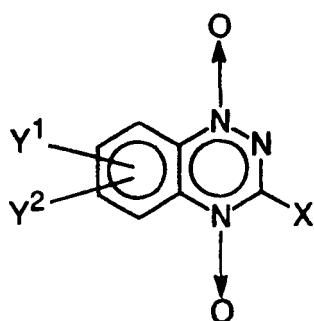
Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(30) Unionspriorität:
911906 25.09.1986 US
(71) Patentinhaber:
SRI International, Menlo Park, Calif., US
(74) Vertreter:
Müller, Schupfner & Gauger, 80539 München
(72) Erfinder:
Lee, William W., Palo Alto, Calif., US; Brown, J.
Martin, Stanford, Calif., US; Grange, Edward W.,
Palo Alto, Calif., US; Martinez, Abelardo P., San
Jose, Calif., US

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
US 42 06 212
US 36 97 518
US 24 89 352
J. Am. Chem. Soc., 05.Juli 1954,
S. 3551-3553;
C.A., 44, 3536i (1950);
J. Pharm. Sci., 69/7, 789-793(1980);
J. Chem. Soc (B), 1970, S. 911-916;
C.A., 106, 95684v (1987);

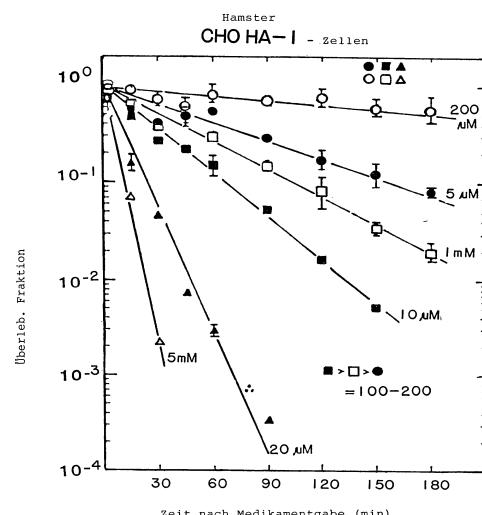
(54) Bezeichnung: **Verfahren zur selektiven Vernichtung von hypoxischen Tumorzellen**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel:



in der bei X = OH,
Y¹ und Y² jeweils unabhängig entweder Kohlenwasserstoffreste (C₃-C₁₄), einschließlich zyklische und ungesättigte Kohlenwasserstoffreste sind, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Carboxy-, Carbamyl- oder Alkylcarbamyl- Gruppe sind,
wobei die Alkylcarbamyl-Gruppe durch -C(O)NHR' mit R' enthaltend 1-4 Kohlenstoffatome und der Aminosubstituent der Amino- (einschließlich Morpholino-) Gruppe durch NH₂, NHR oder NR₂ definiert ist, wobei R jeweils unabhängig ein Alkyl mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder ein Morpholino-Anteil

ist und ferner substituiert sein kann mit 1-2 Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- oder Halogeno-Substituenten, und wobei die Kohlenwasserstoffreste fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen sind, oder in der Y¹ und Y² jeweils unabhängig entweder NHR¹, O(CO)R¹, NH(CO)R¹, O(SO)R¹ oder O(POR¹)R¹ sind, mit R¹ als Kohlenwasserstoffrest, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Carboxy-,...



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel nach Patentanspruch 1 zur selektiven Vernichtung von hypoxischen Tumorzellen.

[0002] Radiosensibilisatoren für hypoxische Zellen sind Verbindungen, die in selektiver Weise die Empfindlichkeit hypoxischer Zellen für zerstörende Strahlung erhöhen. Zytotoxine, die unter hypoxischen Bedingungen erhöhte Wirksamkeit aufweisen, bilden ebenfalls ein Mittel für die selektive Zerstörung von Zellen unter niedrigem Sauerstoffdruck. Diese Spezifität für hypoxische Zellen ist wichtig, weil gerade Tumoren durch solche Zellen gekennzeichnet sind. Praktisch alle Tumoren, die als feste Massen vorliegen, enthalten diese Zellen, wogegen normale Zellen im allgemeinen ausreichend mit Sauerstoff versorgt sind. Infolgedessen können tumorwidrige Mittel aufgrund hoher Wirksamkeit unter hypoxischen Bedingungen für Tumoren selektiv gemacht werden, und in Anwesenheit dieser Sensibilisatoren kann eine Strahlenbehandlung mit besserer Wirkung angewandt werden.

[0003] Selbstverständlich ist der Einsatz einer Strahlenbehandlung zur Vernichtung von Tumorzellen nur sinnvoll, wenn eine Schädigung des umgebenden normalen Gewebes minimiert bzw. vermieden werden kann. Die Auswirkungen der Strahlung werden durch die Anwesenheit von Sauerstoff verstärkt, und es ist gesichert, daß mit steigender Strahlungsdosis die Wirksamkeit hinsichtlich der Vernichtung von Zielzellen ganz dramatisch zunimmt, wenn Sauerstoff anwesend ist. Daher ist eine Selektivität für Tumorzellen in bezug auf Strahlung schwer zu erreichen; normale Zellen sind wegen ihrer Sauerstoffversorgung im allgemeinen empfänglicher für Strahlung als die Tumorzellen, die zu vernichten sind. Es ist also erwünscht, ein Mittel zur Sensibilisierung von Tumorzellen, jedoch nicht des umliegenden Gewebes, für eine Strahlenbehandlung anzugeben. Eine Lösung würde darin bestehen, die Sauerstoffzufuhr zu diesen Tumorzellen zu steigern. Dies hat sich jedoch als schwer durchführbar erwiesen.

[0004] Es wurden bereits die verschiedensten heterocyclischen Verbindungen, speziell solche mit oxidierten Stickstoffanteilen, für die Radiosensibilisierung hypoxischer Tumorzellen eingesetzt. Es wurde sogar behauptet, daß die Funktionalität des oxidierten Stickstoffs für diese Wirksamkeit verantwortlich ist. Nitroimidazole, insbesondere Misonidazol (MIS) und Metronidazol sind gründlich untersucht worden, und MIS wird üblicherweise als Standard bei In-vitro- und In-vivo-Tests auf eine Radiosensibilisierungs-Wirksamkeit eingesetzt (vgl. z. B. Asquith et al., Radiation Res (1974) 60:108-118; Hall et al., Brit J Cancer (1978) 37:567-569; Brown et al., Radiation Res (1980) 82:171-190; und US-PS 4 371 540). Die Radiosensibilisierungs-Wirksamkeiten bestimmter 1-substituierter 3(5)-Nitro-s-triazole und verschiedener Chinoxalin-1,4-dioxid-Derivate wurden ebenfalls beschrieben.

[0005] Ferner ist in den eigenen US-Patentanmeldungen Serial-Nr. 730 761 (3. Mai 1985) und Serial-Nr. 788 762 (18. Okt. 1985) eine Gruppe von Radiosensibilisatoren angegeben, die keinen oxidierten Stickstoff enthalten – die substituierten Benzamide und Nicotinamide und ihre Thio-Analoga. Diese Verbindungen sind trotzdem Radiosensibilisatoren. Es ist wichtig, die Fähigkeit zur selektiven Sensibilisierung hypoxischer Zellen, z. B. durch Erhöhung ihrer Sauerstoffversorgung, von einem anderen Mechanismus zu unterscheiden, der allgemein bei der "Sensibilisierung" von Zellen angetroffen wird, und zwar von der Inhibierung des Enzyms Poly(ADP-ribose)polymerase, von dem angenommen wird, daß es für die Reparatur bestrahlter Zellen nach der Bestrahlung wesentlich ist. Dieser Reparaturmechanismus ist in hypoxischen und in normalen Zellen wirksam. Daher wird durch die Verabreichung von "Radiosensibilisatoren", die nach diesem letztgenannten Mechanismus wirken, das gewünschte Ziel der selektiven Sensibilisierung von Zieltumorzellen nicht erreicht.

[0006] Eine Gruppe von Verbindungen, die bisher nicht für den Einsatz zur selektiven Vernichtung hypoxischer Zellen oder zur Radiosensibilisierung solcher Zellen vorgeschlagen wurde, umfaßt 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-di-N-oxid und verwandte Verbindungen. Die US-PS'en 3 980 779, 3 868 371 und 4 001 410 beschreiben die Herstellung einer Gruppe dieser Verbindungen und ihren Einsatz als Bakteriostatika, insbesondere bei Zugabe dieser Stoffe zu Viehfutter. Die US-PS'en 3 991 189 und 3 957 799 geben Derivate dieser Verbindungen an, die Substituenten am Stickstoff der 3-Aminogruppe aufweisen. Diese Verbindungen haben ebenfalls bakteriostatische Wirksamkeit.

[0007] Aus J. Am. Chem. Soc., 5. Juli 1954, Seiten 3551 bis 3553 ist ein 5,7-Dichloro-3-Amino-1,2,4-Benzotriazin-1-Oxid bekannt, allerdings nicht zur Radiosensibilisierung hypoxischer Zellen, sondern zur Behandlung von Malaria. Darüber hinaus offenbart die Zeitschrift Int. J. Radiat. Oncol., Biol., Phys., Vol.106, 1987, Seite 29, eine Benzotriazin-Di-N-Oxidverbindung (SR-4233) als Mittel zum Einsatz zur Vernichtung hypoxischer Zellen, jedoch ohne die Angabe weiterer vorteilhafter Ausgestaltungen dieser Verbindung zur Verwendung zur se-

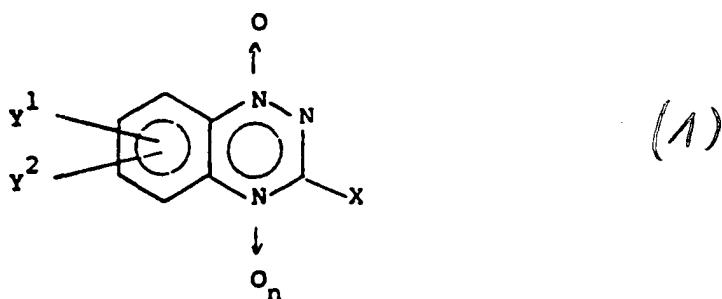
lektiven Vernichtung von hypoxischen Tumorzellen.

[0008] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt darin, ein vorteilhaftes Verfahren anzugeben, um Verbindungen mit verbesserter Wirksamkeit zur selektiven Vernichtung von hypoxischen Tumorzellen und zur verbesserten Radiosensibilisierung solcher Tumorzellen herzustellen.

[0009] Die Erfindung ist im Patentanspruch 1 gekennzeichnet.

