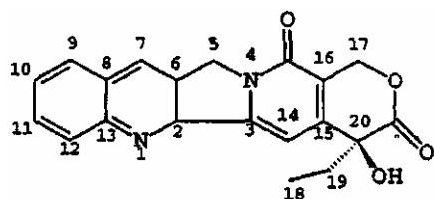


Існуючий винахід стосується нових розчинних у воді проліків аліфатичних чи ароматичних блокованих гідроксильних груп, що містяться у фармацевтичних препаратах. Особливо, існуючий винахід стосується нових розчинних у воді фосфоноксиметиллових етерів блокованого спирту і фенолу, що містяться у фармацевтичних препаратах, типу камптотецину, пропофолу, етопозиду, вітаміну Е та циклоспорину А. Існуючий винахід також стосується проміжних ланок, що використовувались для створення заключних проліків, а також фармацевтичних композицій, які містять нові сполуки.

Успішне постачання фармацевтичного препарату пацієнту має критичну важливість для лікування порушень. Однак, використання багатьох клінічних ліків з відомими властивостями обмежено їх дуже низькою розчинністю у воді. У результаті низької розчинності у воді ці ліки повинні бути сформовані у співрозчинниках до спільного розчинника, які виступають в якості транспортних засобів фармацевтичного препарату, включаючи поверхнево-активні речовини. Було показано, що ці поверхнево-активні речовини являються причиною серйозних побічних ефектів у людей, що обмежує клінічну безпеку цих ліків і тому обмежує лікування деяких порушень.

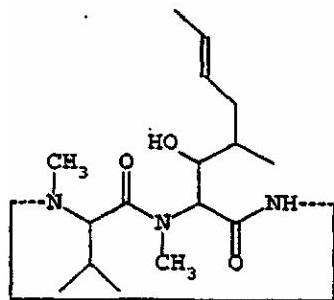
Наприклад, камптотецин - природний продукт, виділений з кори китайського дерева, *Camptotheca acuminata*. Як було виявлено камптотецин показав сильну протипухлинну активність *in vivo* в декількох моделях тварин, включаючи головні типи пухлин такі як легеневі, грудні, яєчники, підшлункової залози, ободочної кишки і раку шлунку і злоякісної меланоми. Камптотецин сповільнює клітинний ферменту DNA топоізомеразу I і викликає каскад подій, що ведуть до апоптозу і запрограмованої смерті клітини. Топоізомераза I - це найважливіший ядерний фермент, відповідальний за організацію і модуляцію топологічної особливості DNA так, щоб клітина могла копіювати, розшифровувати і відновлювати генетичну інформацію, копіювати, розшифровувати і відновлювати генетичну інформацію.



Камптотецин

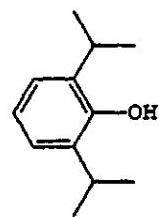
Серйозний недолік камптотецину - його дуже обмежена розчинність у воді. Для біологічних досліджень необхідно розчинити сполуку в сильному органічному розчиннику (ДМСО) чи розробляти лікарський засіб як суспензію в Tween 80:розчин солі, що є небажаною формою лікарського засобу для людської терапії. Недавно два аналоги камптотецину з помірною водяною розчинністю були схвалені в Сполучених Штатах для лікування передчасного овариального раку (Hycamtin) і колоректального раку (Camptosar).

Інші ліки, подібні камптотецину, що мають подібні проблеми - циклоспорин А (CsA), пропофол, етопозид та вітамін Е (альфа-токоферол). Подібно камптотецину, CsA має в межах його структури просторово утруднений спирт, в данному випадку це вторинний спирт. CsA виробляють у суміші CremophorEL/етиловий спирт.



Циклоспорин А

Приклад просторово утрудненого, погано розчинного у воді фенолу - пропофол, що є знеболюючим засобом.



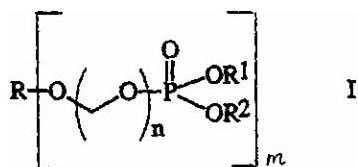
Пропофол (2/6-діізопропілфенол)

Пропофол розроблений для *i.v.* клінічного використання як о/в емульсія. Мало того, що пропофол погано розчиняється у воді, але він також заподіює біль у місці введення. Цей біль зменшують, використовуючи лідокаїн. Внаслідок того, що пропофол розроблений як емульсія, важко і сумнівно додати інші ліки до композиції, і фізичні зміни композиції, наприклад збільшення розмірів крапельок масла можуть позакупорювати легеневі емболії, і т.д. Розчинні у воді і хімічно стабільні проліки пропофолу забезпечило б кілька переваг. Така композиція могла би бути простим водним розчином, що міг би змішуватися з іншими

ліками. Якщо самі проліки є безболісними, вони будуть більш терпляче-дружними, і нарешті не повинні містити ніякої токсичності через відсутність транспортних речовин. Інші погано розчинні у воді, просторово утруднені феноли - лікарські засоби - антиконцирогени етопозид та вітамін Е (альфа-токоферол).

Запропонований винахід забезпечує розчинну у воді форму спирту і фенолу, що містяться в ліках типу камптотецину і пропофола. Відносно камптотецину, ці сполуки відповідно до запропонованого винаходу - фосфоноксиметилкові етери камптотецину у формі вільної кислоти та її фармацевтично прийнятних солей. Водна розчинність кислоти і солей полегшує підготовку фармацевтичних композицій. Усі проліки відповідно до запропонованого винаходу показують переважачу розчинність у воді, у порівнянні з їх відповідними вихідними лікарськими засобами. Методи, розроблені для сполук запропонованого винаходу можуть бути корисні для перетворення багатьох інших нерозчинних у воді лікарських засобів, що мають аліфатичні чи ароматичні загальмовані гідроксильні групи у розчинні у воді похідні сполуки.

Винахід, що тут описаний містить нові речовини. Винахід стосується розчинних у воді фосфоноксиметильних похідних спирту та фенолу, що містяться у фармацевтичних препаратах, представлених загальною формулою I:



Вищезгадані сполуки формули I - похідне ROH, де ROH представляє спирт- чи фенол-вмісний лікарський засіб, типу камптотецину, пропофолу, етопозиду, вітаміну Е і циклоспорину А. У вищезгаданій формулі I, m представляє ціле число, що принаймні дорівнює 1, n представляє ціле число 1 чи 2. Коли n дорівнює 2, ROH - переважно фенолвмісний фармацевтичний препарат, типу пропофола. Також включені деякі ліки, для яких форми, що впорскуються, не можливі через їх властиву недостатню розчинність у воді. Сюди включають даназол, метилтестостерон, йодохінол та атовакюон. R1 - атом водню або іон лужного металу, включаючи натрій, або калій, або літій, або протонований амін, або протонована амінокислота, або будь-який інший фармацевтично прийнятний катіон. R2 - атом водню або іон лужного металу, включаючи натрій, або калій, або літій, або протонований амін, або протонована амінокислота, або будь-який інший фармацевтично прийнятний катіон. Після внутрішньовенного або перорального прийому, похідні, що відповідають формулі I перетворюються назад до вихідних лікарських засобів гідролізом та/або фосфатазою.

Відповідно, ціль запропонованого винаходу - розробити похідні нерозчинних у воді ліків, які б показували гарну активність і водяну розчинність.

Іншим об'єктом запропонованого винаходу є розробка фармацевтичних композицій цих розчинних у воді сполук, що містять в собі сполуки формули I та фармацевтично прийнятний носій.

Іншим об'єктом запропонованого винаходу є розробка похідних лікарського засобу, що мають гарну стабільність на рівнях pH, що підходять для створення фармацевтичних сполук, але які б швидко розщеплювались in vivo під дією фізіологічних умов, та потенційно діяли б як проліки.

Малюнки запропонованої заявки пояснюються в такий спосіб:

Фігура 1 ілюструє in vitro ферментативне перетворення проліків пропофолу до пропофолу.

Фігура 2 ілюструє зміну концентрації пропофола у крові відповідно до часу, що пройшов від приймання проліків пропофола або діпрівану® у досліджуваної собаки.

Фігура 3 ілюструє in vitro ферментативне перетворення проліків камптотецину до камптотецину.

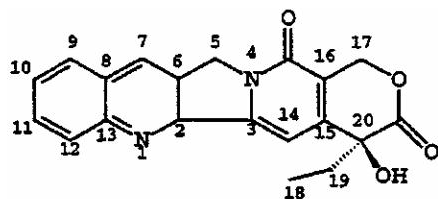
Фігура 4 ілюструє кореляцію між концентрацією камптотецину у плазмі паціюка від проліки камптотецину і від камптотецину в органічних спільних розчинниках.

В запропонованому детальному описі, якщо інше не вказано окремо в контексті, визначення застосовуються в наступних значеннях.

"Фосфоно -" означає групу -P(O)(OH)₂, та "фосфоноксиметокси" або "етер фосфоноксиметилу" означають у загальному групу -OCH₂OP(O)(OH)₂.

"Метилтіометил" відноситься до групи -CH₂SCH₃. Запропонований винахід також охоплює сполуки де n=2 такі як "фосфонодіоксиметилвийетер" у загальному означає групу -CH₂OCH₂OP(O)(OH)₂.

"Частина камптотецину" означає частину, що містить каркас камптотецину, який складається з двадцяти атомів вуглецю, а також включає два атоми азоту і чотири атоми кисню як це зображено на структурній формулі з абсолютною конфігурацією, показаній нижче.



Система нумерації, яка показана вище - використовується для звичайних похідних камптотецину, і застосовується всюди в цій заявці. Наприклад позначення C20 відноситься до вуглецевого атому, позначеному як "20".

"Аналог Камптотецину" відповідає сполуці, що має основний каркас камптотецину. Зрозуміло, що аналоги камптотецину охоплюють сполуки, до яких належать, але не обмежуються наступні сполуками: тропотекан, доступний від SmithKline Beecham, іринотекан (CPT-11), доступний від Pharmacia та Upjohn, 9-амінокамптотекан (9AC), 9-нітрокамптотекан (9NC), GI 147211C, доступний від Glaxo Wellcome, та DX-8951f

Додатково, декілька інших не обмежених аналогів камптотецину, що тут включені, [відкриті Савадою (Sawada) та іншими, Current Pharmaceutical Design, Vol.1, No.1, pp.113-132, а також в патентах Сполучених Штатів за номерами 5646159, 5559235, 5401747, 5364858, 5342947, 5244903, 5180722, 5122606, 5122526, 5106742, 5053512, 5049668, 4981968 та 4894456].

