



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 38 145 T2 2008.06.19

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 454 893 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 38 145.5

(96) Europäisches Aktenzeichen: 04 012 220.2

(96) Europäischer Anmeldetag: 14.07.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 08.09.2004

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: 12.09.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 19.06.2008

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C07C 49/737 (2006.01)

C07C 49/755 (2006.01)

C07H 15/18 (2006.01)

C07C 69/007 (2006.01)

C07C 323/22 (2006.01)

C07C 323/52 (2006.01)

C07C 39/225 (2006.01)

C07F 7/18 (2006.01)

C07C 49/757 (2006.01)

C07C 205/45 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

A61K 31/215 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

683687 18.07.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Regents of the University of California,  
Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:

McMorris, Trevor C., La Jolla CA 92037, US;  
Kelner, Michael J., La Jolla CA 92037, US

(74) Vertreter:

Hössle Kudlek & Partner, Patentanwälte, 70173  
Stuttgart

(54) Bezeichnung: Illudin Analoge verwendet als Antitumormittel

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung****Hintergrund der Erfindung**

**[0001]** Eine Auflistung der menschlichen Krebsarten, für die Chemotherapie eine beherrschende Rolle für die Verlängerung der Lebensspanne gespielt hat, so dass sie sich der normalen Lebenserwartung annähert, schließt Burkitt-Lymphom, akute lymphozytische Leukämie und Morbus Hodgkin sowie ungefähr 10–15 andere Tumorarten ein. Siehe z.B. A. Golden et al., Eur. J. Cancer, 17, 129 (1981) (Tabelle 1). Während die Heilungsrate dieser Krebsarten das Ausmaß des Erfolges von Screeningsystemen bei der Auswahl von Antitumorverbindungen, die beim Menschen wirksam sind, veranschaulicht, stellen diese ansprechenden Tumore nur einen kleinen Bruchteil der verschiedenen Krebsarten dar und insbesondere gibt es verhältnismäßig wenige Wirkstoffe, die gegen klinische feste Tumore in hohem Maße aktiv sind. Solche Wirkstoffe schließen Cyclophosphamid, Adriamycin, 5-FU, Hexamethylmelamin und dergleichen mit ein. So besteht für Patienten mit vielen Arten bösartiger Tumore weiterhin ein signifikantes Risiko für Rezidive und Sterblichkeit.

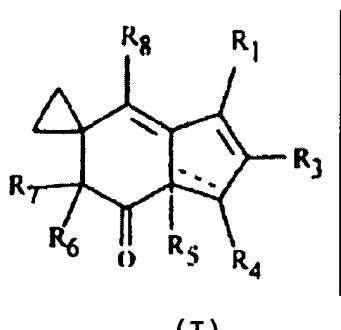
**[0002]** Nach einem Rezidiv kann bei einigen Patienten mit der ursprünglichen Behandlungsmethode erneut eine Remission erreicht werden. Jedoch werden häufig höhere Dosen des ursprünglichen chemotherapeutischen Mittels oder der Gebrauch zusätzlicher Mittel erforderlich sein, was die Entwicklung einer mindestens teilweisen Wirkstoffresistenz anzeigt. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sich gleichzeitig Wirkstoffresistenzen gegenüber mehreren Mitteln entwickeln können, einschließlich solcher, denen der Patient nicht ausgesetzt war. Die Entwicklung mehrfach wirkstoffresistenter („multiple-drug resistant“ – mdr) Tumore kann eine Funktion der Tumormasse sein und stellt eine Hauptursache des Scheiterns einer Behandlung dar. Um diese Wirkstoffresistenz zu überwinden, können hochdosierte Chemotherapie mit oder ohne Bestrahlung und allogene oder autologe Knochenmarktransplantation eingesetzt werden. Die hochdosierte Chemotherapie kann den bzw. die ursprünglichen Wirkstoff(e) einsetzen oder abgeändert werden, um zusätzliche Mittel mit einzuschließen. Die Entwicklung neuer Wirkstoffe, die keine Kreuzresistenz bei mdr Phänotypen zeigen, ist erforderlich, um das heilende Potential der gegenwärtigen Behandlungsmethoden zu fördern und Heileingriffe bei vorher behandelten Patienten zu erleichtern.

**[0003]** Vor kurzem wurde die in vitro Antitumoraktivität einer neuen Klasse von Naturstoffen, die Illudine genannt werden, untersucht von Kelner, M. et al., Cancer Res., 47, 3186 (1987). Illudin M wurde gereinigt und zur Auswertung durch das in vivo Wirkstoffscreeningprogramm der Abteilung für Krebsbehandlung des Nationalen Krebsinstituts (National Cancer Institute Division of Cancer Treatment (NCI DCT)) eingereicht. Illudin M erhöhte die Lebensspanne von Ratten mit Dunning-Leukämie signifikant, hatte aber einen niedrigen therapeutischen Index in Systemen mit festen Tumoren. Die extreme Giftigkeit von Illudinen hat jegliche Anwendungen in der Tumortherapie beim Menschen verhindert. Kürzlich sind synthetische Analoga der Illudine entwickelt worden, die vielversprechende Antitumoraktivität zeigen, einschließlich US Patente Nr. 5 439 936 und 5 523 490, und McMorris et al., Experientia 52 (1996): 7–80.

**[0004]** Jedoch besteht weiterhin ein Bedarf für chemotherapeutische Mittel, die das Tumorwachstum, insbesondere das Wachstum fester Tumore, hemmen und die einen ausreichenden therapeutischen Index haben, um wirksam für eine in vivo Behandlung zu sein.