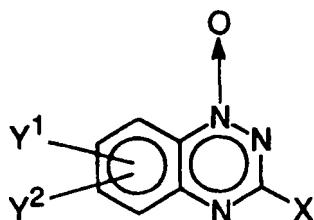
[0010] Die vorliegende Erfindung gibt weitere Verbindungen an, die spezifisch eine Radiosensibilisierung hypoxischer Zellen in vitro bewirken und die ferner für hypoxische Zellen sowohl in vitro als auch in vivo direkt zytotoxisch sind. Daher werden durch Verabreichung dieser Verbindungen vor oder nach einer Strahlenbehandlung von Tumoren diejenigen hypoxischen (Tumor)zellen, die die Strahlendosis überleben, selektiv vernichtet. Sowohl die Fähigkeit dieser Verbindungen zur Radiosensibilisierung hypoxischer Zellen in vitro als auch insbesondere ihre Fähigkeit zur direkten selektiven Vernichtung hypoxischer Zellen sind überraschende Eigenschaften dieser Verbindungen.

[0011] Die Erfindung liefert eine wertvolle Bereicherung der Gruppe von Verbindungen, die derzeit als selektive Radiosensibilisatoren und selektive zytotoxische Mittel für hypoxische Tumorzellen verfügbar sind. Einige der in dieser Beziehung nützlichen Verbindungen sind bekannt, andere sind neu. Ein Aspekt der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der folgenden Formel:



in der bei $X = \text{OH}$,

Y^1 und Y^2 jeweils unabhängig entweder Kohlenwasserstoffreste (C_3 - C_{14}), einschließlich zyklische und ungesättigte Kohlenwasserstoffreste sind, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Carboxy-, Carbamyl- oder Alkylcarbamyl-Gruppe sind, wobei die Alkylcarbamyl-Gruppe durch $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ mit R' enthaltend 1-4 Kohlenstoffatome und der Aminosubstituent der Amino- (einschließlich Morpholino-) Gruppe durch NH_2 , NHR oder NR_2 definiert ist, wobei R jeweils unabhängig ein Alkyl mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder ein Morpholino-Anteil ist und ferner substituiert sein kann mit 1-2 Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- oder Halogeno-Substituenten, und wobei die Kohlenwasserstoffreste fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen sind, oder in der Y^1 und Y^2 jeweils unabhängig entweder NHR^1 , $\text{O}(\text{CO})\text{R}^1$, $\text{NH}(\text{CO})\text{R}^1$, $\text{O}(\text{SO})\text{R}^1$ oder $\text{O}(\text{POR}')\text{R}^1$ sind, mit R^1 als Kohlenwasserstoffrest, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Carboxy-, Carbamyl- oder Alkylcarbamyl- Gruppe sind, wobei die Alkylcarbamyl-Gruppe durch $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ mit R' enthaltend 1-4 Kohlenstoffatome definiert ist und wobei der Kohlenwasserstoffrest fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen ist; oder in der Y^1 und Y^2 jeweils unabhängig gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffreste mit zwischen 7 und 14 Kohlenstoffatomen oder ungesättigte Kohlenwasserstoffreste mit zwischen 1 und 6 Kohlenstoffatomen sind, wobei jeder Kohlenwasserstoffrest-Substituent unsubstituiert oder substituiert ist mit einer Halogen-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, oder Morpholino-Gruppe, und wobei der Kohlenwasserstoffrest fakultativ von einer einzelnen Etherbindung unterbrochen ist, durch Umsetzen des entsprechenden 3-Amino-1-Oxid-Derivats mit der Formel



mit $\text{X}=\text{NH}_2$ und Hydrogenperoxid in Anwesenheit von $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bei einer Temperatur von wenigstens 50

°C.

[0012] Die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen sind daher die Mono- oder Dioxide von fakultativ substituiertem 1,2,4-Benzotriazin, die eine entweder substituierte oder unsubstituierte Hydroxyl- oder Aminogruppe in der dritten Stellung aufweisen. Es sind zwar sämtliche durch die Formel (1) definierten Verbindungen allemein als Radiosensibilisatoren wirksam, aber nur diejenigen Verbindungen, die einen 3-Aminosubstituenten (d.h. $X=NH_2$, NHR oder NR_2 , wobei R der obigen Definition entspricht) aufweisen und die Di-N-oxide ($n = 1$) sind, sind wirksame zytoxische Mittel.

[0013] Bestimmte Verbindungen, die von der Formel (1) mit umfaßt sind, sind bereits als für andere Zwecke brauchbar bekannt; andere sind dagegen neu. Die neuen Verbindungen, die mit den hier angegebenen Verfahren herstellbar sind, umfassen durch die obige Formel dargestellte Verbindungen in den drei folgenden Klassen: I. $X = OH$, OR oder NH_2 , wobei R der obigen Definition entspricht; II. $X = NH_2$ oder NHR , wobei R der obigen Definition entspricht, $n = O$, und Y^1 und Y^2 der obigen Definition entsprechen; III. $X = NH_2$, $n = 1$, und Y^1 und Y^2 entsprechen der obigen Definition, sind jedoch nicht eine Halogengruppe, gesättigtes Alkyl (1-6C) in nichtsubstituierter oder halogensubstituierter Form, Alkoxy (1-6C), Carbamyl, Carboxy oder Carboalkoxy (1-6C).

[0014] Anhand der Zeichnung wird die Erfindung beispielsweise näher erläutert. Es zeigen:

[0015] **Fig. 1A,**

[0016] **Fig. 1B, 1C** die selektive Zytotoxizität von 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid für hypoxische Zellen von Hamster-, Mäuse- und Humangewebe;

[0017] **Fig. 2** die In-vivo-Wirksamkeit von 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid bei der verstärkten Vernichtung von Tumorzellen in Verbindung mit Strahlung; und

[0018] **Fig. 3** die Vernichtung von Tumorzellen in vivo durch 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid, nachdem der Tumor durch die intraperitoneale Verabreichung des Antihypertonikums Hydralazin hypoxisch gemacht worden war.

A. Die für die Erfindung nützlichen Verbindungen

[0019] Die für die Radiosensibilisierung hypoxischer Tumorzellen brauchbaren Verbindungen sind Derivate von 1,2,4-Benzotriazinoxid.

[0020] Die durch Y^1 oder Y^2 wiedergegebene Hydrocarbylgruppe kann 1-14 Kohlenstoffatome enthalten, sie kann gesättigt oder ungesättigt, cyclisch oder acyclisch und fakultativ von einer einzelnen Etherbindung unterbrochen sein. So kann die unsubstituierte Form von Y^1 oder Y^2 z. B. Methyl, Ethyl, n-Propyl, s-Butyl, n-Hexyl, 2-Methyl-n-pentyl, 2-Ethoxyethyl, 3-(n-Propoxy)n-propyl, 4-Methoxybutyl, Cyclohexyl, Tetrahydrofuryl, Cyclohexenyl, 3-(n-Decyloxy)n-propyl, 4-Methyloctyl, 4,7-Dimethyloctyl u. dgl. sein.

[0021] Das Hydrocarbyl kann mit einem oder zwei Substituenten wie folgt substituiert sein: Die Halogeno-Substituenten sind Fluoro-, Chlоро-, Bromo- oder Iodo-Reste. Die durch OR' repräsentierten Alkoxy-substituenten können 1-4 Kohlenstoffatome enthalten und z. B. Methoxy, n-Propoxy und t-Butoxy umfassen. Der Aminosubstituent kann NH_2 , NHR oder NR_2 sein, wobei R jeweils unabhängig ein Alkyl mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder ein Morpholino-Anteil ist. R kann fakultativ mit 1-2 Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- oder Halogeno-Substituenten substituiert sein.

[0022] Die Acyloxy- und Acylamidogruppen sind durch $R'COO-$ und $R'CONH-$ repräsentiert, wobei R' 1-4 Kohlenstoffatome enthält, und ihre Thioanaloga sind durch $R'CSO-$ und $R'CSNH-$ repräsentiert. Alkylsulfonyl und Alkylphosphonyl sind $R'SO_2$ bzw. $R'P(OR')O-$, wobei R' jeweils unabhängig wie oben definiert ist. Carboxy ist die Gruppe $-C(O)OH$; Alkoxy carbonyl ist $-C(O)OR'$; Carbamyl ist $-C(O)NH_2$; und Alkylcarbamyl ist $-C(O)NHR'$.

[0023] Wenn $X = OH$, können die Verbindungen natürlich auch als die pharmazeutisch annehmbaren Salze hergestellt werden, die aus anorganischen Basen wie Natrium-, Kalium- oder Calciumhydroxid oder aus organischen Basen wie Coffein, Ethylamin oder Lysin gebildet werden.

[0024] Wenn X = NH₂, können pharmazeutisch annehmbare Säureadditionssalze eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um Salze mit anorganischen Säuren wie Chlorwasserstoff-, Bromwasserstoff- oder Phosphorsäure oder mit organischen Säuren wie Essig-, Brenztrauben-, Bernstein-, Mandel-, p-Toluol-sulfonsäure etc. (Aminosubstituenten an der Hydrocarbyl-Seitenkette können natürlich ebenfalls zu Salzen umgesetzt werden.)

[0025] Das 1,2,4-Benzotriazin kann als Mono- oder Dioxid eingesetzt werden. Es kann entweder der 1-Stickstoff- oder der Triazinring oxidiert werden, oder es können sowohl der 1 – als auch der 4-Stickstoff oxidiert werden.

[0026] Spezielle besonders bevorzugte Verbindungen, die für die Radiosensibilisierungs- und zytotoxischen Verfahren nach der Erfindung einsetzbar sind, umfassen

3-Hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

3-Hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Methoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-Methoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Methoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-Methoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Ethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-Ethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Ethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-Ethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[4-Acetamido-n-butanoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[4-Acetamido-n-butanoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[Acetamido-n-butanoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[4-Acetamido-n-butanoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[1-(2,3-Dihydroxy)propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[1-(2,3-Dihydroxy)propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[1-(2,3-Dihydroxy)propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[1-(2,3-Dihydroxy)propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Furyl)methylamino]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Furyl)methylamino]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Furyl)methylamino]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Furyl)methylamino]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-(2-Methoxyethylamino)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-(2-Methoxyethylamino)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-(2-Methoxyethylamino)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-(2-Methoxyethylamino)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Carbethoxymethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid; 6(7)-Carbethoxymethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-Carbethoxymethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-Carbethoxymethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Methoxyethyl)carbamylmethoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Methoxyethyl)carbamylmethoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Methoxyethyl)carbamylmethoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Methoxyethyl)carbamylmethoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Hydroxyethyl)carbamylmethoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Hydroxyethyl)carbamylmethoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[(2-Hydroxyethyl)carbamylmethoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[(2-Hydroxyethyl)carbamylmethoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-dioxid;

6(7)-[1-(2-Hydroxy-3-morpholino)propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[1-(2-Hydroxy-3-morpholino)propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

6(7)-[1-(2-Hydroxy-3-morpholino)propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[1-(2-Hydroxy-3-morpholino)propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-dioxid;

6(7)-[3-Amino-n-propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[3-Amino-n-propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-dioxid;

6(7)-[3-Amino-n-propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[3-Amino-n-propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-dioxid;