"Фосфонозахисні групи" означають групи, що можуть бути використані для блокування або захисту фосфонуєвої групи. Переважно, такі захисні групи - ті, які можуть бути вилучені методами, що помітно не впливають на іншу частину молекули. Придатні фосфонооксизахисні групи включають наприклад бензильну (позначений "Bn"), t-бутильну та алільну групи.

У описі та формулі, позначення $-\text{OCH}_2\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ використовується, щоб охопити, і вільну кислоту і її фармацевтично прийнятні солі, якщо в контексті чітко не вказано, що використовуються вільна кислота.



Прикладом, що ілюструє вищезгадану Схему 1 може бути використання камптотечину. Повинно бути зрозуміло, що ці схеми можуть бути застосовані до інших сполук, які належать до формули I існуючого винаходу, як наприклад ті що згадуються у вищезгаданому списку. Відповідно, інший аспект існуючого винаходу стосується похідних камптотечину згідно формули II:



які включають вільну кислоту де Z є атомом водню і її фармацевтично прийнятні солі де Z є металом чи аміном. Альтернативно, формула II включає двохосновні кислоти, де Z являється металом чи аміном в обох

місцезнаходженнях.

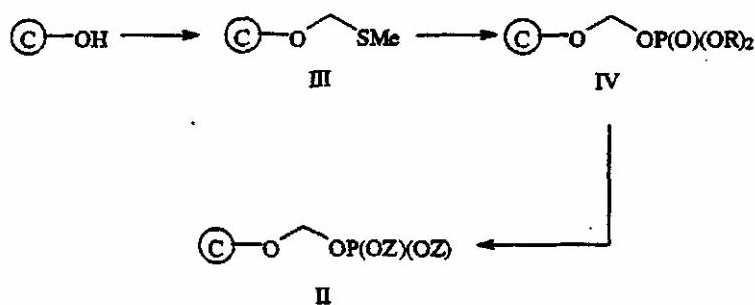
Найпридатніші фармацевтично прийнятні солі сполуки формули II - солі лужних металів, включаючи літій, натрій, та калійні солі; також солі аміну, включаючи триетиламін, триетаноламін, етаноламін, аргінін, лізін та солі N-метилглукаміну.

Найбільш привілейовані втілення похідних камптотецину формули II включають наступні сполуки:

(20)-О-фосфоноксиметилкамптотецин,
моно- чи динатрієва сіль (20)-О-фосфоноксиметилкамптотецину,
моно- чи дикалійна сіль (20)-О-фосфоноксиметилкамптотецину,
моно- чи диаргінінова сіль (20)-О-фосфоноксиметилкамптотецину,
моно- чи дилізинова сіль (20)-О-фосфоноксиметилкамптотецину,
моно- чи ди-N-метилглукамінова сіль (20)-О-та
моно- чи ди-триетаноламінова сіль (20)-О-фосфоноксиметилкамптотецину.

Сполуки формули II можуть бути підготовлені безпосередньо від камптотецину (показаний як ©-ОН) відповідно до послідовності реакцій, зображених в Схемі 2:

Схема 2



Сполука формули III (метилтіометилловий етер, МТМ-етер) може бути отриманий, взаємодією камптотецину з сумішю диметилсульфоксид/оцтовий ангідрид/оцтова кислота.

На другому кроці, показаному в Схемі 2, метилтіометилловий етер перетворили у відповідний захищений фосфоноксиметилловий етер (сполука формули IV). Це виконано, взаємодією МТМ-етеру з N-йодсукцинамідом та захищеним фосфатом HOP(O)(OR)_2 . На третьому кроці вилучають фосфонозахисні групи, щоб отримати сполуку формули II. Наприклад, придатною фосфонозахисною групою є бензил, який може бути вилучений каталітичним гідрогенолізом.

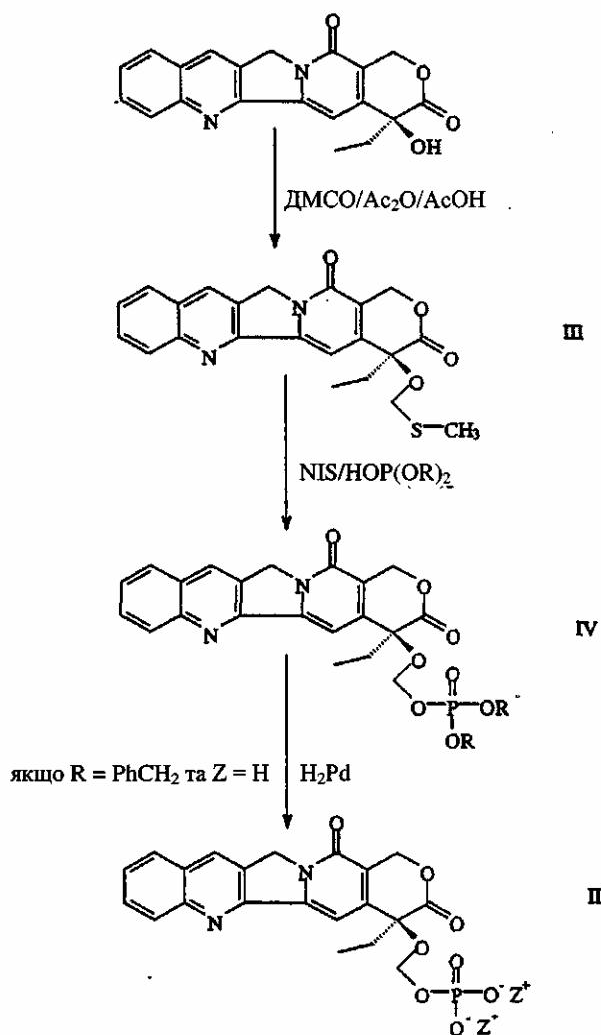
Загальний процес Схеми 2 одержання сполуки формули I більш детально ілюструється на Схемі 3.

На першому кроці, вільну гідроксильну групу камптотецину перетворили до відповідного метилтіометиллового етеру (-OCH₂SCH₃ група). Це перетворення може бути виконано реакцією з диметилсульфоксидом у присутності оцтового ангідриду та оцтової кислоти. Цей метод, звичайно відомий як реакція Памера успішно застосовувався Брістолем-Майерсом Сквібом для метилтіометиллювання таксол [Європейський патент 0604910A1, Bioorg. Med. Chem. Lett., 6,1837,1996; див. також Європейський патент 0639577A]. Реакція звичайно виконується при кімнатній температурі, протягом 24-72 годин, щоб отримати метилтіометилловий етер.

На другому кроці послідовності реакцій, метилтіометилловий етер перетворили у відповідний захищений фосфоноксиметилловий етер. Це відоме перетворення успішно застосовувалося Брістолем-Маерсом Сквібом для, фосфоноксиметиллювання таксол [Європейський патент 0604910A1, Bioorg. Med. Chem. Lett., 6,1837,1996]. Таким чином, сполуку формули III вводять у взаємодію з N-йодсукцинамідом та захищеною фосфорною кислотою, такою як дибензилфосфат. Реакція виконана в інертному органічному розчиннику, такому як тетрагідрофуран та галоїдованому вуглеводню, такому як хлористий метилен та у присутності молекулярних сит. Реакція виконана при кімнатній температурі. N-йодсукцинімід і захищена фосфорна кислота використовувались в надлишку (3-5 еквівалентів) по відношенню до метилтіометиллового етеру.

На третьому кроці послідовності реакції, вилучають фосфонозахисні групи. Розблокування виконане звичайними методами, відомими в галузі, як наприклад гідролізом, що каталізується кислотами чи основами, гідрогенолізом, відновленням, і т.п.. Наприклад, каталітичний гідрогеноліз може використовуватися, щоб видалити фосфонозахисну групу бензил. Методики зняття захисту можна знайти в стандартних текстах, типу [T. W. Green та P.G.M. Wutz, Protective groups in organic sythesis, J. Wiley publishers, New York, NY, 1991, pp.47-67].

Схема 3

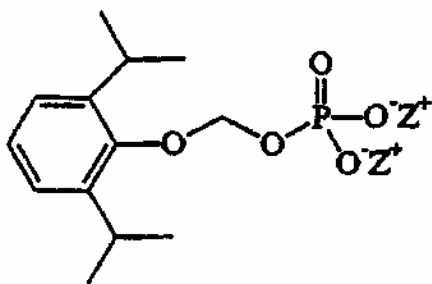


Основні солі сполуки формули II можуть бути отримані звичайними методами, що включають взаємодію сполуки формули II у формі кислоти з основою металу або з аміном. Придатні основи металів включають гідроксиди, карбонати і бікарбонати натрію, калію, літію, кальцію, барію, магнію, цинку, і алюмінію; а придатні аміни включають триетиламін, аміак, лізин, аргінін, N-метилглутамін, етаноламін, прокаїн, бензазін, дибензиламін, триметамін (TRIS), хлорпрокаїн, холін, диетаноламін, триетаноламін і т.п. Солі основи можуть бути далі очищені хроматографією з наступною ліофілізацією або кристалізацією.

Сполуки запропонованого винаходу - фармацевтичні фосфоноксиметилі етери типу камптотецину, пропופолу, етопозиду, токоферолу, і т.д. Фармацевтично прийнятні солі показують покращену розчинність у воді по відношенню до материнських сполук, що дає можливість у такий спосіб створювати більш зручні фармацевтичні рецептури. Щоб обмежити теоретичну частину приймемо, що етери фосфоноксиметилу існуючого винаходу - проліки материнських фармацевтичних препаратів; фосфоноксиметильна компонента, що розщеплюється після контакту *in vivo* з фосфатазою, що згодом дає материнську сполуку. Як показано вище, сполуки що стосуються даного винаходу - ефективні фармацевтичні або терапевтичні засоби.

Наприклад, сполуки формули II запропонованого винаходу можуть використовуватися способом подібним до використання камптотецину. Структура проліків камптотецину була показана вище. Тому, кваліфікований онколог, який володіє знаннями щодо лікування раку буде здатний назначити, без недоречного експериментування підходящий курс лікування з використанням сполук, що представлені в цьому винаході. Дозування, методика і розклад застосування сполук цього винаходу особливо не обмежені, і зміняться при використуванні конкретної сполуки. Таким чином, сполука формули II може бути застосована через будь-який придатний спосіб доставки, найкраще парентерально; дозування може бути, наприклад, у діапазоні приблизно від 0,1 до приблизно 100мг/кг ваги тіла, або приблизно від 5 до 500мг/м². Сполуки формули II можуть також бути, застосовані для перорального використання; пероральні дози можуть бути в діапазоні приблизно від 5 до приблизно 500мг/кг ваги тіла. Фактична доза для використання зміниться відповідно до конкретної сполуки, способу введення, і конкретного місцеперебування, власника і типу пухлини, яка лікується. Багато факторів, що змінюють активність лікарського засобу, будуть прийняті до уваги при визначенні дозування, включаючи вік, рід, дієту і фізичний стан пацієнта.