**Zusammenfassung der Erfindung**

**[0005]** Die vorliegende Erfindung stellt Illudin-Analoga der allgemeinen Formel (I) bereit:



worin  $R_1$  ( $CH_2)_n(Y)$  ist;  
worin  $n$  0 bis 4 ist; und

Y CHO, NH<sub>2</sub>, COOH, (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkenyl-CHO, CH(O(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl), (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Cycloalkyl oder 5-gliedriges Heteroaryl ist, das ein oder mehrere Heteroatome enthält, die ausgewählt sind aus N, S oder nicht peroxidischem O, worin das Cycloalkyl oder Heteroaryl optional mit 1-2 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, CHO, OH oder Halogen substituiert ist; R<sub>3</sub> (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist; R<sub>4</sub> SCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist; R<sub>5</sub> H, OH oder abwesend ist; R<sub>6</sub> (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist; R<sub>7</sub> OH ist; R<sub>6</sub> und R<sub>7</sub> zusammen Ethyldioxy sind; R<sub>8</sub> (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl ist, optional substituiert mit OH oder Halogen; und die durch ---- dargestellte Bindung anwesend oder abwesend ist; und die pharmazeutisch akzeptablen Salze davon.

**[0006]** Vorzugsweise ist n 2 bis 4.

**[0007]** Diese Verbindungen sind als antineoplastische Wirkstoffe nützlich, d.h. um das Wachstum von Tumorzellen in vitro oder in vivo zu hemmen, in Säugetierwirten wie beispielsweise Menschen oder Haustieren, und sind besonders wirksam gegen feste Tumore und mehrfachresistente Tumore.

**[0008]** So stellt die vorliegende Erfindung eine therapeutische Methode zur Behandlung von Krebs zur Verfügung, d.h. um das Wachstum von Tumorzellen in vitro oder vorzugsweise in vivo zu hemmen, durch Verabreichung an ein Säugetier, wie beispielsweise einen menschlichen Krebspatienten, einer Menge einer Verbindung der Formel I, die wirksam ist, das Wachstum der besagten Krebszellen, d.h. Tumorzellen, zu hemmen. Die vorliegenden Verbindungen können besonders nützlich sein für die Behandlung von festen Tumoren, für die verhältnismäßig wenige Heilbehandlungen verfügbar sind. Solche Tumore schließen Epidermoide und myeloide Tumore, akut (AML) oder chronisch (CML), sowie Karzinome der Lunge, der Eierstöcke, der Brust und des Kolons mit ein. Die vorliegenden Verbindungen können auch gegen endometriale Tumore, Blasenkrebs, Pankreaskrebs, Lymphom, Morbus Hodgkins, Prostatakrebs, Sarkome und Hodenkrebs eingesetzt werden, sowie gegen Tumore des Zentralnervensystems, wie beispielsweise Gehirntumore, Neuroblastome und Krebs der blutbildenden Zellen wie beispielsweise Leukämie/Lymphome der B-Zellen, Myelome, Leukämie/Lymphome der T-Zellen und kleinzellige Leukämie/Lymphome. Diese Leukämien/Lymphome können entweder akut (ALL) oder chronisch (CLL) sein.

**[0009]** Die vorliegenden Verbindungen können auch gezielt gegen einen bestimmten Tumor eingesetzt werden, indem man die Verbindung an einem Reagens anbringt, das dazu fähig ist, an ein mit dem Tumor assoziiertes Antigen zu binden. Das Antigen kann sich auf einem Tumor oder im Bereich der Tumorzellen befinden. Verwendbare Reagenzien schließen polyklonale und monoklonale Antikörper mit ein. Der Komplex aus Verbindung und Reagens kann zusätzlich einen Linker für die Befestigung der Verbindung an dem Reagens enthalten.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung stellt auch pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verfügung, wie beispielsweise pharmazeutische Verabreichungsformen für Einzeldosen, die eine antineoplastisch wirksame Menge eines oder mehrerer der vorliegenden Illudin-Analoga in Verbindung mit einem unter pharmazeutischen Gesichtspunkten akzeptablen Träger enthalten.

**[0011]** Wie hierin in Bezug auf die vorliegende Methode verwendet, bedeutet der Begriff „hemmen“ entweder das Verringern der Wachstumsrate der Tumorzellen gegenüber der Rate, die ohne Behandlung auftreten würde oder das Verringern der Größe der Tumorzellenmasse. Hemmen schließt auch das Verursachen einer kompletten Rückbildung des Tumors mit ein. So können die vorliegenden Analoga entweder cytostatisch oder cytotoxisch auf die Tumorzellen wirken.

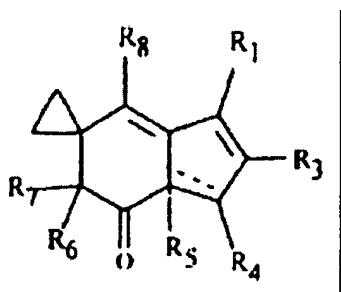
**[0012]** Das Subjekt kann jedes Säugetier sein, das einen beeinflussbaren Krebs hat, d.h. eine bösartige Zellpopulation oder einen Tumor. Die Analoga sind sowohl gegenüber menschlichen Tumoren in vivo als auch gegenüber menschlichen Tumorzelllinien in vitro wirksam.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0013]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung repräsentativer erfindungsgemäßer Verbindungen.

## Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0014]** Die vorliegende Erfindung stellt Illudin-Analoga der allgemeinen Formel (I) bereit:



(I)

worin  $R_1$   $(CH_2)_n(Y)$  ist;

worin  $n$  0 bis 4 ist; bevorzugt ist  $n$  2–4; und

$Y$  CHO, NH<sub>2</sub>, COOH, (C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkenyl-CHO, CH (O(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl)<sub>2</sub>, (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Cycloalkyl oder 5-gliedriges Heteroaryl ist, das ein oder mehrere Heteroatome enthält, die ausgewählt sind aus N, S oder nicht peroxidischem O, worin das Cycloalkyl oder Heteroaryl optional mit 1–2(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, CHO, OH oder Halogen substituiert ist;

$R_3$  (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist;

$R_4$  SCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist;

$R_5$  H, OH oder abwesend ist;

$R_6$  (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder H ist;

$R_7$  OH ist;

$R_6$  und  $R_7$  zusammen Ethyldioxy sind;

$R_8$  (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl ist, optional substituiert mit OH oder Halogen; und

die durch ---- dargestellte Bindung anwesend oder abwesend ist.

**[0015]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist  $n$  1 und  $Y$  ist CHO oder Cyclohexyl.

**[0016]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind  $R_3$ ,  $R_6$  und  $R_8$  CH<sub>3</sub>;  $R_4$  ist H; und  $R_7$  ist OH.

**[0017]** Entsprechend einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist  $n$  2 und  $Y$  ist CHO.

**[0018]** Wie er hierin verwendet wird, schließt der Begriff „Alkyl“ verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppen ein.

**[0019]** Die in Fig. I gezeigten Verbindungen sind repräsentativ für die vorliegende Erfindung.

**[0020]** Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können abgeleitet werden von Illudin S, 6-Hydroxymethylacylfulven (HMAF, d.h. die Verbindung der Formel (I), worin  $R_1$  CH<sub>2</sub>OH ist,  $R_3$  CH<sub>3</sub> ist,  $R_4$  H ist,  $R_5$  abwesend ist,  $R_6$  CH<sub>3</sub> ist,  $R_7$  OH ist und  $R_8$  CH<sub>3</sub> ist) und Fulven (d.h. die Verbindung der Formel (I), worin  $R_1$  H ist,  $R_3$  CH<sub>3</sub> ist,  $R_4$  H ist,  $R_5$  abwesend ist,  $R_6$  CH<sub>3</sub> ist,  $R_7$  OH ist und  $R_8$  CH<sub>3</sub> ist), deren Synthesen dem Fachmann bekannt sind (siehe z.B. WO 91/04754; WO 94/18151).

**[0021]** Verbindungen der Formel (I) können wie folgt hergestellt werden. Verbindungen, in denen  $n$  2 ist und  $Y$  CHO ist, d.h. Verbindung 10, können erhalten werden, indem man Acrolein einer sauren Lösung von Fulven hinzufügt. Verbindung 11, worin  $n$  1 ist und  $Y$  CHO ist, wurde über Oxidation von HMAF mit Dess Martin Reagens hergestellt.

**[0022]** Verbindungen, worin  $Y$  CH (O (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl)<sub>2</sub> ist, können durch Reduktion von Verbindung 10 in einem geeigneten Lösungsmittel erhalten werden. Zum Beispiel wurde Verbindung 39, worin  $Y$  CH(OMe)<sub>2</sub> ist, erhalten, indem man Verbindung 10 mit Natriumborhydrid im Methanol umsetzte. Verbindung 40, worin  $Y$  CH(OEt)<sub>2</sub> ist, wurde hergestellt, indem man Verbindung 10 mit Natriumborhydrid in Ethanol umsetzte.

**[0023]** Verbindungen, in denen  $Y$  -(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkenyl-CHO ist, können erhalten werden, indem man den geeigneten Alkinylaldehyd einer sauren Lösung von HMAF hinzufügt. Zum Beispiel wurde Verbindung 41, worin  $Y$  -CH=CHCH(O) ist, erhalten, indem man eine saure Lösung von HMAF mit Propargylaldehyd behandelte.

**[0024]** Verbindungen, in denen Y ( $C_3-C_6$ )-Cycloalkyl ist, können durch dem Fachmann bekannte Methoden hergestellt werden. Zum Beispiel wurde Verbindung 13 bei der Synthese von Verbindung 10 hergestellt.

**[0025]** Wenn Y Heteroaryl ist, wird das in geeigneter Weise substituierte Aryl- oder Heteroarylreagens saurem, basischem oder neutralem HMAF hinzugefügt. Zum Beispiel wurde Verbindung 36, worin Y eine Imidazolgruppe ist, durch das Behandeln einer neutralen Lösung von HMAF in THF mit Imidazol hergestellt.

**[0026]** Verbindung 38, worin Y COOH ist, wurde hergestellt, indem man Verbindung 10 mit Jones Reagens oxidierte.

**[0027]** Pharmazeutisch akzeptable Salze schließen, wo dies anwendbar ist, Salze wie beispielsweise durch Addition von Säuren an Amine erhaltene Salze und die Mono-, Di- und Triphosphate von freien Hydroxylgruppen mit ein. Aminsalze schließen Salze von anorganischen und organischen Säuren, einschließlich Hydrochloride, Sulfate, Phosphate, Citrate, Tartrate, Malate, Maleate, Bicarbonate und dergleichen mit ein. Alkalimetallamin- oder -ammoniumsalze können gebildet werden, indem man Hydroxyarylgruppen mit Metallhydroxiden, Aminen oder Ammonium umsetzt.