6(7)-[2,3-Epoxypropoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

6(7)-[2,3-Epoxypropoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[2,3-Epoxypropoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[2,3-Epoxypropoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[3-Methoxy-2-hydroxy-n-propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[3-Methoxy-2-hydroxy-n-propoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[3-Methoxy-2-hydroxy-n-propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[3-Methoxy-2-hydroxy-n-propoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[4-Ethoxy-3-hydroxy-n-butoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[4-Ethoxy-3-hydroxy-n-butoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[4-Ethoxy-3-hydroxy-n-butoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[4-Ethoxy-3-hydroxy-n-butoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[3,4-Dihydroxy-n-butoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[3,4-Dihydroxy-n-butoxy]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[3,4-Dihydroxy-n-butoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[3,4-Dihydroxy-n-butoxy]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Methyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Methyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Methyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Methyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Ethyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Ethyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Ethyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Ethyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Chloracetamido-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Chloracetamido-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Chloracetamido-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Chloracetamido-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[(2-Hydroxyethoxy)acetamido]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[(2-Hydroxyethoxy)acetamido]3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-[(2-Hydroxyethoxy)acetamido]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-[(2-Hydroxyethoxy)acetamido]3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6,7-Dimethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6,7-Dimethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6,7-Dimethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6,7-Dimethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6,7-Diethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6,7-Diethoxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6,7-Diethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6,7-Diethoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Propionyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Propionyl-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Propionyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Propionyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-(2-Acetoxyethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-(2-Acetoxyethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-(2-Acetoxyethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-(2-Acetoxyethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)n-Hexyloxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)n-Hexyloxy-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)n-Hexyloxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)n-Hexyloxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Ethylamino-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Ethylamino-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-Ethylamino-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-Ethylamino-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-(2-Methoxyethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-(2-Methoxyethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-(2-Methoxyethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
6(7)-(2-Methoxyethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
6(7)-(Aminoacetamido)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;

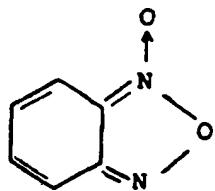
6(7)-(Aminoacetamido)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
 6(7)-(Aminoacetamido)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
 6(7)-(Aminoacetamido)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
 6(7)-(Carbamylmethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
 6(7)-(Carbamylmethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
 6(7)-(Carbamylmethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
 6(7)-(Carbamylmethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
 6(7)-(Carboxymethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
 6(7)-(Carboxymethoxy)3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;
 6(7)-(Carboxymethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid;
 6(7)-(Carboxymethoxy)3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid;

und ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze sowie die Thioamid-Analoga der vorstehenden Liste von Verbindungen. Es ist zu beachten, daß die genannten "Y¹- oder Y²-Substituenten, die in den meisten der vorgenannten Verbindungen entweder in der Stellung 6 oder der Stellung 7 (mit "6(7)" bezeichnet) oder in der Stellung 6 und der Stellung 7 (mit "6,7" bezeichnet) vorhanden sind, auch in der Ringstellung 5 und/oder 8 vorliegen können.

[0027] Von den oben aufgeführten Verbindungen, die bei dem Verfahren nach der Erfindung als selektive zytotoxische Mittel oder als Radiosensibilisatoren nützlich sind, sind die folgenden neu: durch die obige Formel dargestellte Verbindungen, bei denen I. X = OH, OR oder NR₂, wobei R jeweils unabhängig ein Alkylanteil mit 1-4 Kohlenstoffatomen, ein Amidanteil oder ein Morpholino-Anteil ist und ferner mit Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- oder Halogeno-Substituenten substituiert sein kann, n = 0 oder 1 und Y¹ und Y² jeweils unabhängig entweder H, ein Halogen-Rest, Hydrocarbyl (1-4C) einschließlich ungesättigtes und cyclisches Hydrocarbyl, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Alkoxy-, Alkylthio-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Acyloxy-, Acylamido-Gruppe oder deren Thio-Analoga sind, Alkylsulfonyl, Alkylphosphonyl, Carboxy, Alkoxy carbonyl, Carbamyl oder Alkylcarbamyl sind, und wobei die Hydrocarbylgruppe fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen sein kann, oder wobei Y¹ und Y² jeweils unabhängig NHR', O(CO)R', NH(CO)R', O(SO)R' oder O(POR)R' ist, wobei R' eine Hydrocarbylgruppe ist, die fakultativ wie oben definiert substituiert ist; II. X = NH₂, n = 1 und Y¹ sowie Y² jeweils unabhängig wie in I. definiert sind; III. X = NH₂, n = 1 und Y¹ sowie Y² jeweils unabhängig H, Hydrocarbyl (7-14C; gesättigt oder ungesättigt), ungesättigtes Hydrocarbyl (1-6C), wobei jeder Hydrocarbyl-Substituent unsubstituiert oder substituiert ist mit Halogen, Hydroxy, Epoxy, Alkoxy, Alkylthio, Amino (einschließlich Morpholino), Acyloxy, Acylamido und deren Thio-Analoga, Alkylsulfonyl oder Alkylphosphonyl, und wobei die Hydrocarbylgruppe fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen sein kann, oder wobei Y¹ und Y² jeweils unabhängig NHR', O(CO)R', NH(CO)R', O(SO)R' oder O(POR)R' sind, wobei R' eine Hydrocarbylgruppe ist, die wie oben definiert substituiert ist.

B. Herstellung der Verbindungen nach der Erfindung

[0028] Allgemeine Verfahren zur Herstellung einiger 3-Amino-Derivate finden sich in den vorgenannten US-PS'en von Ley et al., z. B. US-PS 3 980 779. Die Verbindungen werden hergestellt aus Benzofuran der Formel:



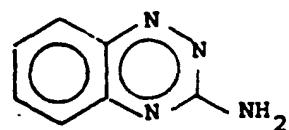
durch Umsetzung mit einem Cyanamidsalz, gefolgt von Ansäuerung des Reaktionsgemischs. Das Benzofuran-Ausgangsmaterial ist nicht symmetrisch in bezug auf seine eigenen Stellungen 5 und 6 (die die Stellungen 6 und 7 des resultierenden 3-Aminobenzotriazinoids sind). Daher kann ein Gemisch der 6- und 7-substituierten Stoffe resultieren. Erwünschtenfalls kann dieses Gemisch unter Anwendung konventioneller Mittel in Einzelkomponenten aufgetrennt werden, die einen Substituenten in der Stellung 6 oder 7 haben.

[0029] Das Dioxid kann ebenfalls aus dem Stamm-Monoxid durch Persäure-Oxidation hergestellt werden (vgl. Robbins et al., J Chem Soc 3186 (1975) und Mason et al., J Chem Soc B 911 (1970)).

[0030] Ferner kann das Monoxid hergestellt werden durch:

- (1) Cyclisierung einer 1-Nitro-2-aminobenzolverbindung unter Einsatz von H₂NCN;

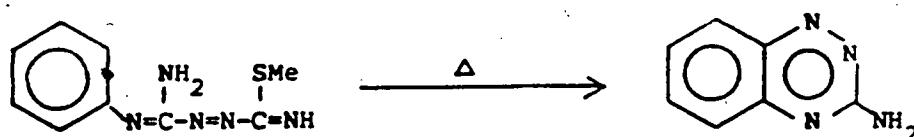
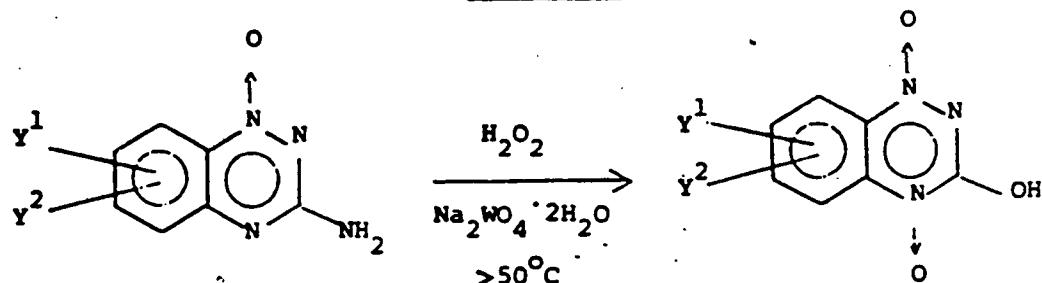
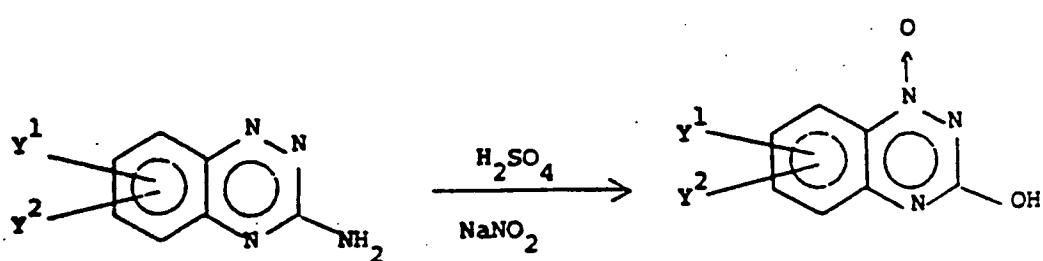
(2) Oxidation der durch die Strukturformel



gegebenen Stammverbindung oder kontrollierte Reduktion des entsprechenden Dioxids (vgl. Mason, wie oben, und Wolf et al., J Am Chem Soc 76:355 (1954)).

[0031] 3-Amino-1,2,4-benzotriazine können entweder durch Cyclisierung einer Stammverbindung (vgl. Schema I und Arndt, Chem Ber. 3522 (1913)) oder durch Reduktion des Monoxids oder Dioxids wie oben angegeben erhalten werden.

[0032] Die 3-Hydroxy-1,2,4-benzotriazinoxide können hergestellt werden unter Einsatz von Peroxid und Wolf-ramoxid (Schema II), ein neues Syntheseverfahren zur Herstellung der 3-Hydroxy-1,4-dioxid-Verbindung oder konzentrierte Schwefelsäure und Natriumnitrat (Schema III).

**Scheme I****Scheme II****Scheme III**

C. Formulierung und Verabreichung

[0033] Wie nachstehend aufgezeigt, können die oxidierten Benzotriazine eingesetzt werden, um hypoxische Tumorzellen in warmblütigen Trägern zu radiosensibilisieren bzw. selektiv zu vernichten. Eine Einsatzmöglichkeit ist in Verbindung mit Mitteln, von denen bekannt ist, daß sie selektiv Hypoxie in Tumoren erzeugen. Solche Verfahren umfassen den Einsatz von Antihypertonika wie Hydralazin oder von Mitteln, die die vom Blut mitgeführte Sauerstoffmenge beeinflussen. Diese Verbindungen werden zwar charakteristisch für die Krebsbehandlung beim Menschen eingesetzt, sie können aber auch zur Vernichtung von Tumorzellen in anderen warmblütigen tierischen Spezies wie anderen Primaten, in der landwirtschaftlichen Tierhaltung z. B. bei Rindern, sowie

bei für den Sport gebrauchten Tieren und Haustieren, z. B. Pferden, Hunden und Katzen, eingesetzt werden.