Інший приклад - проліки пропופола, що відповідають формулі I запропонованого винаходу. Структурна формула проліків пропופола показується нижче:



Проліки пропофолу

У вищезгаданій формулі для проліків пропофолу, Z - має ті ж самі значення як це визначено вище для формули II. Тому, кваліфікований онколог, який володіє знаннями щодо лікування раку буде здатний назначити, без недоречного експериментування підходящий курс лікування з використанням сполук, що представлені в цьому винаході. Дозування, методика і розклад застосування сполук цього винаходу особливо не обмежені, і зміняться при використуванні конкретної сполуки. Таким чином, сполука формули I, така як проліки пропофолу може бути застосована через будь-який придатний спосіб доставки, найкраще парентерально; дозування може бути назначено відповідно для процедур введення загальної анестезії або підтримання загальної анестезії, наприклад, у діапазоні приблизно від 0,5 до приблизно 10мг/кг. Альтернативно, сполуки формули II можуть також бути, застосовані для перорального використання; пероральні дози можуть бути, приклад, в діапазоні від 2мг/кг/хв до 800мг/кг/хв відповідно до процедур для обслуговування загальної анестезії, ініціювання і обслуговування MAC седативного або ефекту ініціювання і обслуговування ICU седативного ефекту.

Існуючий винахід також захищає фармацевтичні композиції, що містять фармацевтично ефективну кількість сполуки формули I у комбінації з одним або більшою кількістю фармацевтично прийнятними носіями, інертними наповнювачами, розчинниками або присадками. Наприклад, фармацевтичні композиції представленого винаходу можуть бути у формі таблеток, гранул, порошкових сумішей, капсул, ін'єкцій, розчинів, свіч, емульсій, дисперсій, харчових добавок, і в інших придатних формах. Вони можуть також бути зроблені у формі стерильних твердих сполук, наприклад, висушених заморожуванням і, якщо бажано, об'єднаними з іншими фармацевтично прийнятними інертними наповнювачами. Такі тверді композиції можуть бути відновлені зі стерилізованою водою, фізіологічною розчином солі, чи сумішшю води й органічного розчинника, типу пропіленгліколю, етилового спирту, і т.п., чи деякими іншими стерильними розчинниками для ін'єкцій, безпосередньо перед використанням парентерального введення.

Типовими фармацевтично прийнятними носіями є, наприклад, манітол, сечовина, декстрини, лактоза, цукри, що не-редукують, картопляний та кукурудзяний крохмалі, стеарат магнію, тальк, рослинні олії, поліалкіленгліколі, етилцелюлоза, полівінілпірролідон, вуглекислий кальцій, етилолеат, міристиновокислий ізопропіл, бензилбензоат, вуглекислий натрій, желатин, вуглекислий калій, кремнієва кислота. Фармацевтична препарати можуть також містити не токсичні допоміжні речовини, такі як емульгатори, зберігаючі речовини, речовин для покращення змочування, і т.п., приклад, сорбіт монолаурат, олеат триетаноламіну, моностеарат поліоксіетилену, трипалмітат гліцерилу, диоктилнатрій сульфосукцинат, і т.п.

У наступних експериментальних методиках, усі температури, якщо не зазначено окремо, подані в градусах Цельсія (°C). Спектральні характеристики в спектрах ядерного магнітного резонансу (NMR) подаються у вигляді хімічних зсувів (δ) виражений у мільйонних частинах (ppm) по відношенню до тетраметилсилану (TMS) як опорного еталону. Відносна площа, повідомлена для різних зсувів протонів в спектральних даних NMR відповідає числу водневих атомів специфічного функціонального типу в молекулі. Характер зсуву щодо мультиплетності позначені як широкий синглет (bs), широкий дуплет (bd), широкий триплет (bt), широкий квартет (bq), синглет (s), мультиплет (m), дублет (d), квартет (q), триплет (t), дублет дуплету (dd), дублет триплету (dt), і дублет квартету (dq). Розчинники, які використовувались для зняття NMR спектрів - ацетон-d6 (дейтерований ацетон) ДМСО-d6 (пердейтеродиметилсульфоксид), D₂O (дейтерована вода), CDCl₃ (дейтерохлороформ) і інші звичайні дейтеровані розчинники.

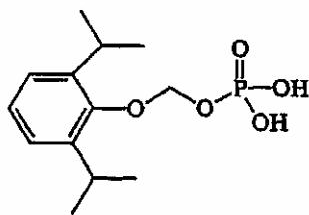
Скорочення, що використовувались в описі - звичайні скорочення, які широко використовуються у галузі. Деякі з них:

MS (мас-спектрометрія); HRMS (мас-спектрометрія з високою роздільною здатністю); Ac (ацетил); Ph (феніл); FAB (швидке бомбардування (опромінення) атома); хв. (хвилина); год. година(и); NIS (N-йодсукцинімід); ДМСО (диметилсульфоксид); THF (тетрагідрофуран), HPLC (високоєфективна рідинна хроматографія).

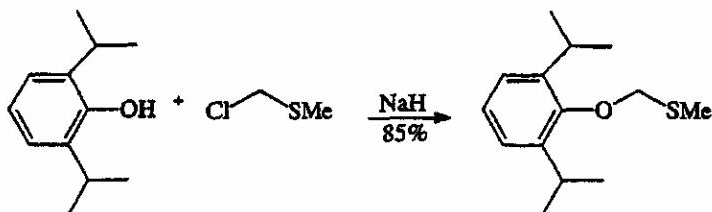
Наступні приклади надаються для ілюстрації синтезу представлених сполук цього винаходу і в будь-який спосіб не повинні бути розглянуті як обмеження області винаходу. Кваліфікований спеціаліст буде здатний адаптувати ці методи, без недоречного експериментування, для синтезу сполук у межах області цього винаходу, без більш детального розкриття. Наприклад, у наступних прикладах, використовуються конкретні солі, не дивлячись на це, ці солі не повинні бути розглянуті як обмеження. Приклад цієї ситуації - багаторазове використання срібної солі дибензилфосфату. Солі тетраалкіламонію, такі як тетраметиламонійна сіль або солі інших лужних металів можуть використовуватися замість срібної солі.

Приклади

I. Синтез О-фосфоноксиметилпропофолу



Ia. Синтез О-метилтіометилпропофолу:



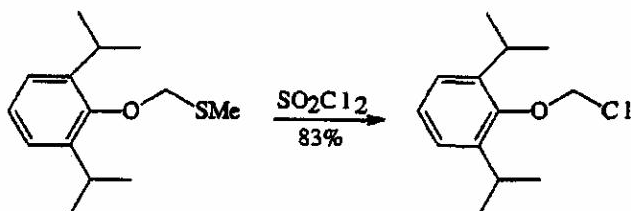
До суспензії гідриду натрію (150мг, 6,2ммоль), що розмішувалася, у сухому НМРА (10мл), що зберігався під атмосферою аргону, додали по краплях пропофол (1,1мл, 97%, 5,7ммоль) протягом більше ніж 15 хвилин. Потім реакційна суміш розмішувалася при кімнатній температурі протягом додаткових 30 хвилин. До цієї суміші додали по краплях хлорметилметилсульфід (550мкл, 95%, 6,2ммоль) і потім розмішувалася при кімнатній температурі. Після 20 годин реакційна суміш була розділена з перемішуванням між водою (10мл) і бензолом (20мл). Водний шар був відділений і проекстрагований бензолом (10мл). Фракції бензолу були об'єднані, промиті водою (2×3мл), висушені над сульфатом натрію, і випаровувалися під зниженим тиском. Масляний залишок, що залишився, був підданий хроматографії на колонці (силікагель, гексан, потім гексан/хлороформ 4:1) що дало 1,15г (вихід 85%) цільової сполуки у вигляді безбарвного масла.

EIMS: $[M]^+$, m/z 238.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3 , δ): 1,24 (d, $J=6,9\text{Hz}$, 12H), 2,37 (s, 3H), 3,37 (hept, $J=6,9\text{Hz}$, 2H), 4,86 (s, 2H), 7,12 (s, 3H),

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3 , δ): 15,40, 23,98, 26,68, 78,12, 124,04, 125,05, 141,74, 152,20.

Ib. Синтез О-хлорметилпропофолу:



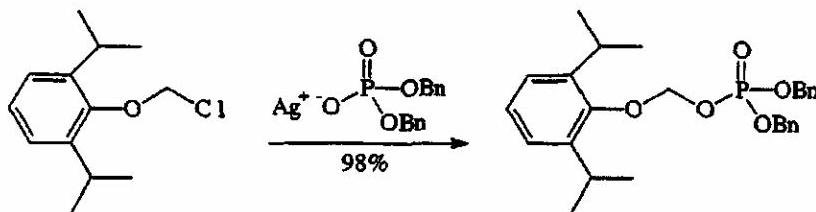
До розчину, що розмішується, О-метилтіометилпропофолу (3,00г, 12,5ммоль) у сухому хлористому метилені (30мл), що зберігався під атмосферою аргону, додали 1М розчин SO_2Cl_2 у сухому хлористому метилені (12,2мл, 12,2ммоль) при 5°C протягом більш ніж п'яти хвилин. Реакційна суміш розмішувалася протягом 10 хвилин при тій же самій температурі і потім протягом трьох годин при кімнатній температурі. Розчинник випаровували під зменшеним тиском, і коричневі кубові залишки були очищені за допомогою флеш хроматографії (силікагель, 1:20 гексан/етилацетат) що дало 2,36г (вихід 83%) цільової сполуки у вигляді жовтої олії.

CIMS (NH_3): $[M]^+$, m/z 226, $[M+\text{NH}_3]^+$, m/z 244.

^1H NMR (300MHz, CDCl_3 , δ): 1,22 (d, $J=6,9\text{Hz}$, 12H), 3,35 (hept, $J=6,9\text{Hz}$, 2H), 5,76 (s, 2H), 7,15 (m, 3H),

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3 , δ): 23,93, 26,84, 83,34, 124,34, 125,95, 141,34, 150,93.

Ic. Синтез дібензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу (спосіб - 1):



Суміш О-хлорметилпропофолу (2,20г, 9,7ммоль), дібензилфосфату срібла (3,85г, 10,0ммоль) та сухого толуолу (50мл) гріли зі зворотним холодильником під атмосферою аргону протягом 45 хвилин. Потім суміш охолодили до кімнатної температури і відфільтрували. Після того, як розчинник випарили у вакуумі, масляний залишок очистили за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (9:1 гексан/етилацетат і потім

1:1 гексан/етилаацетат) що дало 4,43г (вихід 98%) цільової сполуки у вигляді жовтої олії.