**[0028]** Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können als pharmazeutische Zusammensetzungen formuliert werden und einem Säugetierwirt, wie beispielsweise einem menschlichen Krebspatienten, in einer Vielzahl von Formen verabreicht werden, die dem gewählten Verabreichungsweg angepasst sind, d.h. oral oder parenteral, über intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre oder subkutane Wege.

**[0029]** So können die vorliegenden Verbindungen oral verabreicht werden, z.B. in Verbindung mit einem unter pharmazeutischen Gesichtspunkten akzeptablen Vehikel wie beispielsweise einem inerten Verdünnungsmittel oder einer assimilierbaren essbaren Träger. Sie können in Gelatinekapseln mit harter oder weicher Schale eingeschlossen werden, können zu Tabletten gepresst werden oder können direkt Bestandteil der Nahrung der Diät des Patienten sein. Für eine therapeutische orale Verabreichung kann die aktive Verbindung mit einem oder mehreren Hilfsstoffen kombiniert werden und in Form von einnehmbaren Tabletten, bukkalen Tabletten, Pastillen, Kapseln, Elixieren, Suspensionen, Sirupen, Oblaten und dergleichen benutzt werden. Solche Zusammensetzungen und Zubereitungen sollten mindestens 0,1 % aktive Verbindung enthalten. Der Prozentsatz der Zusammensetzungen und Zubereitungen kann selbstverständlich variiert werden und kann zweckmäßigerverweise zwischen 2 und ungefähr 60 % des Gewichts einer gegebenen Verabreichungsform für Einzeldosen betragen. Die Menge der aktiven Verbindung in solchen therapeutisch nützlichen Zusammensetzungen ist so bemessen, dass ein wirksames Dosierungsniveau erreicht wird.

**[0030]** Die Tabletten, Pastillen, Pillen, Kapseln und dergleichen können außerdem folgendes enthalten: Ein Bindemittel wie Tragant, Akazie, Maisstärke oder Gelatine; Hilfsstoffe wie beispielsweise Dicalciumphosphat; ein Sprengmittel wie Maisstärke, Kartoffelstärke, Alginsäure und dergleichen; ein Gleitmittel wie Magnesiumstearat; und ein Süßungsmittel wie Saccharose, Lactose oder Saccharin oder ein Aromastoff wie Pfefferminze, Wintergrünöl, oder Kirscharoma können zugesetzt werden. Wenn die Verabreichungsform für Einzeldosen eine Kapsel ist, kann sie, zusätzlich zu Materialien der oben genannten Art, einen flüssigen Träger, wie beispielsweise ein Pflanzenöl oder ein Polyethylenglykol enthalten. Verschiedene andere Materialien können als Beschichtungen anwesend sein oder um anderweitig die physische Form der festen Verabreichungsform für Einzeldosen zu modifizieren. Zum Beispiel können Tabletten, Pillen oder Kapseln mit Gelatine, Wachs, Schellack oder Zucker und dergleichen beschichtet werden. Ein Sirup oder Elixier kann die aktive Verbindung, Saccharose als ein Süßungsmittel, Methyl- und Propylparabene als Konservierungsmittel, einen Farbstoff und Aromen wie Kirsch- oder Orangenaroma enthalten. Selbstverständlich sollte jedes Material, das zur Herstellung irgendeiner Verabreichungsform für Einzeldosen benutzt wird, in den eingesetzten Mengen unter pharmazeutischem Gesichtspunkt akzeptabel und im Wesentlichen ungiftig sein. Zusätzlich kann die aktive Verbindung in Zubereitungen und Vorrichtungen mit Depoteffekt enthalten sein.

**[0031]** Die aktive Verbindung kann auch intravenös oder intraperitoneal durch Infusion oder Injektion verabreicht werden. Lösungen der aktiven Verbindung können in Wasser hergestellt werden, optional gemischt mit einem ungiftigen Tensid. Dispersionen können auch in Glycerin, flüssigen Polyethylenglykolen, Triacetin und in Mischungen davon und in ölen hergestellt werden. Unter gewöhnlichen Bedingungen der Lagerung und des Gebrauchs enthalten diese Zubereitungen ein Konservierungsmittel, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern.

**[0032]** Die pharmazeutischen Dosierungsformen, die für die Verwendung zur Injektion oder Infusion geeignet sind, können sterile wässrige Lösungen oder Dispersionen oder sterile Pulver einschließen, die den aktiven