[0034] Man nimmt an, daß Hypoxie mit allen Arten fester bösartiger Tumoren einhergeht. Die Verbindungen nach der Erfindung können daher zur Radiosensibilisierung oder Vernichtung neoplastischer Epithelzellen, endothelialer Zellen, Bindegewebs-, Knochen-, Muskel-, Nerven- und Gehirnzellen eingesetzt werden. Beispiele von Tumoren und Sarkomen umfassen Tumoren wie solche von Epithel-, azidischen, Nischen-, Basal-, Basalschuppenzellen, Zervikal-, Nieren-, Lebertumoren, Hurthle-, Lucke-Tumoren, muzinöse und Walker-Tumoren, und Sarkome wie Abernathy-Sarkom, Sarkom des weichen Nischenzellenteils, Angiolith-, Botryoid-, Hirngewebe-Sarkom, Sarkom des Stützgewebes der Gebärmutterhaut, faszikuläres Ewing-Sarkom, Riesenzellen-, Lympho-, Jensen-Sarkom, Knochenrinden-, Kaposi-, Knochenmark- und Synovial-Sarkom. Spezielle Beispiele von Tumoren, die mit anderen Radiosensibilisatoren sensibilisiert wurden, sind von G. E. Adams in Cancer: A Comprehensive Treatise (Verlag F. Becker), Bd. 6, S. 181-223, Plenum, New York, 1977, angegeben worden.

[0035] Die Verbindungen können Patienten oral oder parenteral (intravenös, subkutan, intramuskulär, intraspinal, intraperitoneal u. dgl.) verabreicht werden. Wenn die Verbindungen parenteral gegeben werden, werden sie normalerweise in als Dosiseinheit injizierbarer Form (als Lösung, Suspension, Emulsion) mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger formuliert. Solche Träger sind typischerweise nichttoxisch und nichttherapeutisch. Beispiele für solche Träger sind Wasser, wässrige Träger wie Kochsalz-, Ringer-, Dextrose- und Hanksche Lösung sowie nichtwässrige Träger wie Fettöle (z. B. Mais-, Baumawollsaat-, Erdnuß- und Sesamöl), Ethyloleat und Isopropylmyristat. Sterile Kochsalzlösung ist ein bevorzugter Träger, und die Verbindungen sind hinreichend wasserlöslich, um eine Lösung für alle vorhersehbaren Bedürfnisse herstellen zu können. Der Träger kann geringe Mengen Zusatzstoffe enthalten, z. B. Stoffe, die die Löslichkeit, die Isotonizität und die chemische Stabilität verbessern, etwa Antioxidantien, Puffer und Konservierungsmittel. Wenn die Verbindungen oral (oder rektal) verabreicht werden, werden sie normalerweise in Form von Dosiseinheiten wie Tabletten, Dragees, Suppositorien oder Kapseln formuliert. Solche Formulierungen enthalten typischerweise einen festen, halbfesten oder flüssigen Träger oder ein solches Verdünnungsmittel. Beispiele für Verdünnungsmittel sind Lactose, Dextrose, Saccharose, Sorbitol, Mannitol, Stärken, Akaciengummi, Calciumphosphat, Mineralöl, Gelatine, Syrup, Methylcellulose, Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, Methylhydroxybenzoat, Propylhydroxybenzoat, Talkum und Magnesiumstearat.

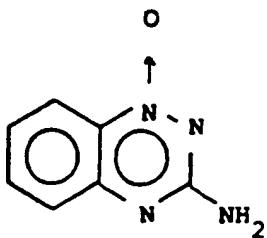
[0036] Die dem Patienten verabreichte Menge der Verbindung ist ausreichend, um den zu behandelnden malignen Tumor zu radiosensibilisieren oder Zytotoxizität in ihm zu erzeugen, liegt aber unter der Menge, bei der toxische Effekte auftreten könnten. Diese Menge hängt von der Art des Tumors, der Spezies des zu behandelnden Lebewesens, der beabsichtigten Indikationsdosis und dem Gewicht oder der Körperoberfläche des Patienten ab. Die Strahlung kann an Humanpatienten in vielen unterschiedlichen Fraktionierungseinheiten verabreicht werden, d. h. die Gesamtstrahlungsdosis wird in Anteilen über einen Zeitraum von einigen Tagen bis zu einigen Wochen verabreicht. Diese Einheiten ändern sich üblicherweise von einer Dosis täglich (d. h. fünfmal pro Woche) über einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen bis zu einmal wöchentlich über vier bis sechs Wochen. Eine Einzeldosis des Benzotriazins wird vor oder nach jeder Strahlenbehandlung verabreicht und liegt etwa im Bereich von 0,01 bis 20 m mol/kg, normalerweise im Bereich von 0,1-2 mmol/kg.

[0037] Zur Verwendung als selektive zytotoxische Mittel können die Verbindungen nach der Erfindung entweder für sich, zusammen mit Strahlung oder anderen krebszellenschädigenden Mitteln, mit gefäßwirksamen Medikamenten (z. B. Hydralazin) oder in Verbindung mit Prozessen, die die Menge des vom Blut transportierten verfügbaren Sauerstoffs verringern, z. B.

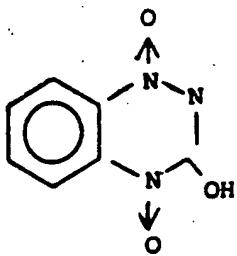
[0038] Anämie, oder mit Medikamenten, die die Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin steigern, eingesetzt werden, wobei alle diese Verfahren selektiv den Grad der Hypoxie im Tumor erhöhen. Wie bereits erwähnt, sind zwar sämtliche von der Formel 1 umfaßten Verbindungen allgemein als Radiosensibilisatoren wirksam, aber als selektive zytotoxische Mittel sind nur diejenigen Verbindungen wirksam, die (substituierte oder unsubstituierte) 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioide (d. h. $X=NH_2$, NHR oder NR_2 , wobei R wie oben definiert ist und $n = 1$) sind.

[0039] Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

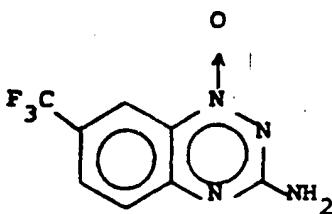
Beispiel 1: Herstellung von 3-Hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid

1

[0040] Ein gerührtes Gemisch aus 1,50 g (9,25 mmol) 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid (1), 100,0 ml Essigsäure und 30,0 ml 30 % Wasserstoffperoxid wurde mit 3,05 g (9,25 mmol) $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ aufbereitet. Das Gemisch wurde in einem Ölbad bei 60 °C für 4 Tage gerührt. Das orange-gelbliche Gemisch wurde auf ca. 30° abgekühlt und filtriert unter Abtrennung eines hellgelben nicht-UV-absorbierenden Feststoffs, der wahrscheinlich gelbe Wolframsäure war. Die orangefarbene Wasserstoffperoxidlösung in Essigsäure wurde sorgfältig bis zur Halbtrockenheit verdampft unter mehrfacher Zugabe von Wasser und Essigsäure, so daß der größte Teil des Peroxids entfernt wurde. Die eingeengte Lösung wurde bei Raumtemperatur stehengelassen und ergab vier Ernten eines orangefarbenen Feststoffs, 0,87 g (42 % Ausbeute des Natriumsalzes von (2)). UV_{max} (20 % $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$): 262,2 (ϵ 39.460); 477 (ϵ 7.030). IR (rein): 3530 μ , 3150 μ , 2650 μ , 2180 μ und 1635 μ . Analyse (errechnet für das Natriumsalz): $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$ 1,25 H_2O , 223,64: C 37,6; H 2,93; N 18,79. Gefunden: C 37,8; H 2,75; N 18,65.

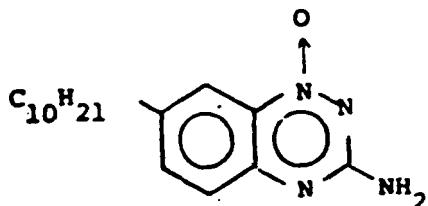
2

Beispiel 2: Herstellung von 3-Amino-7-trifluoromethyl-1,2,4-benzotriazin-1-oxid

3

[0041] Eine Lösung aus Na (1,13 g, 49,2 mmol) in Ethanol (50 ml) wurde einer Lösung aus Guanidinhydrochlorid (4,93 g, 51,6 mmol) in Ethanol (50 ml) zugefügt. Nach 1 h wurde das Gemisch filtriert, und das Filtrat wurde einer Lösung aus 4-Chloro-3-nitro-benzotrifluorid (Aldrich, 5,5 g, 24,4 mmol) in Ethanol (25 ml) zugefügt. Das Gemisch wurde für 5 h gerührt und unter Rückflußkühlung erhitzt, auf 0-5 °C abgekühlt, und der ausgefällte Feststoff wurde aufgefangen. Der Feststoff wurde mit Wasser und Ethanol gewaschen und luftgetrocknet unter Erhalt von 0,48 g (9 %) von 3 als hellgelber Feststoff, Schmelzpunkt 300 °C. TLC: R_f 0,60 (9:1 Methylenchlorid : Methanol auf Silikagelplatten). Massenspektroskopie: $M^+ = 230$ ($q = 100$).

Beispiel 3: Herstellung von 3-Amino-7-decyl-1,2,4-benzotriazin-1-oxid

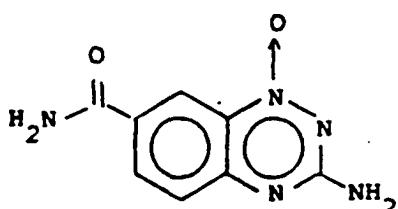
**4****[0042]** Herstellung von 4-(1-Decyl)2-nitroanilin;

Essigsäureanhydrid (400 ml) wurde über einen Zeitraum von 30 min einer gerührten Lösung aus 4-Decylanilin (Aldrich, 80 g, 0,34 mol) in Hexanen (2,41) zugefügt. Nach Röhren während 1 h wurde das Gemisch abgekühlt und während 30 min bei 5-10 °C mit 70 % Salpetersäure (34 ml) behandelt. Röhren wurde bei 5-10 °C für 1 h und bei 25 °C für 16 h fortgesetzt. Das Gemisch wurde mit H₂O (1 l) verdünnt, für 5 h gerührt, in ein offenes Gefäß gegossen und für 16 h stehengelassen. Nach weiterer Verdünnung mit N₂O (1,5 l) wurde der Feststoff aus einer 85 % Ethanollösung (in Wasser) aufgefangen und rekristallisiert unter Erhalt von 92 g (84 %) des Zwischenprodukts als orangefarbener Feststoff, Schmelzpunkt 64 °C.