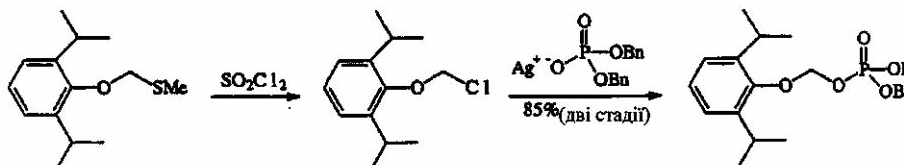
CIMS (NH₃): [MH]⁺, m/z 469, [MH+NH₃]⁺, m/z 486.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃, δ): 1,17 (d, J=6,8Hz, 12H), 3,33 (hept, J=6,9Hz, 2H), 5,00 (d, J=7,8Hz, 2H), 5,01 (d, J=7,8Hz, 2H), 5,42 (d, J=9,9Hz, 2H), 7,12 (m, 3H), 7,32 (m, 10H).

¹³C NMR (75MHz, CDCl₃, δ): 23,79, 26,57, 69,15, 69,23, 94,14, 94,20, 124,07, 125,62, 127,70, 128,44, 135,42, 135,51, 141,50, 151,07.

Іс. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу

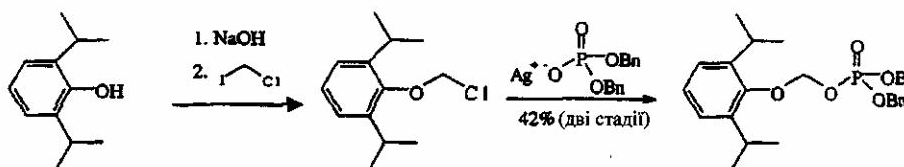
(альтернативний спосіб -1):



До розчину, що розміщується, О-метилтіометилпропофолу (1,45г, 6,08ммоль) у сухому хлористому метиліні (15мл) під атмосферою аргону при 0-5°C додали 1М розчин SO₂Cl₂ у сухому хлористому метиліні (6,5мл, 6,5ммоль) більш ніж п'ять хвилин. Реакційна суміш розмішувалася протягом 10 хвилин при 5°C і трьох годин при кімнатній температурі. Потім розчинник випаровували під зменшеним тиском. Кубові залишки були розчинені в толуолі (ACS-марка, 20мл); додали дибензилфосфат срібла (3,50г, 9,1ммоль), і суміш, що утворилася, гріли зі зворотним холодильником протягом 45 хвилин. Коричневу реакційну суміш охолодили до кімнатної температури і відфільтрували. Після того, як розчинник випаровувався у вакуумі, масляний залишок був очищений флеш хроматографією на силікагелі (9:1 гексана/етилаацетат, тоді 1:1 гексана/етилаацетат) що дало 2,41г (вихід 85%) цільової сполуки у вигляді жовтої олії. Цей продукт мав той же самий R_f (TLC) та ¹H NMR спектр (300MHz, CDCl₃) як і справжній зразок.

Іс. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу

(альтернативний спосіб -2):

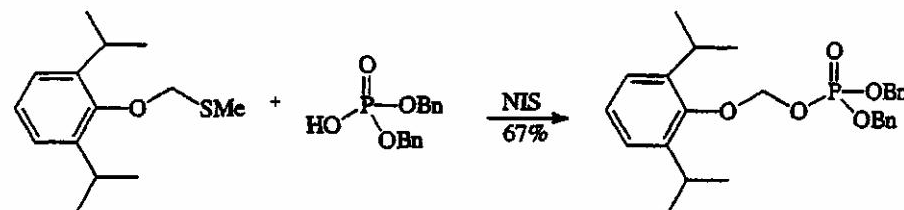


До суспензії гідриду натрію (41мг 60% дисперсії у мінеральному маслі, 1,02ммоль), що розміщується, у сухому диметоксиметані (1,5мл) під атмосферою аргону додали по краплях пропофол (200мкл 97%, 1,04ммоль) протягом більш ніж 5 хвилин і суміш, що утворилася, розмішували протягом додаткових 15 хвилин. Гомогенний розчин, що утворився, додали при перемішуванні краплинам до розчину, хлорйодметану (4,0мл, 53ммоль) у сухому диметоксиметані (4мл) протягом більш ніж 15 хвилин. Цю реакційну суміш розмішували протягом двох годин, відфільтрували, і потім випарували розчинник і надлишок хлорйодметану. Маслянистий залишок розчинили в толуолі (HPLC-марка, 10мл). До цього розчину додали, дибензилфосфат срібла (400мг, 1,04ммоль), і суміш, що утворилася, нагрівали зі зворотним холодильником протягом 10 хвилин. Після цього, реакційну суміш охолодили до кімнатної температури і відфільтрували, розчинник випарували у вакуумі. Масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (9:1 гексан/етилаацетат і потім 1:1 гексан/етилаацетат), що дало 205мг (вихід 42%) цільової сполуки у вигляді жовтої олії. Цей продукт мав той же самий R_f (TLC) і ¹H NMR спектр (300MHz, CDCl₃) як і справжній зразок.

Додатково до вищезгаданої реакції Іс (альтернативний спосіб -2) розуміється, що інші реактиви можуть використовуватися в залежності від того, яку сполуку бажають отримати. Наприклад, коли хочуть отримати сполуку формули І де n=2, хлорйодметан необхідно замінити сполукою типу X-CH₂-O-CH₂-Cl, де X - гарна відхідна група.

Іс. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу

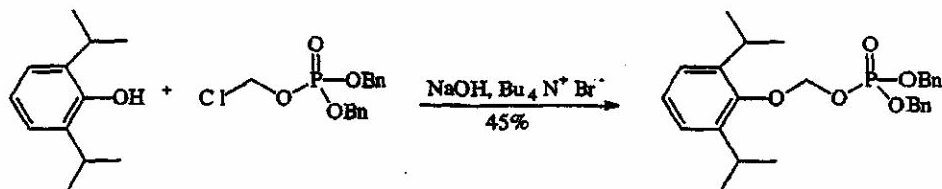
(альтернативний спосіб -3):



До розчину, що розміщується, О-метилтіометилпропофолу (91мг, 0,38ммоль) у сухому хлористому метиліні (2мл) під атмосферою аргону були додані розтерті активізовані 4А молекулярні сита (100мг), і потім розчин дибензилфосфату (127мг, 0,45ммоль) та N-йодсукциніміду (102мг 95%, 0,43ммоль) у тетрагідрофурані (2мл). Реакційна суміш розмішувалася при кімнатній температурі протягом однієї години,

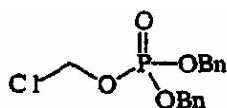
потім її відфільтрували, і розвели хлористим метиленом (30мл). Розчин, що утворився, промили розчином тіосульфату натрію (2мл 1М розчину), насиченим розчином гідрокарбонату натрію (3мл), концентрованим розчином солі (5мл), висушили над сумішшю сульфату натрію і сульфату магнію, відфільтрували, і сконцентрували у вакуумі. Масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (1:1 гексан/етилацетат) що дало 120мг (вихід 67%) цільової сполуки яка мала вигляд жовтої олії. Цей продукт мав той же самий Rf (TLC) і ^1H NMR спектр (300MHz, CDCl_3) як і справжній зразок.

Іс. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу (альтернативний спосіб - 4):

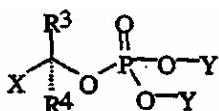


До розчину пропофолу (38мг 97%, 0,21ммоль) у хлористому метилені (1мл) додали бромід тетрабутиламонію (10мг, 0,03ммоль) і розчин гідроксиду натрію (40мг, 1ммоль) у воді (0,2мл). Гетерогенна суміш розмішувалася протягом 15 хвилин. Потім додали розчин дибензилфосфату хлорметилу (104мг, 0,32ммоль) у хлористому метилені (1мл), і реакційна суміш розмішувалася енергійно протягом восьми годин. Потім суміш розвели хлористим метиленом (10мл), промили водою (2мл), висушили над сульфатом натрію, відфільтрували, і випарували у вакуумі. Масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (гексан, 20:1 гексан/етилацетат, і 10:1 гексан/етилацетат) що дало 44мг (вихід 45%) цільової сполуки, яка мала вигляд жовтої олії. Цей продукт мав той же самий Rf (TLC) і ^1H NMR спектр (300MHz, CDCl_3) як і справжній зразок.

На додаток до вищезгаданої реакції Іс (альтернативний спосіб - 4) зрозуміло, що реактив:

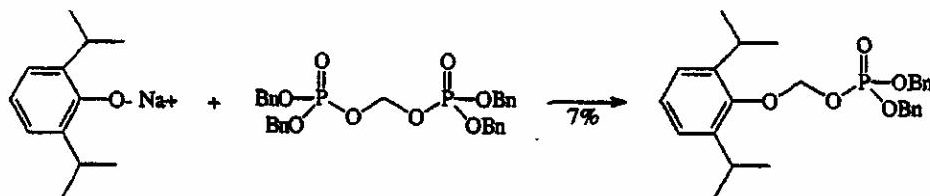


може в загальному вигляді бути представлений наступною формулою:



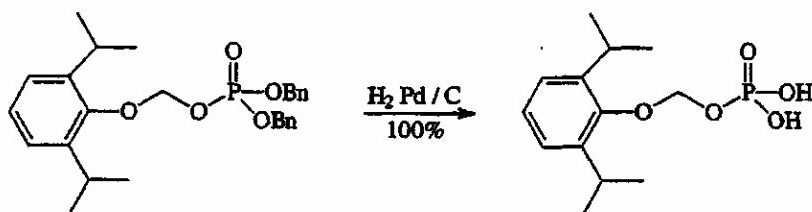
де X представляє відхідну групу, R3 і R4 - кожен, водневий атом, органічна або неорганічна група і Y - захисна група для захисту фосфорнокислої групи. Приклади відхідних груп, включають хлор, бром, йод, тозилат чи будь-яку іншу придатну відхідну групу. До захисних груп для захисту фосфорнокислої групи, включають групи, що тимчасово блокують реакційну здатність фосфорнокислої групи і дозволяють вибіркоче заміщення в реакції нуклеофільного заміщення. Приклади таких груп блокування включають, але не обмежені бензилом, аллилом, третинним бутилом та ізопропілом, етилом та β -ціаноетилом.