Inhaltsstoff enthalten, und die für die unvorbereitete Zubereitung von sterilen injizierbaren oder infundierbaren Lösungen oder Dispersionen angepasst sind. In allen Fällen muss die letztendliche Dosierungsform steril, flüssig und stabil unter den Bedingungen der Herstellung und der Lagerung sein. Der flüssige Träger oder das Vehikel kann ein Lösungsmittel oder ein flüssiges Dispersionsmittel sein, das beispielsweise Wasser, Ethanol, ein Polyol (zum Beispiel Glycerin, Propylenglykol, flüssige Polyethylenglykole und dergleichen), pflanzliche öle, ungiftige Glycerylester und geeignete Mischungen davon enthält. Das richtige Fließverhalten kann zum Beispiel durch die Bildung von Liposomen, durch die Aufrechterhaltung der erforderlichen Teilchengröße im Falle der Dispersion oder durch die Verwendung von Tensiden aufrechterhalten werden. Die Verhinderung der Tätigkeit von Mikroorganismen kann durch verschiedene antibakterielle und antimykotische Verbindungen, zum Beispiel Parabene, Chlorbutanol, Phenol, Sorbinsäure, Thimerosal und dergleichen bewirkt werden. In vielen Fällen wird es vorzuziehen sein, isotonische Mittel, zum Beispiel Zucker, Puffer oder Natriumchlorid mit einzubringen. Verlängerte Absorption der injizierbaren Zusammensetzungen kann erreicht werden durch den Gebrauch von Mitteln, die die Absorption verzögern, zum Beispiel Aluminiummonostearat und Gelatine, in den Zusammensetzungen. Sterile injizierbare Lösungen werden hergestellt, indem man die aktive Verbindung in der erforderlichen Menge in das geeignete Lösungsmittel einbringt mit verschiedenen der anderen Bestandteile, die oben aufgezählt werden, wie erforderlich, gefolgt von Filtersterilisation. Im Falle steriler Pulver für die Zubereitung von sterilen injizierbaren Lösungen sind die bevorzugten Herstellmethoden Vakuumtrocknung und die Gefriertrocknungstechniken, die ein Pulver der Aktivsubstanz plus jedes zusätzlichen gewünschten Bestandteils ergeben, der in den vorher steril filtrierten Lösungen enthalten ist.

**[0033]** Nützliche Dosierungen der Verbindungen der Fig. (I) können bestimmt werden durch Korrelieren ihrer in vitro Aktivität und in vivo Aktivität in Tiermodellen wie Mäuse- oder Hundemodellen, wie dies für Illudin-Analoga wie beispielsweise die der US Patente Nr. 5 439 936 und 5 523 490 gelehrt wird, zu der Aktivität in höheren Säugetieren wie beispielsweise Kindern und erwachsenen Menschen, wie dies z.B. in Borch et al. (US Patent Nr. 4 938 949) gelehrt wird.

**[0034]** Die therapeutisch wirksame Menge des Analogons variiert notwendigerweise mit dem Subjekt und dem Tumor, die zu behandeln sind. Jedoch ist gefunden worden, dass auf Grund der verglichen mit Illudin S und M verringerten Giftigkeit verhältnismäßig hohe Dosen der Analoga verabreicht werden können. Eine therapeutische Menge zwischen 30 und 112.000 µg pro Kilogramm Körpergewicht ist besonders wirkungsvoll für intravenöse Verabreichung, während 300 bis 112.000 µg pro Kilogramm Körpergewicht wirksam sind, wenn sie intraperitoneal verabreicht werden. Wie der Fachmann erkennen würde, kann die Menge abhängig von der Methode der Verabreichung variiert werden.

**[0035]** Die Erfindung wird nun durch Bezugnahme auf die folgenden ausführlichen Beispiele weiter beschrieben werden.

## BEISPIELE

### BEISPIEL I – Synthese von Illudin-Analoga

**[0036]** Allgemeines. Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren wurden bei 300 und 75 MHz gemessen. Hochauflösende Massenspektren wurden im Massenspektrometrie-Service-Labor der Universität von Minnesota bestimmt. Für die Chromatographie wurde stets Silicagel (Davisil 230–425 mesh, Fisher Scientific) benutzt und Lösungsmittel waren Ethylacetat und Hexane, außer in den Fällen, wo dies spezifisch erwähnt ist. Analytische TLC wurde auf Whatman 4420 222 Silicagel-Platten durchgeführt. Reaktionen wurden routinemäßig durch TLC überwacht.

**[0037]** Die Synthesen von Illudin S. Hydroxymethylacylfulven (HMAF) und Fulven sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. WO 91/ 04754; WO 94/18151).

**[0038]** Verbindung 11. Zu einer gerührten Lösung von 103,5 mg HMAF (MW 246, 0,406 mmol) in 15 ml  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  wurden 327 mg Dess-Martin Reagens gegeben. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 1 h lang gerührt und wurde zwischen Ethylether und gesättigter  $\text{NaHSO}_4$  und  $\text{NaHCO}_3$  Lösung (1:1) verteilt. Die organischen Extrakte wurden mit Salzlösung gewaschen, bis sie neutral waren. Nachdem sie mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet worden war, wurde die Lösung aufkonzentriert und chromatographiert, um 65,7 mg 11 (64,0 %) zu ergeben. 11 ist ein gelbes Harz:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0,83 (m, 1H), 1,19 (m, 1H), 1,41 (s, 3H), 1,45 (m, 1H), 1,67 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 3,80 (s, 1H), 7,08 (s, 1H), 10,25 (s, 1H); MS  $m/z$  244 ( $\text{M}^+$ ); UV  $\lambda_{\text{max}}$  241 nm ( $\epsilon$  14000), 293 nm ( $\epsilon$  12000).