[0043] Eine Lösung (100 ml) aus 85 % ROH (19 g, 0,288 mol) in H₂O wurde mit einer Suspension aus dem oben hergestellten 4-(1-Decyl)2-nitroanilin (89 g, 0,28 mol) in Methanol (900 ml) kombiniert. Das Gemisch wurde für 6 h gerührt, auf einen pH-Wert von 7-8 mit konzentrierter HCl neutralisiert und im Vakuum zur Beinahe-trockenheit verdampft. Nach Verdünnung mit H₂O (400 ml) wurde der Feststoff aufgefangen und luftgetrocknet unter Erhalt von 77 g (100 %) des Zwischenprodukts als orangefarbener Feststoff, Schmelzpunkt 59 °C.

[0044] 1,0 g (8,7 mmol) Chloramidinhydrochlorid (das vorher zum Einsatz hergestellt wurde durch Behandeln einer Etherlösung von Cyanamid mit HCl-Gas und Auffangen des ausgefällten Feststoffs) wurde portionsweise während 10 min einer vorerwärmten Schmelze (190 °C) von 4-(1-Decyl)2-nitroanilin, das im vorhergehenden Schritt hergestellt worden war (500 mg, 1,8 mmol), zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei 190 °C erhitzt, auf 25 °C abgekühlt, mit 6N KOH (10 ml) behandelt und für 1 h bei 90-95 °C erwärmt. Nach Abkühlung auf 25 °C wurde der Feststoff aufgefangen, mit H₂O und Ethanol gewaschen und luftgetrocknet unter Erhalt von 0,25 g (46 %) der Verbindung 4 in Form eines hellgelben Feststoffs; Schmelzpunkt 177 °C (dec.), Massenspektrometrie: M⁺ = 285 (q = 100), 302 (q = 13).

Beispiel 4: Herstellung von 3-Amino-7-carbamyl-1,2,4-benzotriazin-1-oxid

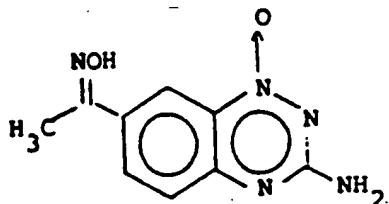
**5****[0045]** Herstellung von 4-Chloro-3-nitrobenzamid:

20,2 g (0,1 mol) 4-Chloro-3-nitrobenzoësäure (Aldrich) und Thionylchlorid (20 ml) wurden kombiniert, für 16 h stehengelassen und unter Rückflußkühlung für 4 h erwärmt unter Bildung einer klar-roten Lösung. Die Lösung wurde im Vakuum verdampft und mit Benzol azeotropisch gemacht. Der Rückstand wurde in Acetonitril (20 ml) gelöst und über einen Zeitraum von 30 min kaltem (-10 °C) konzentriertem Ammoniumhydroxid (100 ml) zugefügt. Nach 3 h bei -10 °C und 16 h bei 25 °C wurde das Gemisch in ein offenes Gefäß gegossen und konnte bis zur Trockenheit verdampfen. Der Rückstand wurde in H₂O aufgeschlämmt, und der Feststoff wurde aufgefangen und luftgetrocknet unter Erhalt von 19,8 g (98 %) des Zwischenprodukts in Form eines hellgelben Feststoffs, Schmelzpunkt 153 °C.

[0046] Eine Lösung aus Na (3,45 g, 0,15 mol) in Ethanol (75 ml) wurde einer Lösung aus Guanidinhydrochlorid (15,8 g, 0,165 mol) in Ethanol (75 ml) zugefügt. Nach 1 h wurde das Gemisch filtriert, und das Filtrat wurde

mit einer Suspension aus 4-Chloro-3-nitrobenzamid (10 g, 0,05 mol), das wie oben hergestellt war, in Ethanol (50 ml) kombiniert. Das Gemisch wurde über einen Zeitraum von 16 h gerührt und unter Rückflußkühlung erhitzt, auf 0-5 °C abgekühlt und mit konzentriertem HCl (8 ml) angesäuert. Der aufgefangene Feststoff wurde mit K_2CO_3 (28 g, 9,2 mol) und H_2O (40 ml) zusammengegeben und das Gemisch für 8 h gerührt und auf 100 °C erwärmt. Nach Abkühlung auf 25 °C wurde der Feststoff aufgefangen, mit H_2O gewaschen und luftgetrocknet. Der Feststoff wurde in siedendem Ethylacetat suspendiert, aufgefangen und mit heißem Ethylacetat gewaschen. Der Feststoff wurde wiederholt in siedendem Dioxan suspendiert und aufgefangen (6 × 100 ml). Das kombinierte Filtrat wurde im Vakuum zu einem Feststoff verdampft. Der Feststoff wurde in 95 % Ethanol suspendiert, aufgefangen und luftgetrocknet unter Erhalt von 0,44 g (4,3 %) der Verbindung 5 als hellgelber Feststoff, Schmelzpunkt 300 °C. TLC: R_f = 0,23 (Methylenchlorid : Aceton 2:1. Silikagelplatten); Massenspektrometrie: $M^+ = 205$ (q = 100).

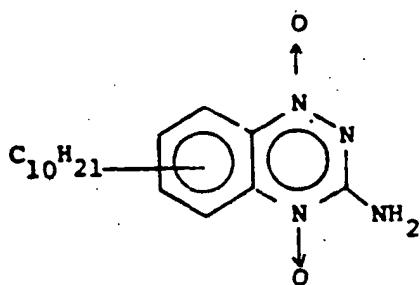
Beispiel 5: Herstellung von 7-Acetyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid-Oxim



6

[0047] Ein kombiniertes Gemisch aus 7-Acetyl-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid (hergestellt in Beispiel 5; 50 mg, 0,25 mmol), Hydroxylaminhydrochlorid (200 mg, 2,88 mmol), Pyridin (1 ml) und Ethanol (1 ml) wurde für 1 h bei 90-95 °C erwärmt und dann auf 25 °C abgekühlt. Das Gemisch wurde mit 95 % Ethanol (5 ml) verdünnt, und der Feststoff wurde aufgefangen und luftgetrocknet unter Erhalt von 30 mg (56 %) einer Verbindung 6 in Form eines hellgelben Feststoffs, Schmelzpunkt 278 °C (dec.). TLC: R_f = 0,60 (9:1 Methylenchlorid:Meethanol); Massenspektrometrie: $M^+ = 219$ (q = 100).

Beispiel 6: Herstellung von 3-Amino-6(7)-decyl-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid

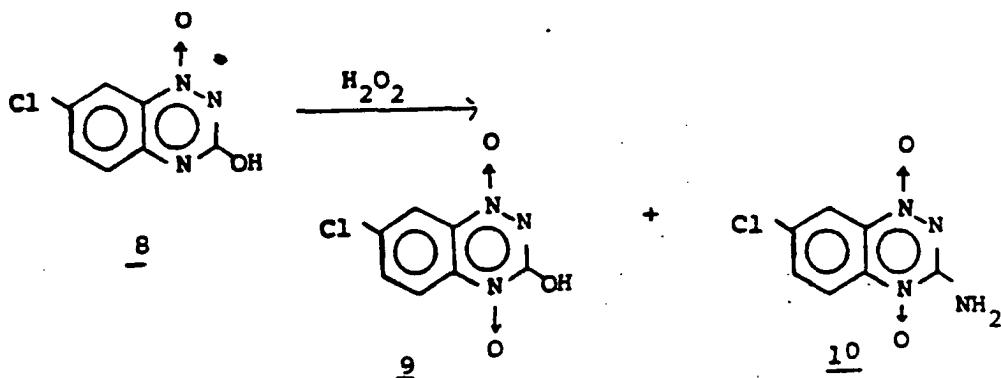


7

[0048] 5-(1-Decyl)benzofuroxan: Ein kombiniertes Gemisch aus 4-(1-Decyl)2-nitroanilin (77 g, 0,28 mol), 5,25 % NaOCl in H_2O (476 g, 0,34 mol), 85 % ROH (20,3 g, 0,31 mol), Bn_4NHSO_4 (4,7 g, 0,014 mol) und CH_2Cl_2 (2,28 l) wurde für 6 h sehr schnell gerührt und mit H_2O (500 ml) und CH_2Cl_2 (1 l) verdünnt. Die abgetrennte organische Phase wurde nacheinander mit 1N HCl (1 l) und Sole (2 × 1 l) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum eingeengt unter Erhalt von 70 g (92 %) eines roten Öls.

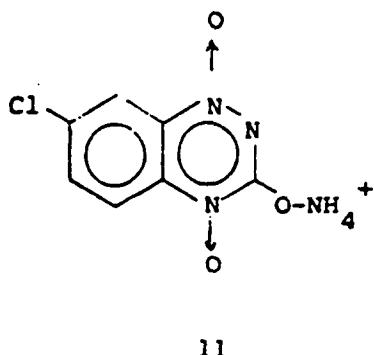
[0049] Eine Lösung aus 5-(1-Decyl)benzofuroxan, das wie oben angegeben hergestellt war (10 g, 0,036 mol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (0,36 g, 0,0016 mol) in DMSO (180 ml) wurde über einen Zeitraum von mehreren Stunden allmählich mit Cyanamid (13,0 g, 0,31 mol) und K_2CO_3 (36,8 g, 0,27 mol) behandelt. Das Gemisch wurde für 48 h gerührt und dann filtriert. Das Filtrat wurde mit H_2O (6 l) und Eisessig (40 ml) verdünnt und mit CH_2Cl_2 (4 × 500 ml) extrahiert. Die kombinierte organische Lösung wurde nacheinander mit 5 % $NaHCO_3$ -Lösung (1 × 500 ml) und Sole (2 × 500 ml) gewaschen, getrocknet (Na_2SO_4) und im Vakuum bis zur Trockenheit verdampft. Das Rohprodukt wurde durch Chromatografie auf Silikagel unter Verwendung von CH_2Cl_2 :Meethanol (98:2) gereinigt unter Erhalt von 1,8 g (16 %) von Verbindung 7 als roter Feststoff, Schmelzpunkt 155 °C (dec.). Massenspektrometrie: $M^+ = 318$ (q = 4), 285 (q = 100).

Beispiel 7: Herstellung von 7-Chloro-3-hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid



[0050] Ein Gemisch aus 1,50 g (7,63 mmol) der Verbindung 8 in 100 ml Essigsäure wurde mit 2,52 g (7,63 mmol) $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und 30 ml 30 % H_2O_2 behandelt. Das Gemisch wurde für die Dauer von 6 Tagen gerührt und auf 50 °C erwärmt und dann langsam bis zur Trockenheit verdampft unter Abtrennung des H_2O_2 . Der Rückstand wurde in 250 ml H_2O zum Sieden gebracht und filtriert unter Abtrennung von ca. 25 mg des Ausgangsmaterials 8. Die wässrigen Lösungen wurden dann mit 2 × 250-ml-Portionen Ethylacetat extrahiert. Ein tiefrotes kristallines Material, das durch TLC und Massenspektralanalyse als Verbindung 10 charakterisiert wurde, bildete sich in dem obigen Trengemisch und wurde durch Filtration aufgefangen unter Erhalt von 60,0 mg eines gelborangefarbenen Feststoffs (Ausbeute 3,7 %), der wie folgt als Verbindung 10 charakterisiert wurde und gute Löslichkeit in einem Gemisch aus heißem Isopropylalkohol und Wasser zeigte. Massenspektrometrie: $\text{M}^+ = 212$ (q = 100) (Verbindung 10); TLC: $R_f = 0,34$ (Aceton, Silikagelplatten).