Іс. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу (альтернативний спосіб -5):



До суспензії гідриду натрію (36мг 60% дисперсії у мінеральному маслі, 0,91ммоль), що розмішується, у сухому диметоксиметане (2мл) під атмосферою аргону додали по краплях пропофол (172мкл 97%, 0,90ммоль) протягом більше ніж п'яти хвилин. Суміш, що утворилася, розмішувалася при кімнатній температурі протягом додаткових 20 хвилин. Потім до суміші додали розчин біс-(дибензилфосфоно)-ацеталь формальдегіду (500мг, 0,88ммоль) у сухому диметоксиметані (3мл). Реакційна суміш розмішувалася при кімнатній температурі протягом 20 годин і потім при 70°C протягом 2,5 годин. Тоді суміш відфільтрували, і розчинник випарували у вакуумі. Масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (гексан, 10:1 гексан/етилацетат, і потім 1:1 гексан/етилацетат), що дало 29мг (вихід 7%) цільової сполуки яка мала вигляд жовтої олії. Цей продукт мав той же самий Rf (TLC) і ^1H NMR спектр (300MHz, CDCl_3) як справжній зразок.

Id. Синтез О-фосфоноксиметилпропофулу:



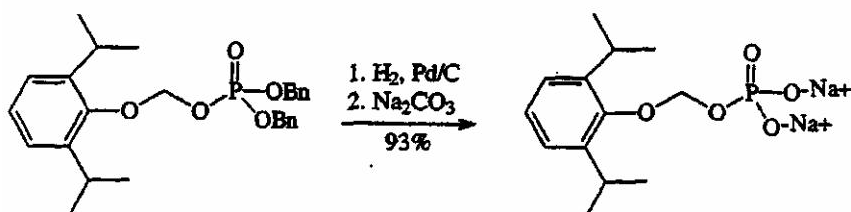
До розчину дибензилового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу (115мг, 0,245ммоль) у метанолі (10мл) додали паладій на вугліці (10%, 20мг). Ця суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 1,5 годин. Каталізатор був вилучений фільтрацією через Целіт, і фільтрат випарували при зменшеному тиску, що дало 70,5мг (вихід 100%) цільової сполуки яка мала вигляд безбарвної олії, нестійкої при кімнатній температурі.

FABMS- (GL Y): $[M-H]^-$, m/z 287.

¹H NMR (300MHz, ацетон-d₆, δ): 1,19 (d, J=6,8Hz, 12H), 3,46 (sext, J=6,8Hz, 2H), 5,45 (d, J=9,7Hz, 2H), 7,15 (m, 3H).

¹³C NMR (75MHz, ацетон d₆, δ): 24,2178, 27,1496, 94,63, 94,65, 124,08, 126,30, 142,46, 152,32.

Іе. Синтез динатрієвої солі О-фосфоноксиметилпропофолу:

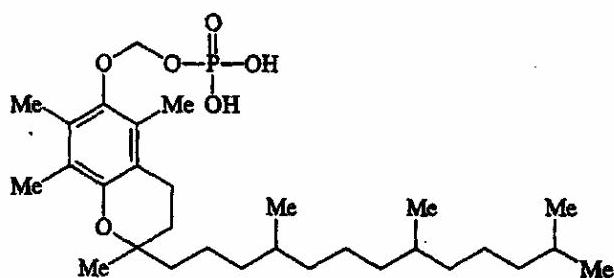


До розчину дибензильового естеру О-фосфоноксиметилпропофолу (1,05г, 2,24ммоль) у тетрагідрофурані (100мл) додали води (5мл) і паладію на вугліці (10%, 300мг). Ця суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом однієї години. Каталізатор був вилучений фільтрацією через Целіт, і фільтрат обробили розчином гідрокарбонату натрію (263мг у 3мл води, 2,12ммоль). THF випаровувався під зменшеним тиском, і залишковий водний розчин проекстрагували етером (3×3мл). Водний шар випаровувався до ступеня висушування (потік аргону, чи роторний випарник) і отриманий твердий залишок сушили протягом ночі у вакуумі, промили етером (4×4мл), гексаном (2×4мл), і знову висушили у вакуумі, щоб дало 655мг (вихід 93%) цільової сполуки яка мала вигляд білого порошку.

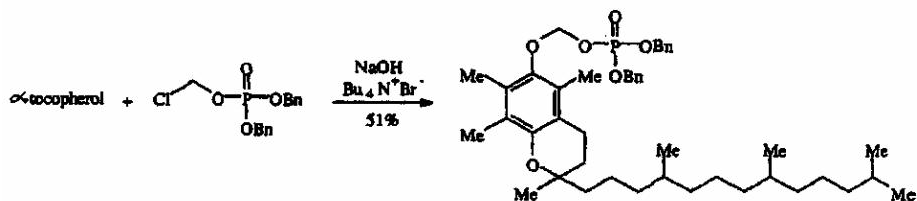
PABMS- (GLY): $[M-2Na+H]^-$, m/z 287.

¹H NMR (300MHz, D₂O, δ): 1,22 (d, J=7,0Hz, 12H), 3,46 (hept, J=6,9Hz, 2H), 5,27 (d, J=7,5Hz, 2H), 7,28 (m, 3H).

II. Синтез О-фосфоноксиметил- α -токоферолу



II. Синтез дибензилового эфиру О-фосфоноксиметил- α -токоферолу:

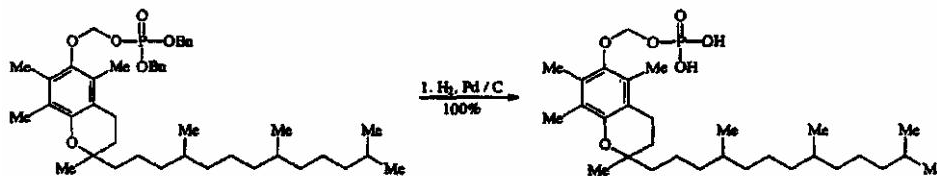


До розчину дибензилфосфату хлорметилу (323мг, 0,98ммоль), α -токоферолу (409мг 97%, 0,92ммоль), і броміду тетрабутиламонію (301мг, 0,92ммоль) у бензолі (5мл) додали водний розчин гідроксиду натрію (150мг у 0,2мл води, 3,7ммоль). Реакційна суміш, що утворилася, енергійно розмішувалася при кімнатній температурі протягом двох годин під атмосферою аргону. Потім суміш була розведена бензолом (10мл), промита водою (3×3мл), висушена над сульфатом магнію, відфільтрували, і потім випаровували під зменшеним тиском. Коричневий масляний залишок очистили за допомогою флеш хроматографії на

силікагелі (10:1 гексан/етилацетат) що дало 336мг (вихід 51%) цільової сполуки яка мала вигляд жовтої олії.
FABMS+(NBA): $[M]^+$, m/z 720.

^1H NMR (500MHz, CDCl_3 , δ): 0,85 (m, 12H), 1,21 (s, 3H), 1,27 (m, 24H), 1,75 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 2,11 (s, 3H), 2,14 (s, 3H), 2,54 (t, J=6,8Hz, 2H), 4,97 (m, 4H), 5,20 (d, J=9,3Hz, 2H), 7,31 (m, 10H).

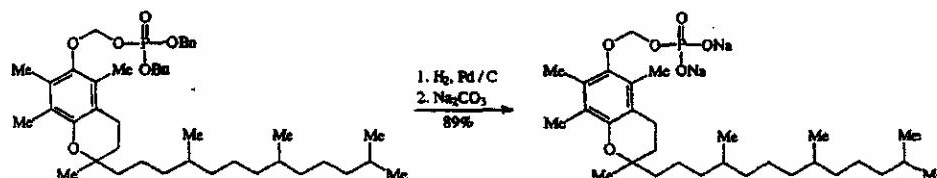
IIb. Синтез О-фосфоноксиметил- α -токоферолу:



До розчину дибензильового естеру О-фосфоноксиметил- α -токоферолу (88мг, 0,12ммоль) у тетрагідрофурані (10мл) додали паладій на вуглі (10%, 15мг). Суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 10 хвилин (як показала тонкошарова хроматографія реакція закінчилась після 5 хвилин). Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт, фільтрат випаровувався при пониженому тиску, і потім висушувався у вакуумі. Отримали 70мг цільової сполуки (вихід 100%) у вигляді коричневої олії, що була нестійкою при кімнатній температурі.

FABMS+(NBA): $[M]^+$, m/z 540; $[M+\text{Na}]^+$, m/z 563; (NBA+Li): $[M+\text{Li}]^+$, m/z 547.

IIc. Синтез динатрієвої солі О-фосфоноксиметил- α -токоферолу:

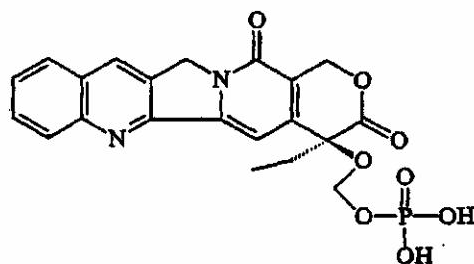


До розчину дибензильового естеру О-фосфоноксиметил- α -токоферолу (100мг, 0,14ммоль) у тетрагідрофурані (10мл) додали паладій на вуглі (10%, 18мг). Суміш розмішували під атмосферою водню (1атм) протягом 5 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт, фільтрат випаровувався при кімнатній температурі і зменшеному тиску, залишок, що залишився, розчинили в етері (2мл). Потім етерний розчин обробили водним розчином гідроксиду натрію (11,2мг у 100мл води, 0,28ммоль), і суміш, що утворилася, розмішували при кімнатній температурі протягом 10хв. Етерну фазу вилучили, а водяну фазу промили етером (3x3мл) і потім висушили у вакуумі протягом 20 годин, що дало 73мг (вихід 89%) цільової сполуки яка мала вигляд сірої твердої речовини.

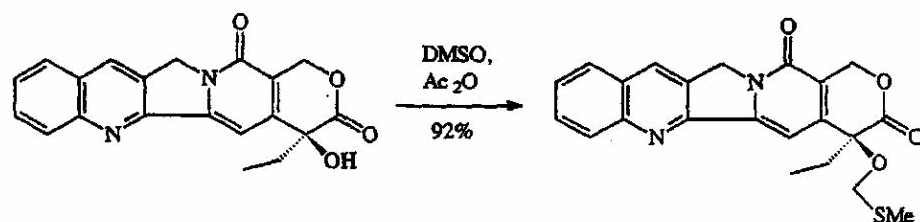
FABMS+ (TG/G): $[\text{MH}]^+$, m/z 585; $[M+\text{Na}]^+$, m/z 607.