**[0039]** Verbindungen 10 und 13. Zu der Lösung von 1 g Fulven (MW 216, 4,63 mmol) im 5 ml Aceton und 2,5 ml 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung wurden 2,5 ml Acrolein hinzugefügt. Die Mischung wurde bei Zimmertemperatur 7 h lang gerührt und wurde zwischen Ethylacetat und Wasser verteilt. Die organischen Extrakte wurden jeweils mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> und Salzlösung bis zur Neutralität gewaschen. Nachdem sie mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet worden war, wurde die Lösung aufkonzentriert und chromatographiert, um 378 mg 10 (30,0 %) und 241 mg 13 (13,6 %) zu ergeben. 10 ist ein gelbes Harz: 0,68 (m, 1H), 1,07 (m, 1H), 1,32 (m, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,46 (m, 1H), 2,01 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,65 (t, J = 7,8 Hz, 2H), 3,00 (m, 2H), 3,93 (s, 1H), 7,12 (s, 1H), 9,83 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 200,4, 196,3, 157,3, 139,4, 138,3, 135,4, 133,7, 125,3, 75,4, 43,5, 36,9, 27,0, 19,5, 15,4, 13,4, 12,4, 8,6; MS m/z 272 (M<sup>+</sup>), 244, 215, 201; HRMS für C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub> ber. 272, 1413, gefunden 272, 1416; UV λ<sub>max</sub> (Methanol) 332 nm (ε 8500). 13 ist ebenfalls ein gelbes Harz (Mischung): HRMS für C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>5</sub> ber. 384, 1937, gefunden 384, 1947; UV λ<sub>max</sub> (Methanol) 329 nm (ε 6000).

**[0040]** Verbindung 38. Verbindung 10 wurde mit Jones Reagens oxidiert, um 38 als gelbes Harz zu ergeben: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,69 (m, 1H), 0,88 (m, 1H), 1,05 (m, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,47 (m, 1H), 2,06 (s, 3H), 2,07 (s, 3H), 2,52 (m, 2H), 3,03 (m, 2H), 7,13 (s, 1H).

**[0041]** Verbindung 39. 39 wurde in kleiner Menge erhalten, als Verbindung 10 mit Natriumborhydrid in Methanol behandelt wurde. 39 ist ein gelbes Harz: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,67 (m, 1H), 1,06 (m, 1H), 1,32 (m, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,46 (m, 1H), 1,78 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,70 (m, 2H), 3,33 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,95 (s, 1H), 4,35 (t, J = 2,4 Hz, 1H), 7,14 (s, 1H).

**[0042]** Verbindung 40. 40 wurde in kleiner Menge erhalten, als Verbindung 10 mit Natriumborhydrid in Ethanol behandelt wurde. 40 ist ein gelbes Harz: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,67 (m, 1H), 1,04 (m, 1H), 1,21 (m, 6H), 1,29 (m, 1H), 1,36 (s, 3H), 1,46 (m, 1H), 1,77 (m, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,06 (s, 3H), 2,71 (m, 2H), 3,50 (q, 2H), 3,65 (q, 2H), 3,95 (s, 1H), 4,48 (t, J = 5,4 Hz, 2H), 7,13 (s, 1H).

**[0043]** Verbindung 41. Als HMAF mit Propargylaldehyd in Aceton und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) behandelt wurde, wurde 41 als gelbes Harz erhalten: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0,72 (m, 1H), 1,14 (m, 1H), 1,31 (m, 1H), 1,38 (s, 3H), 1,42 (m, 1H), 2,05 (s, 3H), 2,13 (s, 3H), 3,96 (s, 1H), 6,55 (s, 1H), 7,16 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 9,68 (d, 1H).

**[0044]** Verbindung 36. HMAF wurde bei Zimmertemperatur mit Imidazol in THF behandelt, um 36 als gelbes Harz zu ergeben: <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 0,65 (m, 1H), 1,06 (m, 1H), 1,23 (m, 1H), 1,34 (s, 3H), 1,49 (m, 1H), 1,74 (s, 3H), 2,05 (s, 3H), 5,08 (d, 2H), 6,78-7,47 (m, 4H).

#### BEISPIEL II – In vitro Untersuchungen

**[0045]** Um cytotoxische Effekte zu festzustellen, wurden verschiedene Konzentrationen von Illudinen zu Kulturen von MV522 (menschliche Lungenkarzinom-Zelllinie) und 8392 (B-Zellen Leukämie/Lymphom) Zellen für die Dauer von 48 Stunden hinzugefügt, dann wurden Zellwachstum/Entwicklungsfähigkeit durch Trypanblauausschluß bestimmt. Als eine Alternative zu Untersuchungen mit 48 Stunden ununterbrochener Exposition wurden Zellen in Flüssigkultur auf Platten mit 96 Vertiefungen aufgebracht, 2 Stunden lang verschiedenen Konzentrationen von Illudinen ausgesetzt, eine bis zwei Stunden lang mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin gepulst und auf Glasfiltern geerntet. Die Filterpapiere wurden zu Gefäßen hinzugefügt, die Szintillationsflüssigkeit enthielten und die restliche Radioaktivität wurde in einem Beta-(Szintillations)zähler bestimmt.

	2 Stunden IC <sub>50</sub> (nm/l)		48 Stunden IC <sub>50</sub> (nm/l)	
Verbindung	MV522	8392	MV522	8392
10	8900 ± 1500	29400 ± 1600	165 ± 55	14450 ± 1650
13	5120 ± 650	11900 ± 1300	270 ± 130	4200 ± 400
11	4900 ± 900	>100000	1200 <sup>a</sup>	40400 ± 6700

<sup>a</sup>N=2 auf Grund von Instabilität

**[0046]** Wie oben gezeigt, sind die Illudin-Analoga 10, 11 und 13 starke Antitumormittel.

#### BEISPIEL III – In vivo Untersuchungen

**[0047]** Verschiedene Analoga wurden für in vivo Studien ausgewählt. Das Antikrebsmittel Mitomycin C wurde als pharmazeutische Kontrollprobe verwendet. Die Wirkstofftherapie wurde 10 Tage nach der Inokulation und

auf täglicher Basis begonnen und für 5 aufeinander folgende Tage über den IP-Weg durchgeführt. Die Tiere wurden nach dem Beginn der Therapie 3 Wochen lang überwacht. In Beziehung auf alle verabreichten Analoga wurde die maximal zulässige Dosis (Maximum Tolerated Dose – MTD) nicht erreicht.