[0051] Die obigen Ethylacetatlösungen, die nach der Filtration von der H_2O -Schicht getrennt wurden, um 10 abzutrennen, wurden bis zur Trockenheit verdampft. Der Rückstand wurde dann mit Isopropylalkohol bei Raumtemperatur behandelt unter Erhalt eines dunkelorangefarbenen Feststoffs, 0,41 g (25 % Ausbeute) der Verbindung 9. Massenspektrometrie: $\text{M}^+ = 213$ (q = 70); TLC: $R_f = 0,22$ (Aceton, Silikagelplatten). Verbindung 9 wurde als das Ammoniumsalz $\text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}_3\text{NH}_3^+$, Molekulargewicht 230,61, wie folgt charakterisiert. Die freie Säure 9 wurde in konzentriertem NH_4OH gelöst, dann in Eis gekühlt und filtriert, um eine Spur der unlöslichen Verbindung 10 zu entfernen. Das rote Filtrat und Waschflüssigkeiten wurden bis zur Trockenheit verdampft unter Zurücklassen eines rötlich-orangefarbenen Feststoffs. Dieser wurde mit 50 ml siedendem 1,2-Dimethoxyethan behandelt, auf einem Filter aufgefangen und mit weiteren 25 ml heißem 1,2-Dimethylether gewaschen. Der Feststoff wurde über P_2O_5 bei 56 °C/1,0 mm getrocknet, wobei 0,244 g (87 % Ausbeute) der Verbindung 11 zurückblieben.

11

[0052] Errechnete Analyse für $\text{C}_7\text{H}_4\text{ClN}_3\text{O}_3\text{NH}_3$ (230,61): C 36,5; H 3,06; N 24,30. Gefunden: C 36,5; H 3,07; N 23,94. UV_{max} (H_2O): 219 (ϵ 12.580); 265,4 (ϵ 40.000); 4830486 (ϵ 6.640).

Beispiel 8: In-Vivo-Assay auf Wirksamkeit in Verbindung mit Strahlung

[0053] Die Verbindungen nach der Erfindung wurden in vivo auf ihre Wirksamkeit durch den Assay nach J.M. Brown, Radiation Res (1975) 64:633-47, getestet. Für diesen Assay wurden SCCVII-Karzinome in weiblichen C3H-Mäusen mit einem Gewicht von 20-25 g eingesetzt. Diese Mäuse wurden unter speziellen erregerfreien Bedingungen gezüchtet und waren zu Beginn jedes Experiments 3-4 Monate alt. Der SCVII-Tumor wurde intradermal in der Flanke aus einer Beimpfung mit 2×10^5 Tumorzellen gezogen, die aus dem zweiten bis achten

In-vitro-Durchgang der Tumorzellen nach Entfernung aus dem vorherigen In-vivo-Tumor entnommen waren. Es wurden zwei Tumoren pro Maus implantiert und als Testtumoren verwendet, nachdem sie ein Volumen von ca. 100 ml erreicht hatten. Zu diesem Zeitpunkt enthielten die Tumoren ca. 20 % hypoxische Zellen.

[0054] Die Testverbindung wurde mit einer unveränderlichen Injektionsdosis von entweder 5 mmol/kg oder 2/3 der LD₅₀ (je nachdem, welcher Wert niedriger war) getestet. Geeignete Kontrollen von mit Testverbindung injizierten, aber unbestrahlten Mäusen sowie von mit Kochsalzlösung injizierten und bestrahlten Mäusen wurden ebenfalls vorgesehen. Eine unveränderliche Strahlendosis von 20 Gy wurde in wechselnden Intervallen von 2 h nach bis 3 h vor der Injektion des Medikaments angewandt. Durch Anwendung dieser Intervalle geben die Resultate einen Hinweis sowohl auf die optimale Bestrahlungszeit als auch das Ausmaß der zusätzlichen Zellenvernichtung gegenüber dem reinen Bestrahlten. Die Ergebnisse dieser über einen Zeitraum ablaufenden Experimente unter Einsatz von 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid sind in **Fig. 2** dargestellt. Sie zeigen eine gesteigerte Zellenvernichtung gegenüber einer reinen Bestrahlung, und zwar mehr, als man auf der Basis der Additivität der beiden individuellen Zytotoxizitäten erwarten konnte. Die ähnliche gesteigerte Zytotoxizität bei Verabreichung des Medikaments vor oder nach der Bestrahlung weist eher auf eine selektive Toxizität für die hypoxischen Zellen als auf einen Radiosensibilisierungseffekt des Benzotriazindioxids hin.

[0055] Die Bestrahlung der SCCVII-Tumoren erfolgte durch Bestrahlen nichtbetäubter, Tumoren aufweisender Mäuse in einem Plexiglaskasten. Die Bestrahlungsbedingungen waren: 250 kVp Röntgenstrahlen, 15 mA, FSC 33 cm, zusätzliche Filterung von 0,35 mm Cu, Halbwertsschicht 1,3 mm Cu, und eine Dosisrate von 317 rad/min.

[0056] Das Ausmaß der Zellenvernichtung wurde aus der Überlebensrate der sezierten und in Kulturen angelegten Tumorzellen wie folgt bestimmt. Die Tumoren aufweisenden Mäuse wurden 24 h nach der Bestrahlung getötet, und Tumoren wurden aus der Haut herausgeschnitten, in mehrere Stücke geteilt und durch Hochgeschwindigkeits-Zerkleinern mit einer an einer Schweißsäge befestigten Rasierklinge zu einem feinen Brei zerkleinert. Dieser wurde 30 ml Hankscher gepufferter Salzlösung (HBSS), die 0,02 % DNase, 0,05 % Promase und 0,02 % Collagenase enthielt, zugefügt. Die Suspension wurde für 30 min bei 37 °C gerührt, filtriert und für 10 min bei 4 °C mit 1600 U/min zentrifugiert. Das Zellenpellet wurde erneut in vollständigem Waymouth-Medium plus 15 % Fetalkälberserum und einer mit Trypanblau vermischten aliquoten Menge suspendiert und in einer Blutkörperchen-Zählkammer gezählt. Geeignete Verdünnungen dieses Serums wurden auf Platten in 60- oder 100-mm-Petrischalen aus Polystyrol (Lux Scientific Corporation) in 5 oder 15 ml Medium verbracht. Nach einer Inkubationszeit von 13 Tagen wurden die Kolonien fixiert und gefärbt, und diejenigen, die 50 Zellen oder mehr enthielten, wurden gezählt. Die Verdünnung, die einen durchschnittlichen Zählwert von 25-100 Kolonien in einer 60-mm-Schale ergab, wurde für die Berechnung von Resultaten verwendet.

Beispiel 9: Zytotoxizitäts-Tests

[0057] Zytotoxizitäts-Tests wurden durchgeführt unter Einsatz von 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid und verschiedenen aeroben und hypoxischen Kulturzellen (Human-, Mäuse- und Hamsterzellen). Die in Schleuderkolben befindlichen Zellen wurden für 1 h bei 37 °C entweder mit Luft oder Stickstoff, enthaltend 5 % CO₂, begast, bevor die angegebenen Mengen des Medikaments zugefügt wurden. Die **Fig. 1A, 1B** und **1C** zeigen die Ergebnisse hinsichtlich der überlebenden Mäuse-, Hamster- und Humanzellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid. Es wurde gefunden, daß nur 1-2 % der Medikamentenkonzentration unter aeroben Bedingungen benötigt wurde, um eine gleiche Zellenvernichtung unter Hypoxie zu erreichen. Dieses Verhältnis der selektiven hypoxischen Toxizität (50-100) ist höher als für irgendeine bisher in der Literatur genannte Verbindung.

Beispiel 10: Bestimmung von LD₅₀

[0058] LD₅₀ wird in weiblichen BALB/c-Mäusen (Gewicht 20-25 g) nach der intraperitonealen (ip) Injektion bestimmt, es sei denn, die untersuchte Verbindung hat eine geringe Lipophilität und ist hochlöslich, dann wird intravenöse (iv) Verabreichung angewandt. LD₅₀-Werte wurden an den Tagen 1, 2, 5 und 60 bestimmt durch Verabreichung abgestufter Dosen des Medikaments, das unmittelbar vor der Injektion in physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurde.

Beispiel 11: Radiosensibilisierung in vitro

[0059] Die Ergebnisse von Assays zur Bestimmung der erforderlichen Konzentration des Medikaments zum Erhalt eines gesteigerten Sensibilisierungsverhältnisses von 1,6 bei hypoxischen Kulturzellen sind wie folgt:

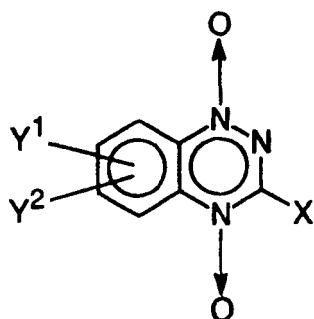
Verbindung	C _{1,6} (mM)
7-Chloro-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1-oxid	3,3
6(7)-Methoxy-3-amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid	~1,0
3-Hydroxy-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid	~2,0

Beispiel 12: Gesteigerte Tumorzellen-Toxizität bei Einsatz von Hydralazin

[0060] Hydralazin ist ein Antihypertonikum, das die glatte Muskulatur um die Blutgefäße entspannt. Dies bewirkt eine bevorzugte Umleitung des Blutstroms in Normalgewebe und von Tumoren weg, und bei diesem Vorgang wird in den Tumoren sofortige Hypoxie erzeugt. Wenn 3-Amino-1,2,4-benzotriazin-1,4-dioxid zusammen mit diesem Mittel verabreicht wird, stellt sich eine massive Steigerung der Tumorzellenvernichtung ein. Bei diesem Versuch führte weder Hydralazin noch die vorgenannte Benzotriazinverbindung zu einer merklichen Zellenvernichtung im SCCVII-Tumor, wogegen die Kombination beider die Überlebensrate um einen Faktor 10³ reduzierte (d. h. nur 1 Zelle aus jeweils 1000 blieb am Leben). Die experimentellen Vorgänge entsprechen denjenigen aus Beispiel 8, und die Resultate sind in **Fig. 3** gezeigt.