Далі буде деталізовано синтез розчинних у воді похідних камптотецину:

III. Способи синтезу 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину.



IIIa. Синтез 20-О-метилтіометилкамптотецину:



До суспензії камптотецину (5,0г, 14,3ммоль) у диметилсульфоксиді (250мл) додали оцтового ангідриду (125мл) та оцтової кислоти (35мл). Гетерогенна суміш енергійно розмішувалася при кімнатній температурі протягом 24 годин, вилили на лід (800мл), розмішували протягом 30 хвилин, і потім екстрагували хлористим метиленом (4x100мл). Об'єднані екстракти хлористого метилена промили водою (2x100мл) та висушили над сульфатом магнію. Хлористий метилен вилучили при пониженому тиску, що дало коричневату тверду речовину. Твердий залишок розчинили у мінімальному об'ємі хлористого метилена. Цей розчин профільтрували і розвели з 10-кратним надлишком гексану і потім залишили на ніч в холодильнику. Осад,

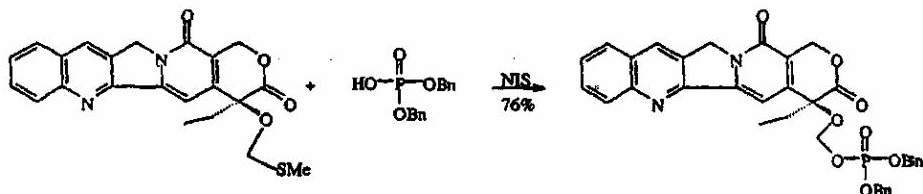
що випав, відфільтрували, промили декілька разів гексаном, і висушили, що дало 5,38г (вихід 92%) цільової сполуки у вигляді світло-коричневого порошку. α^D_{20} -123,6 (с 0,55, CDCl_3).

FABMS+ (NBA): $[\text{MH}]^+$ m/z 409.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , δ): 0,93 (t, J=7,2Hz, 3H), 2,11 (sext, J=7,6Hz, 1H), 2,29 (sext, J=7,6Hz, 1H), 2,30 (s, 3H), 4,58 (s, 2H), 5,33 (s, 2H), 5,40 (d, J=17,2Hz, 1H), 5,62 (d, J=17,3Hz, 1H), 7,48 (s, 1H), 7,69 (t, J=7,1Hz, 1H), 7,86 (t, J=7,1Hz, 1H), 7,96 (d, J=8,1Hz, 1H), 8,25 (d, J=8,5Hz, 1H), 8,42 (s, 1H).

^{13}C NMR (75MHz, CDCl_3 , δ): 7,76, 14,89, 33,90, 49,92, 66,68, 71,02, 76,57, 97,51, 122,63, 128,02, 128,09, 128,30, 129,71, 130,64, 131,11, 145,14, 146,10, 148,88, 152,27, 157,43, 169,34, 169,73.

ПІв- Синтез дибензилового естеру 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:



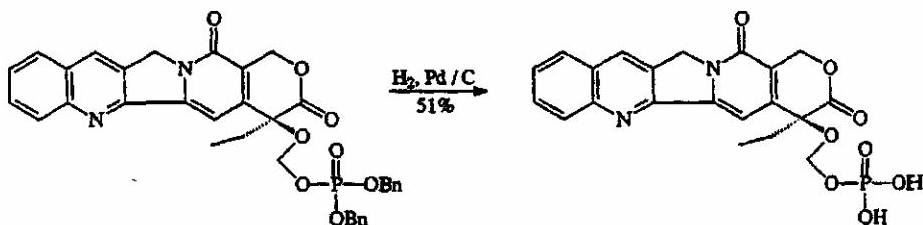
До суспензії 20-О-метилтіометилкамптотецину (1,00г, 2,44ммоль) та розтертих в порошок, активізованих 4 Åмолекулярних сит (5г) у тетрагідрофурані (20мл), при доброму розмішуванні, додали суспензію N-йодсукциніміду (2,00г 95%, 8,44ммоль) та дибензилфосфату (2,20г, 7,83ммоль) у хлористому метилені (12мл). Суміш, що утворилася, енергійно розмішувалася при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, потім її відфільтрували, і розвели етилацетатом (300мл). Розчин промили водним тиосульфатом натрію (10%, 2×15мл), водою (2×20мл), насиченим розчином солі (50мл), і висушили над сульфатом магнію. Суміш відфільтрували, і розчинник випарували під зменшеним тиском. Коричневий масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (98:2 етилацетат/метанол) і висушений у вакуумі протягом ночі, що дало 1,19г (вихід 76%) цільової сполуки у вигляді жовтої піни. α^D_{20} -43,1 (с 0,55, CDCl_3).

FABMS + (NBA): $[\text{MH}]^+$, m/z 639.

^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , δ): 0,91 (t, J=7,4Hz, 3H), 2,09 (sext, J=7,4Hz, 1H), 2,26 (sext, J=7,4Hz, 1H), 5,06 (m, 4H), 5,28 (m, 3H), 5,35 (d, J=17,0Hz, 1H), 5,48 (2xd, J=10,5Hz, 1H), 5,64 (d, J=17,3Hz, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,67 (t, J=7,0Hz, 1H), 7,80 (t, J=7,1Hz, 1H), 7,94 (d, J=8,0Hz, 1H), 8,13 (d, J=8,5Hz, 1H), 8,35 (s, 1H).

^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3 , δ): 7,73, 29,53, 32,49, 49,86, 66,74, 69,37, 69,44, 78,48, 88,99, 89,04, 98,09, 121,55, 127,65, 127,70, 127,90, 128,01, 128,25, 128,35, 128,36, 129,62, 130,48, 130,97, 135,45, 135,55, 145,47, 145,82, 148,76, 152,15, 157,18, 168,67.

ПІс. Синтез 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:



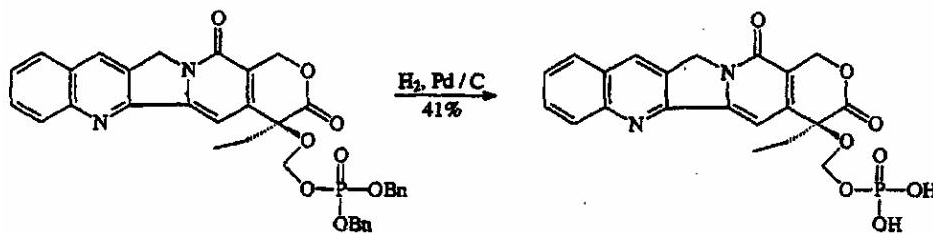
До розчину дибензилового естеру 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (500мг, 0,78ммоль) у тетрагідрофурані (100мл) і воді (5мл) додали паладій на вугліці (10%, 500мг). Ця суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 35 хвилин. Каталізатор був вилучений фільтрацією через Целіт. Потім Целіт промили тетрагідрофураном (300мл) і об'єднані фільтрати випаровувалися при пониженому тиску. Зелену тверду речовину, що утворилася промили етером (2×20мл), гексаном (50мл), висушили у вакуумі, і потім розчинили у гарячому метанолі (60мл). Розчин відфільтрували, сконцентрували при зниженому тиску до об'єму ~10мл. Після відстоювання при кімнатній температурі протягом однієї години, розчин помістили у холодильник на ніч. Кристалічний осад, що утворився протягом ночі, відфільтрували і висушили у вакуумі, що дало 155мг цільової сполуки як мала вигляд твердої речовини жовтого кольору. Фільтрат був сконцентрований до об'єму ~1мл і зберігався в холодильнику протягом однієї години, що дало додатково 28мг продукту. Повний вихід: 183мг (51%).

FABMS+ (NBA): $[\text{MH}]^+$, m/z 459, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 481.

^1H NMR (400MHz, D_2O , δ): 0,95 (t, J=7,5Hz, 3H), 2,25 (m, 2H), 4,98 (d, J=5,0Hz, 2H), 5,14 (2xd, J=9,3Hz, 1H), 5,22 (2xd, J=8,9Hz, 1H), 5,48 (d, J=17,0Hz, 1H), 5,60 (d, J=16,9Hz, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,56 (t, J=7,7Hz, 1H), 7,77 (t, J=7,2Hz, 1H), 7,86 (d, J=8,2Hz, 1H), 8,01 (d, J=8,5Hz, 1H), 8,44 (s, 1H).

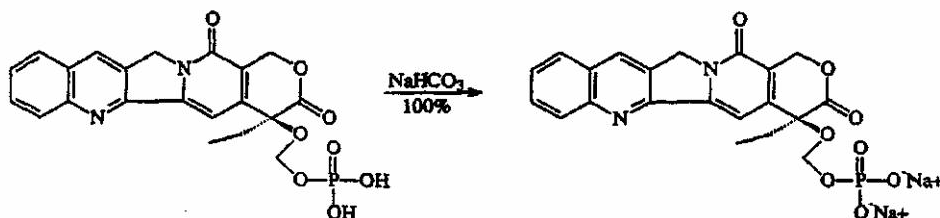
Хімічна структура і чистота продукту були також підтверджені ^1H NMR спектроскопією його динатрієвої солі, що була отримана з кислоти і двох мольних еквівалентів бікарбонату натрію в D_2O .

IIIc. Синтез 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (альтернативний шлях):



До розчину дибензилового естеру 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (500мг, 0,78ммоль) у тетрагідрофурані (100мл) і воді (5мл) додали паладій на вуглці (10%, 500мг). Суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 30 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт. Целіт промили тетрагідрофураном (2×100мл), і об'єднані фільтрати обробили водяним розчином гідрокарбонату натрію (97мг у 2мл воді, 0,78ммоль). Тетрагідрофуран випаровувався при зниженому тиску, і гетерогенний водний залишок розвели водою (10мл) і екстрагували етилацетатом (2×3мл). Жовтий гомогенний розчин, що утворився, підкислили соляною кислотою (10%) до pH=1. Осад, що утворився, відфільтрували і висушили у вакуумі протягом ночі, що дало 145мг (вихід 41%) цільової сполуки у вигляді жовтої твердої речовини.

IIIд. Синтез динатрієвої солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:

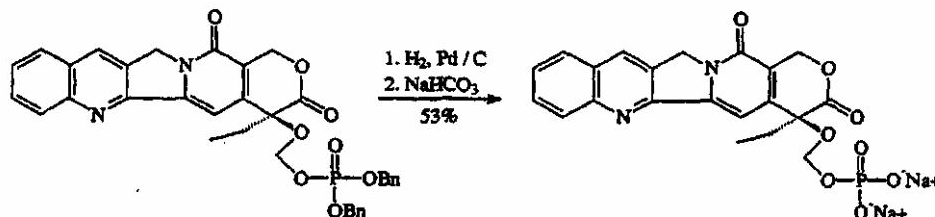


До суспензії 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (5мг, 10,9ммоль) у дейтерованій воді (0,5мл) додали розчин бікарбонату натрію в дейтерованій воді (50мкл 0,44М розчину = 22мкмоль). Потім ультразвуком протягом декількох хвилин зруйнували частинки, що дало жовтий гомогенний розчин цільового продукту.