**[0048]** BALG/c nu/nu 4 Wochen alte weibliche Mäuse, die 18–22 g wogen, wurden von Simonsen, Inc. (Gilroy, CA) erhalten und in der athymischen Mäusekolonie der Universität von Kalifornien (University of California, San Diego, CA) unter pathogenfreien Bedingungen gehalten unter Verwendung von HEPA Filterhauben. Die Tiere wurden ad libitum mit sterilisiertem Futter und Wasser versorgt in Gruppen von 5 Tieren in Kunststoffkäfigen, die mit Polyester-Faserfilterabdeckungen belüftet wurden. Saubere, sterilisierte Kleidung, Handschuhe, Gesichtsmasken und Schuh- und Haubenabdeckungen wurden von allem Personal getragen, das die Tiere handhabte. Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien des NIH „Leitfaden für Haltung und Verwendung von Tieren“ („Guide for Care and Use of Animals“) durchgeführt und durch den Universitätsinstitusausschuss für Tierhaltung und Verwendung („University Institutional Animal Care and Use Committee“)(Protokoll 3-006-2) genehmigt.

**[0049]** Die MV522 Lungenkarzinom-Zelllinie, die für Heterotransplantations-Studien benutzt wurde, wurde erhalten, wie von Kelner et al. beschrieben (Anticancer Res., 15: 867–872; 873–878 (1995)) und in Antibiotikum-freiem RPMI 1640 (Mediatech, Herndon, VA) ergänzt mit 10 fötalem Kälberserum und 2 mM Glutamin in einem 37 °C warmen befeuchtetem Kohlendioxidinkubator gehalten.

**[0050]** Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in Behandlungsgruppen von jeweils fünf Tieren für erste Untersuchungen und in Gruppen von 16–20 Tieren für die Bestätigung der Wirksamkeit der Analoga aufgeteilt. Jedes Tier wurde gekennzeichnet und während der gesamten Experimente individuell verfolgt. Mäuse erhielten über der Schulter sc Injektionen der Elternzelllinie MV522 mit 10 Millionen Zellen/Impfung. 10 Tage nach der sc Implantation der MV522 Zellen, wenn die Sc Tumore ungefähr 3 × 3 mm groß waren, erhielten die Tiere den gewünschten Wirkstoff und die gewünschte Dosis. Der Effekt des Wirkstoffs auf die Lebensspanne wurde aus dem Median des Überlebens errechnet.

**[0051]** Obwohl MV522 Zellen Mäuse durch Metastasen töten, wurde das Wachstum der primären sc Tumore über der Schulter überwacht, beginnend am ersten Tag der Behandlung und danach in wöchentlichen Abständen. Die Tumogröße wurde in zwei zueinander senkrechten Durchmessern gemessen. Tumorgewichte wurden entsprechend der Formel  $w = (\text{Breite})^2 \times \text{Länge}/2$  abgeschätzt. Relative Gewichte (RW) wurden berechnet zu standardisierten Variabilitäten der Tumogröße zwischen Testgruppen zu Beginn der Behandlung mittels der Formel  $\text{RW} = \text{Wt}/\text{Wi}$ , worin Wi das Tumorgewicht für ein gegebenes Tier zu Beginn der Behandlung mit dem Wirkstoff und Wt das Tumorgewicht zu einem nachfolgenden Zeitpunkt ist. Die Tiere wurden obduziert und die Organe wurden auf Anzeichen von Metastasen überprüft.

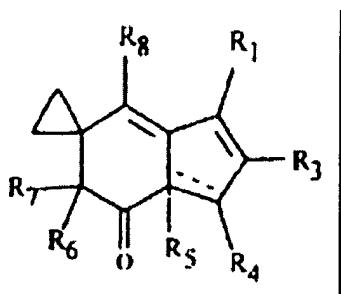
**[0052]** Der Vergleich der Überlebenskurven zwischen Gruppen von Tieren erfolgte durch die Methode von Kaplan und Meir. Für den Vergleich der relativen Tumorgewichte zwischen mehreren Gruppen von Tieren wurde gewöhnliche ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Kramer post ANOVA Mehrfach-Vergleichstest, durchgeführt (Kelner et al. (Anticancer Res., 15: 867–872; 873–878 (1995)). Wahrscheinlichkeitswerte (p), die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant gewertet.

Verbindung	Dosis (mg/kg)	p Wert (Tumorgewicht)
HMAF	6	< 0,01
	8	< 0,01
	10	< 0,001
10	3	< 0,001
	6	< 0,001
11	1,2	< 0,001
Mitomycin C	1,6	> 0,05
	2,0	toxisch

**[0053]** Die hohe Dosis Mitomycin C hatte einen Effekt auf die Tumogröße. Die Dosis war jedoch toxisch, da alle Tiere irgendwann vor Tag 31 starben. Die niedrige Dosis Mitomycin C hatte nur geringe Wirkung.