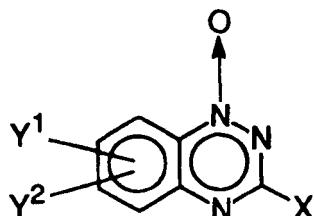
Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel:



in der bei X = OH,

Y¹ und Y² jeweils unabhängig entweder Kohlenwasserstoffreste (C₃-C₁₄), einschließlich zyklische und ungesättigte Kohlenwasserstoffreste sind, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino- (einschließlich Morpholino-), Carboxy-, Carbamyl- oder Alkylcarbamyl- Gruppe sind, wobei die Alkylcarbamyl-Gruppe durch -C(O)NHR' mit R' enthaltend 1-4 Kohlenstoffatome und der Aminosubstituent der Amino- (einschließlich Morpholino-) Gruppe durch NH₂, NHR oder NR₂ definiert ist, wobei R jeweils unabhängig ein Alkyl mit 1-4 Kohlenstoffatomen oder ein Morpholino-Anteil ist und ferner substituiert sein kann mit 1-2 Hydroxy-, Alkoxy-, Amino- oder Halogeno-Substituenten, und wobei die Kohlenwasserstoffreste fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen sind, oder in der Y¹ und Y² jeweils unabhängig entweder NHR¹, O(CO)R¹, NH(CO)R¹, O(SO)R¹ oder O(POR¹)R¹ sind, mit R¹ als Kohlenwasserstoffrest, fakultativ substituiert mit 1 oder 2 Substituenten, die eine Halogeno-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-(einschließlich Morpholino-), Carboxy-, Carbamyl- oder Alkylcarbamyl- Gruppe sind, wobei die Alkylcarbamyl-Gruppe durch -C(O)NHR' mit R' enthaltend 1-4 Kohlenstoffatome definiert ist und wobei der Kohlenwasserstoffrest fakultativ von einer einzelnen Ether(-O-)bindung unterbrochen ist; oder in der Y¹ und Y² jeweils unabhängig gesättigte oder ungesättigte Kohlenwasserstoffreste mit zwischen 7 und 14 Kohlenstoffatomen oder ungesättigte Kohlenwasserstoffreste mit zwischen 1 und 6 Kohlenstoffatomen sind, wobei jeder Kohlenwasserstoffrest-Substituent unsubstituiert oder substituiert ist mit einer Halogen-, Hydroxy-, Epoxy-, Amino-, oder Morpholino-Gruppe, und wobei der Kohlenwasserstoffrest fakultativ von einer einzelnen Etherbindung unterbrochen ist, durch Umsetzen des entsprechenden 3-Amino-1-Oxid-Derivats mit der Formel



mit X=NH₂ und Hydrogenperoxid in Anwesenheit von Na₂WO₄·2H₂O bei einer Temperatur von wenigstens 50

DE 37 90 581 B4 2004.12.23

°C.