^1H NMR (400MHz, D_2O , після 10хв., 96% лактону, 4% карбоксилату, δ): 1,05 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H), 2,27 (m, 2H), 4,57 (d, $J=18,8\text{Hz}$, 1H), 4,70 (d, $J=18,9\text{Hz}$, 1H), 5,06 (dd, $J=8,3$, $J=5,4\text{Hz}$, 1H), 5,18 (dd, $J=7,6$, $J=5,5\text{Hz}$, 1H), 5,45 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 5,59 (d, $J=16,8\text{Hz}$, 1H), 7,34 (t, $J=7,1\text{Hz}$, 1H), 7,41 (s, 1H), 7,60 (m, 2H), 7,81 (d, $J=8,3\text{Hz}$, 1H), 8,17 (s, 1H).

IIIд. Синтез динатрієвої солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину

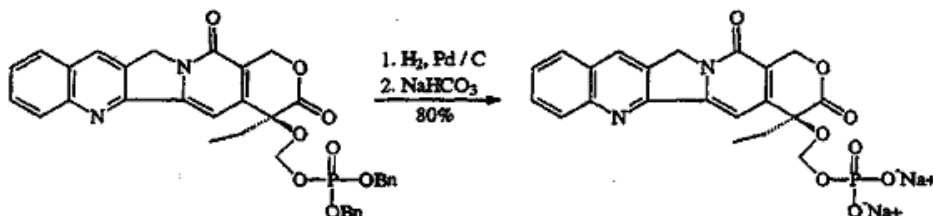
(альтернативний шлях 1):



До розчину дибензилового естеру 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (78мг, 0,122ммоль) у тетрагідрофурані (10мл) та воді (3мл) додали паладій на вуглці (10%, 80мг). Суміш розмішували під атмосферою водню (1атм) протягом 30 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт, і фільтрат обробили розчином гідрокарбонату натрію (20мг у 0,5мл воді, 0,238ммоль). Жовтий осад фільтрували, промили хлористим метиленом, і висушили у вакуумі, що дало 35мг (вихід 57%) цільової сполуки (тверда речовина світло-коричневого кольору) як суміш його лактонної (82%) та карбоксильної (18%) форм (визначено за допомогою ^1H NMR).

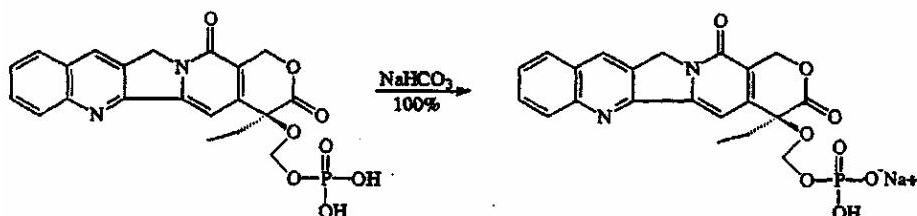
IIIд. Синтез динатрієвої солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину

(альтернативний шлях 2):



До розчину дибензилового естеру 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (500мг, 0,78ммоль) у тетрагідрофурані (100мл) і воді (5мл) додали паладій на вуглеці (10%, 500мг). Ця суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 30 хвилин. Каталізатор був вилучений фільтрацією через Целіт. Целіт промили тетрагідрофураном (50мл), і об'єднані фільтрати обробили водним розчином гідрокарбонату натрію (90мг у 2мл води, 0,72ммоль). Тетрагідрофуран випаровувався при зменшеному тиску, і залишок розчинили у воді (15мл). Гетерогенну суміш екстрагували етилацетатом (2×15мл) та етером (20мл) і водний гомогенний розчин, що утворився, випаровувався до ступеня висушування під потоком аргону при кімнатній температурі. Залишок був висушений у вакуумі протягом ночі, що дало 290мг (вихід 80%) цільової сполуки (твердої, цитрусового кольору) як суміш його форми лактону (60%), та його карбоксилатної форми (40%), і незначної кількості побічних продуктів (^1H NMR).

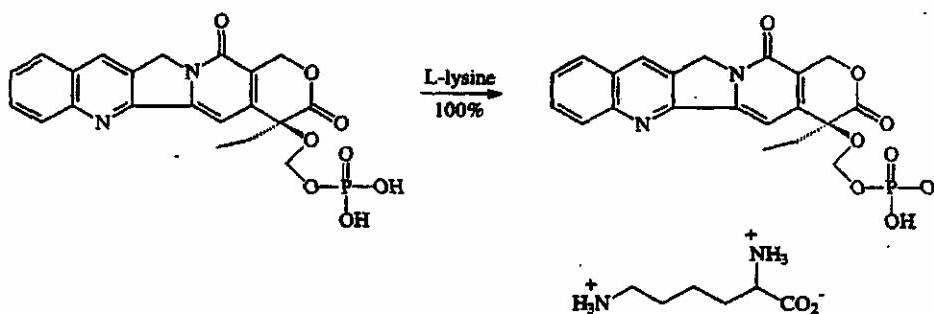
IIIe. Синтез мононатрієвої солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:



При безупинному ультразвуковому руйнуванні частинок суспензії 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (5мг, 10ммоль) в дейтерованій воді (0,5мл) додали по краплинам розчин гідрокарбонату натрію в дейтерованій воді, поки не досягнули повної гомогенізації (21мкл, 0,44М розчин = 9,2мкмоль). Отримали жовтий гомогенний розчин цільової сполуки.

^1H NMR (400MHz, D_2O , δ): 1,00 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 3H), 2,23 (m, 2H), 4,40 (d, $J=18,8\text{Hz}$, 1H), 4,50 (d, $J=18,8\text{Hz}$, 1H), 5,10 (dd, $J=9,7$, $J=5,9\text{Hz}$, 1H), 5,26 (dd, $J=9,0$, $J=6,1\text{Hz}$, 1H), 5,39 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 5,50 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 7,20 (t, $J=7,3\text{Hz}$, 1H), 7,28 (s, 1H), 7,46 (m, 2H), 7,66 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 1H), 8,02 (s, 1H).

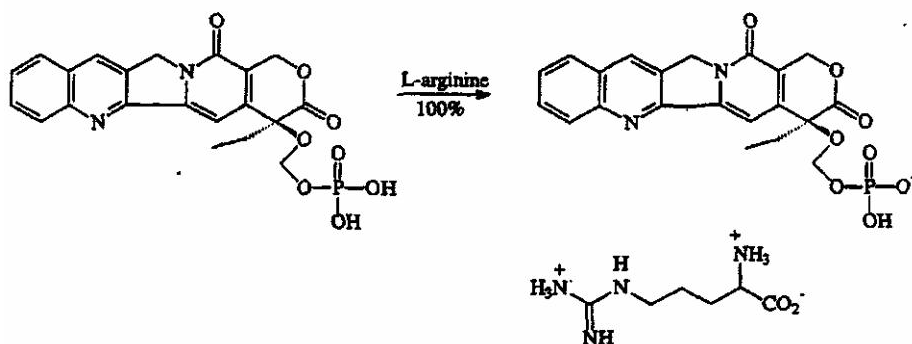
IIIf. Синтез лізинової солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:



При безупинному ультразвуковому руйнуванні частинок суспензії 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (5мг, 10ммоль) в дейтерованій воді (0,5мл) додали по краплинам розчин L-лізину у дейтерованій воді (25мкл 0,43М розчину = 10,7мкмоль), поки не досягнули повної гомогенізації. Отримали жовтий гомогенний розчин цільової сполуки.

^1H NMR (400MHz, D_2O , 94% лактону, 6% карбоксилату, δ): 1,02 (t, $J=7,2\text{Hz}$, 1H), 1,49 (m, 2H), 1,73 (m, 2H), 1,88 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 3,03 (t, $J=7,5\text{Hz}$, 2H), 3,76 (t, $J=6,0\text{Hz}$, 1H), 4,43 (d, $J=19,0\text{Hz}$, 1H), 4,52 (d, $J=18,9\text{Hz}$, 1H), 5,11 (dd, $J=9,7$, $J=5,8\text{Hz}$, 1H), 5,27 (dd, $J=9,2$, $J=5,8\text{Hz}$, 1H), 5,41 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 5,53 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 7,23 (t, $J=7,4\text{Hz}$, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,49 (m, 2H), 7,68 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 1H), 7,04 (s, 1H).

IIIg. Синтез аргінінової солі 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину:

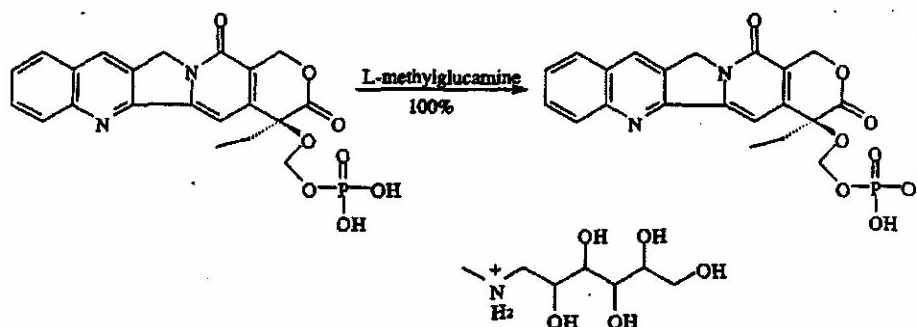


При безупинному ультразвуковому руйнуванні частинок суспензії 20-О-фосфоноксиметилкамптотецину (5мг, 10ммоль) в дейтерованій воді (0,5мл) додали по краплинам розчин L-аргініну у дейтерованій воді (27мкл 0,40М розчину = 10,8мкмоль), поки не досягнули повної гомогенізації.

Отримали жовтий гомогенний розчин цільової сполуки.

^1H NMR (400MHz, D_2O , δ): 1,02 (t, $J=7,1\text{Hz}$, 1H), 1,66 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 2,25 (m, 2H), 3,20 (t, $J=6,8\text{Hz}$, 2H), 3,77 (t, $J=6,0\text{Hz}$, 1H), 4,40 (d, $J=19,0\text{Hz}$, 1H), 4,49 (d, $J=18,8\text{Hz}$, 1H), 5,12 (dd, $J=9,7$, $J=6,0\text{Hz}$, 1H), 5,29 (dd, $J=8,8$, $J=6,1\text{Hz}$, 1H), 5,40 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 5,51 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 7,20 (t, $J=7,3\text{Hz}$, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,47 (m, 2H), 7,66 (d, $J=8,3\text{Hz}$, 1H), 8,03 (s, 1H).