**Patentansprüche**

## 1. Verbindung der Formel



wobei  $R_1$   $(CH_2)_n(Y)$  ist;

wobei n gleich 0 bis 4 ist; und

$Y$  CHO, NH<sub>2</sub>, COOH,  $-(C_2-C_4)Alkenyl-CHO$ ,  $-CH(O(C_1-C_4)Alkyl)_2$ ,

Cyclo( $C_3-C_6$ )Alkyl oder 5-gliedriges Heteroaryl, das eines oder mehrere Heteroatome ausgewählt aus N, S oder nicht-peroxidischem O umfasst, ist, wobei das Cycloalkyl oder Heteroaryl optional mit 1-2 ( $C_1-C_4$ )Alkyl, CHO, OH oder Halogenid substituiert ist;

$R_3$  ( $C_1-C_4$ )Alkyl oder H ist;

$R_4$   $SCH_2CO_2(C_1-C_4)Alkyl$  oder H ist;

$R_5$  H, OH oder nicht vorhanden ist;

$R_6$  ( $C_1-C_4$ )Alkyl oder H ist;

$R_7$  OH ist;

$R_6$  und  $R_7$  zusammen Ethyldioxy sind;

$R_8$  ( $C_1-C_4$ )Alkyl, wahlweise substituiert mit OH oder Halogenid, ist; und

die durch ---- dargestellte Bindung vorhanden oder abwesend ist; oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

2. Verbindung nach Anspruch 1, wobei die durch ---- dargestellte Bindung vorhanden ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, wobei  $R_3$  CH<sub>3</sub> ist;  $R_4$  H ist;  $R_6$  CH<sub>3</sub> ist;  $R_7$  OH ist und  $R_8$  CH<sub>3</sub> ist.

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei n gleich 1 ist.

5. Verbindung nach Anspruch 4, wobei Y CHO ist.

6. Verbindung nach Anspruch 4, wobei Y Cyclohexyl ist.

7. Verbindung nach Anspruch 3, wobei n gleich 2 ist und Y CHO ist.

8. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform mit einer effektiven Tumorwachstum-inhibierenden Menge der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

9. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform nach Anspruch 8, wobei der Träger ein flüssiger Träger ist.

10. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform nach Anspruch 9, wobei der Träger zur parenteralen Verabreichung angepasst ist.

11. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform nach Anspruch 10, wobei der Träger zur intravenösen Verabreichung angepasst ist.

12. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform nach Anspruch 8, wobei der Träger zur oralen Verabreichung angepasst ist.

13. Pharmazeutische Einheitsdosierungsform nach Anspruch 12, die eine Tablette oder Kapsel ist.

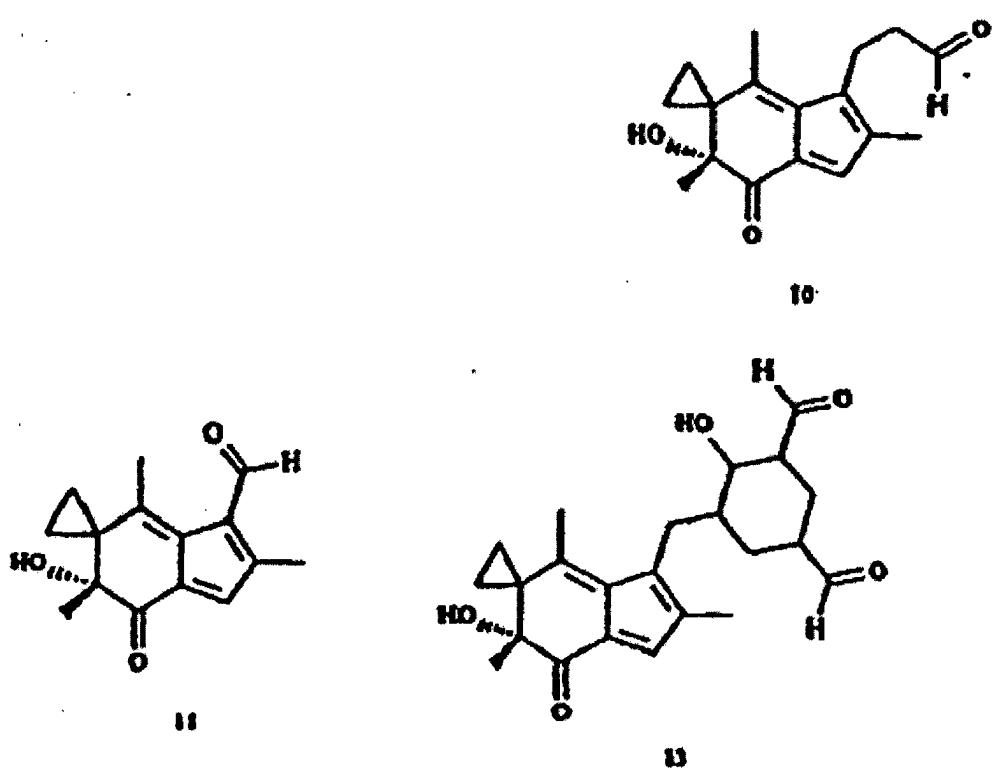
14. Verwendung einer therapeutischen Menge der Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bei der Herstellung eines Medikaments zur Inhibition von Tumorzellenwachstum in einem eine derartige Therapie

benötigenden Probanden.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei der Proband ein menschlicher Krebspatient ist.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15, wobei der Patient von einem festen Tumor befallen ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Figur 1



Figur 2