Es folgen 5 Blatt Zeichnungen

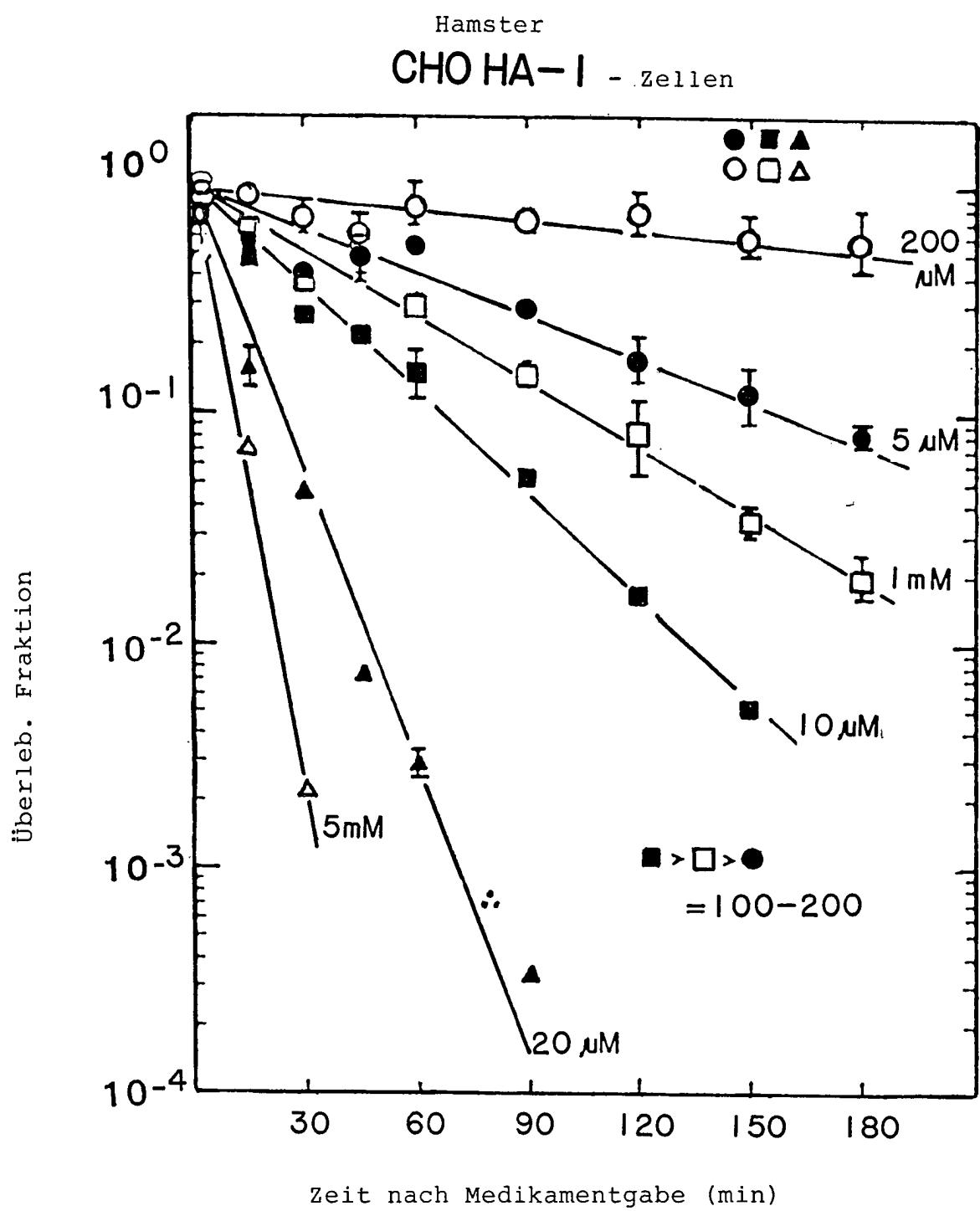


FIG. 1A

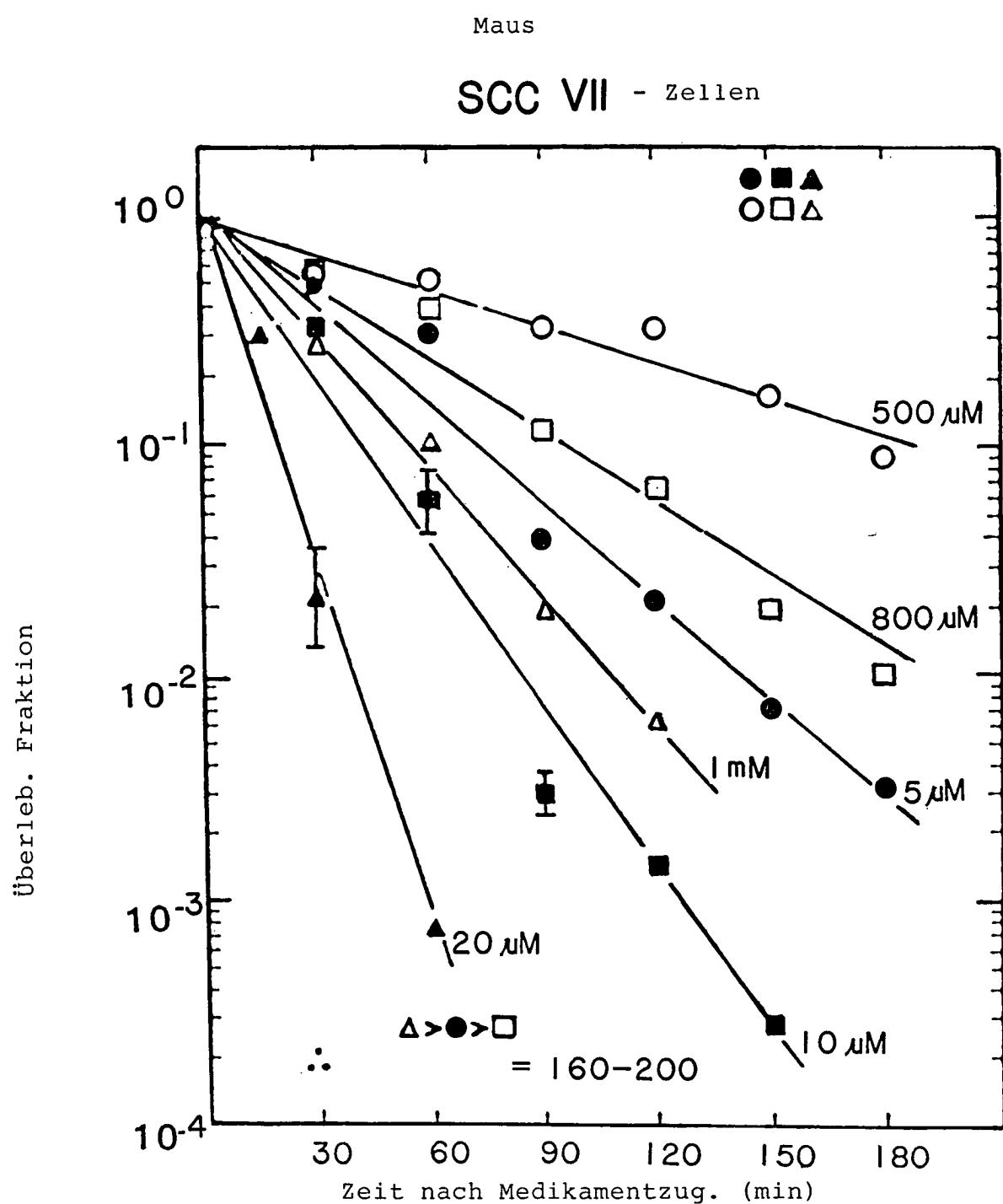


FIG. 1B

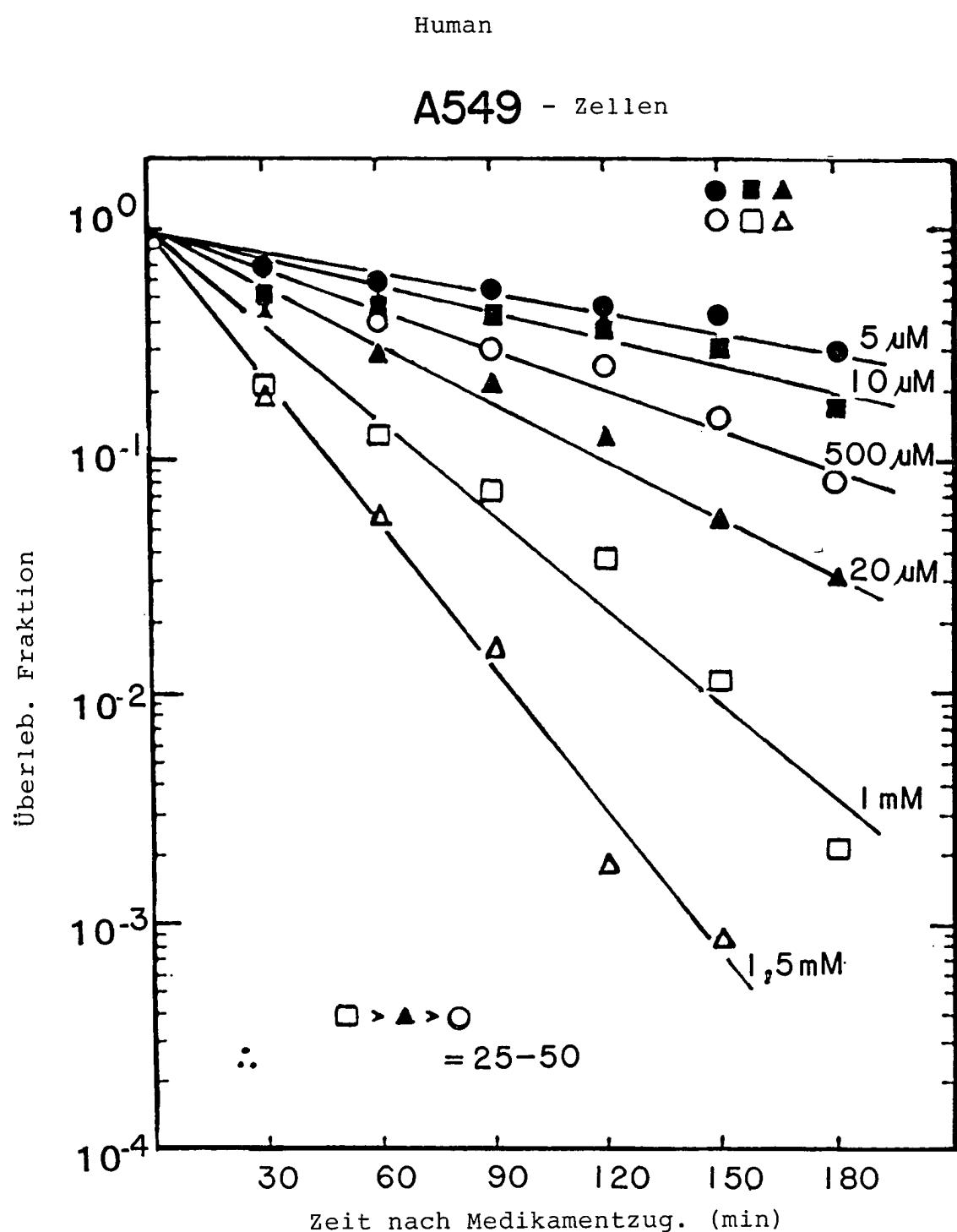


FIG. IC

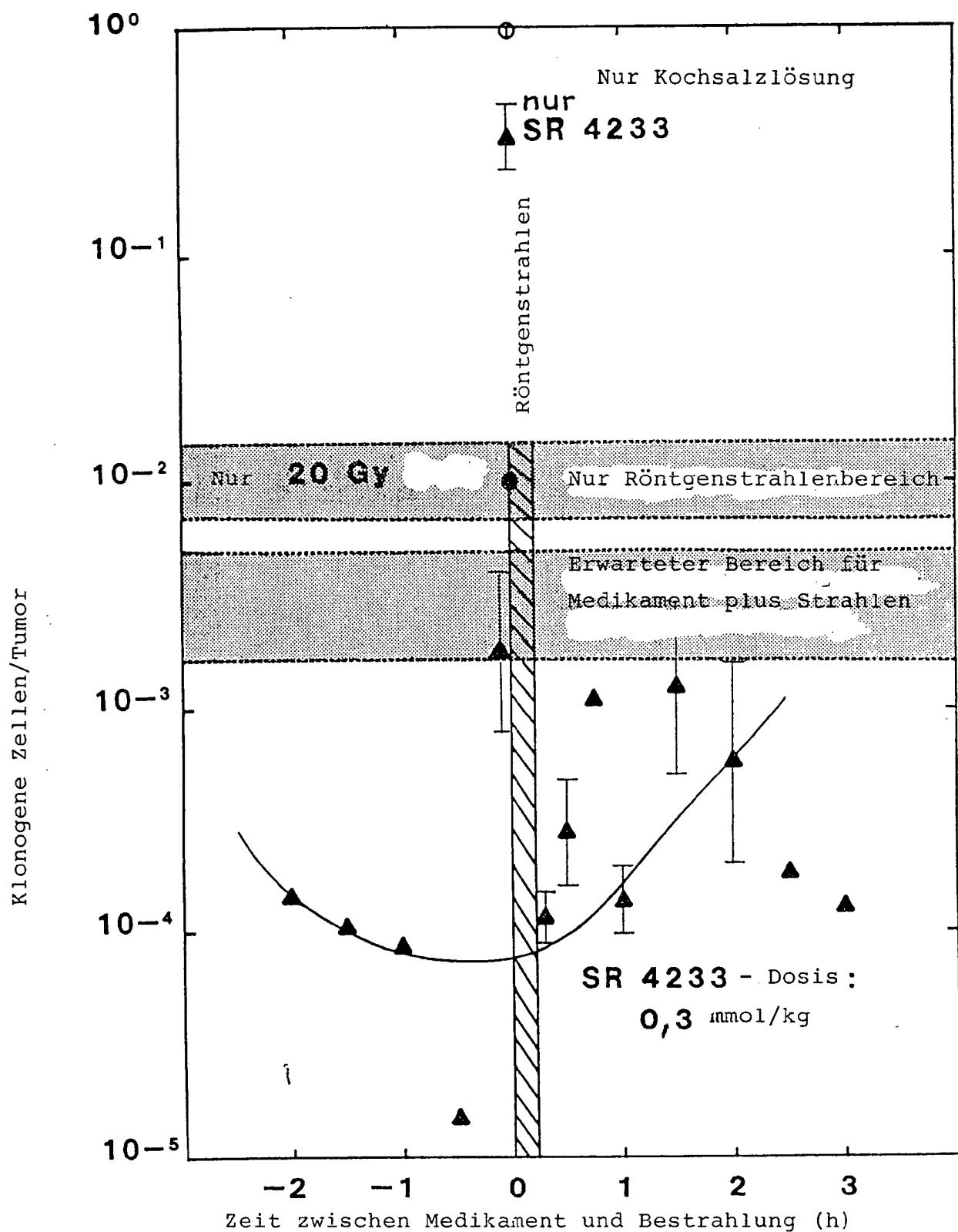
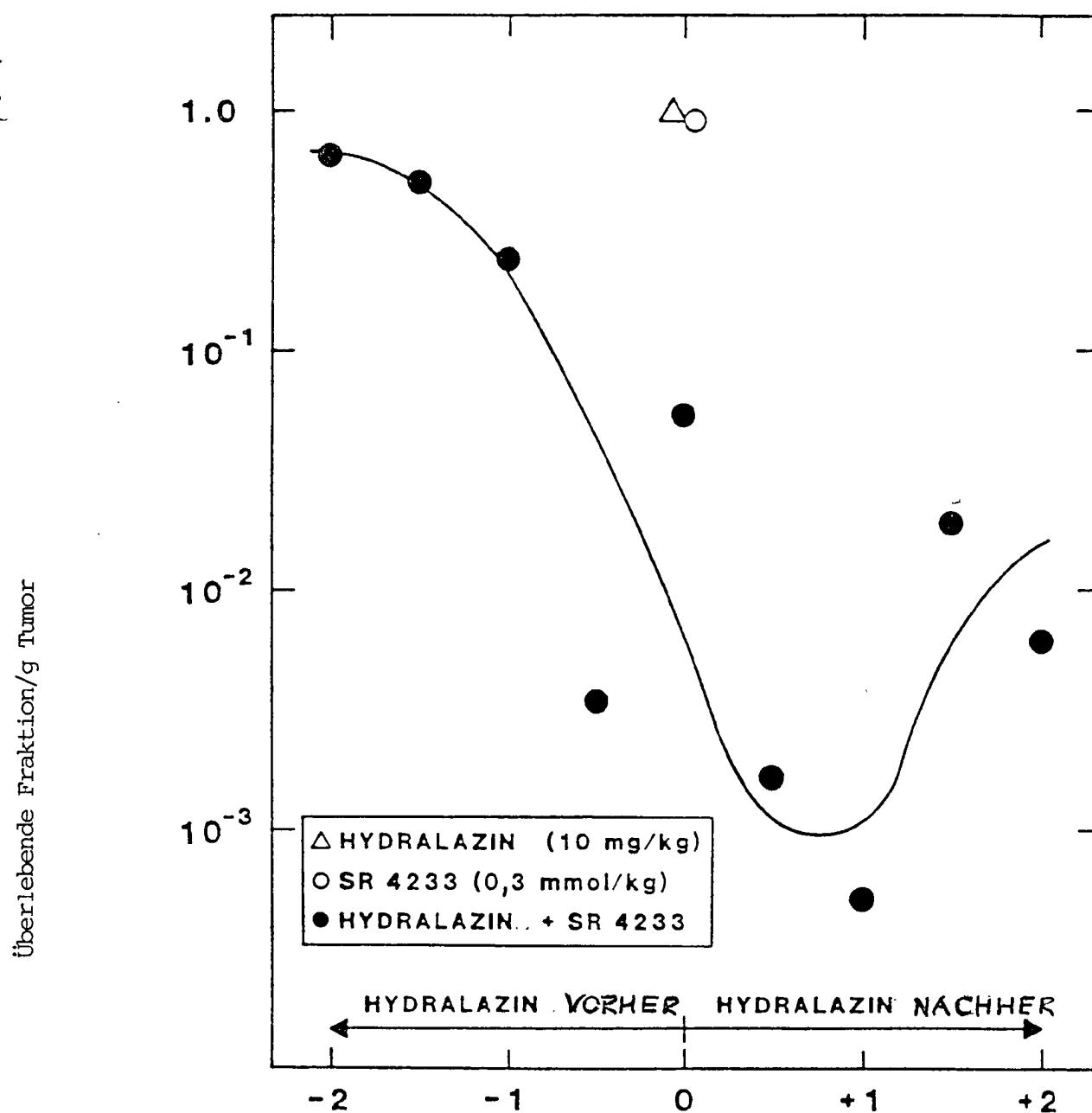


FIG. 2

ZYTOTOXITÄT V. HYDRALAZIN
UND SR 4233 IN SCCVII TUMOREN



Infektionszeit von Hydralazin relativ ZU SR 4233 (h)

FIG. 3