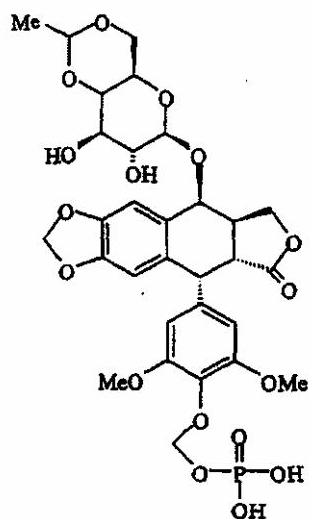
IIIh. Синтез N-метилглюкамінової солі 20-O-фосфоноксиметилкамптотецину:



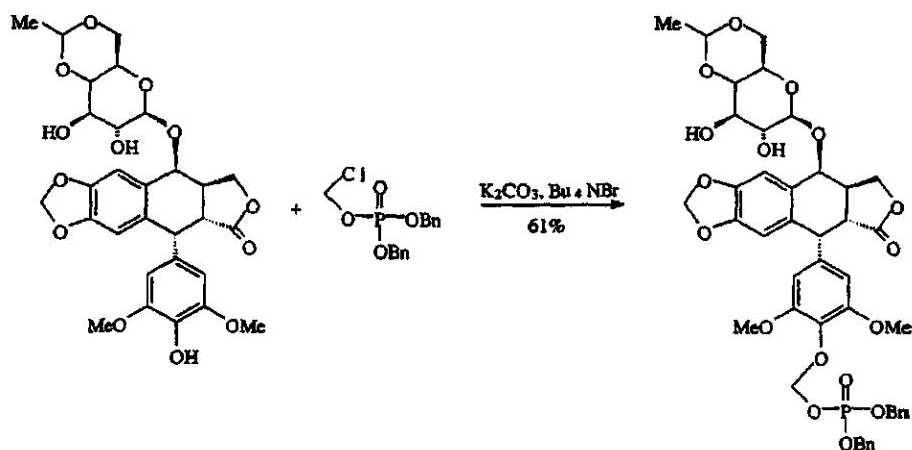
При безупинному ультразвуковому руйнуванні частинок суспензії 20-O-фосфоноксиметилкамптотецину (5мг, 10моль) в дейтерованій воді (0,5мл) додали по краплинам розчин N-метилглюкаміну у дейтерованій воді (21мл 0,51М розчину = 10,7мкмоль), поки не досягнули повної гомогенізації. Отримали жовтий гомогенний розчин цільової сполуки.

^1H NMR (400MHz, D_2O , δ): 1,02 (t, $J=7,3\text{Hz}$, 3H), 2,25 (m, 2H), 2,78 (s, 3H), 3,20 (m, 2H), 3,65 (m, 2H), 3,80 (m, 3H), 4,11 (m, 1H), 4,44 (d, $J=18,9\text{Hz}$, 1H), 4,53 (d, $J=19,0\text{Hz}$, 1H), 5,12 (dd, $J=9,8$, $J=5,9\text{Hz}$, 1H), 5,27 (dd, $J=9,2$, $J=5,9\text{Hz}$, 1H), 5,41 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 5,53 (d, $J=16,7\text{Hz}$, 1H), 7,23 (t, $J=7,4\text{Hz}$, 1H), 7,49 (m, 2H), 7,69 (d, $J=8,4\text{Hz}$, 1H), 8,05 (s, 1H).

IV. Синтез 4'-O-фосфоноксиметилтопозиду:



IVa. Синтез дибензилowego естеру 4'-O-фосфоноксиметилтопозиду:



До розчину дибензилфосфату хлорметилу (670мг, 2,05моль), етопозиду (300мг, 0,51моль), та броміду тетрабутиламонію (164,4мг, 0,51моль) у тетрагідрофурані (0,5мл) додали розтертий карбонат калію (352,4мг, 2,55моль). Реакційна суміш, що утворилася, енергійно розмішувалася при кімнатній

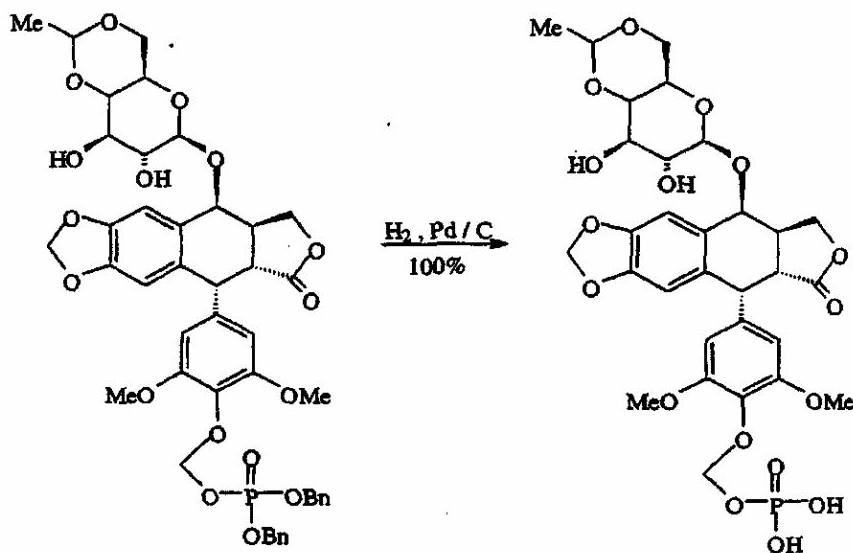
температурі протягом 35 хвилин. Потім суміш очистили за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (30:1 метиленхлорид/метанол), що дало 272мг (вихід 61%) цільової сполуки яка мала вигляд білої твердої речовини, з вмістом транс-ізомеру більше ніж 95%.

FABMS+ (NBA): $[MH]^+$, m/z 879.

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$, δ): 1,41 (d, $J=5,0$ Hz, 3H), 2,79 (br s, 1H), 2,86 (m, 1H), 2,97 (br s, 1H), 3,30 (dd, $J=14,2$, $J=5,3$ Hz, 1H), 3,35 (m, 2H), 3,45 (t, $J=8,5$, $J=8,0$ Hz, 1H), 3,59 (m, 1H), 3,66 (s, 6H), 3,74 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,20 (t, $J=8,5$, $J=8,0$ Hz, 1H), 4,42 (dd, $J=10,3$, $J=9,1$ Hz, 1H), 4,60 (d, $J=5,2$ Hz, 1H), 4,64 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 4,76 (q, $J=5,0$ Hz, 1H), 4,92 (d, $J=3,4$ Hz, 1H), 5,03 (dd, $J=7,3$, $J=4,3$ Hz, 4H), 5,54 (dd, $J=11,7$, $J=5,1$ Hz, 1H), 5,59 (dd, $J=11,3$, $J=5,1$ Hz, 1H), 5,99 (d, $J=3,5$ Hz, 2H), 6,26 (s, 2H), 6,51 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 7,33 (m, 10H).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$, δ): 20,21, 37,49, 41,00, 43,78, 56,07, 66,32, 67,87, 67,97, 69,06, 69,14, 73,01, 73,29, 74,47, 79,70, 92,55, 92,62, 99,70, 101,57, 101,72, 107,89, 109,13, 110,55, 127,82, 127,97, 128,15, 128,35, 128,43, 132,40, 133,08, 135,68, 135,78, 136,49, 147,14, 148,73, 152,18, 174,90.

IVb. Синтез 4'-О-фосфоноксиметилтопозиду:

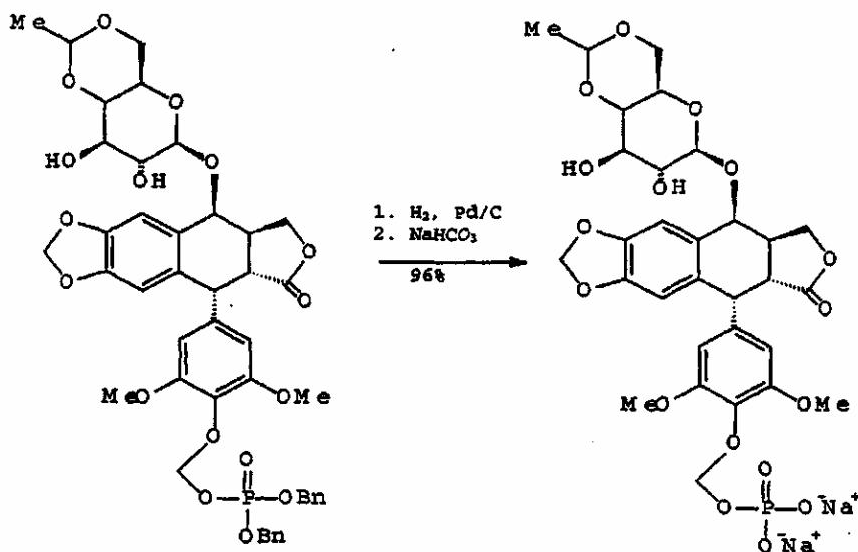


До розчину дибензилового естеру 4'-О-фосфоноксиметилтопозиду (20,5мг, 0,023ммоль) у тетрагідрофурані (2мл) додали паладій на вуглеці (10%, 5мг). Суміш розмішувалася під атмосферою водню (1атм) протягом 10 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт, і тетрагідрофуран випарували при зменшеному тиску. Залишок, що утворився, був висушений у вакуумі, що дало 16мг (вихід 100%) цільової сполуки яка мала вигляд білої твердої речовини.

FABMS+ (NBA): $[MH]^+$, m/z 699.

1H NMR (400MHz, $CDCl_3/DMSO-d_6$, δ): 1,29 (d, $J=5,0$ Hz, 3H), 2,78 (m, 1H), 3,21 (m, 2H), 3,29 (t, $J=8,6$, $J=7,8$ Hz, 1H), 3,37 (dd, $J=14,0$, $J=5,3$ Hz, 1H), 3,52 (m, 2H), 3,62 (s, 6H), 4,09 (m, 1H), 4,17 (t, $J=8,1$ Hz, 1H), 4,38 (dd, $J=8,8$, $J=8,7$ Hz, 1H), 4,44 (d, $J=7,6$ Hz, 1H), 4,48 (d, $J=5,3$ Hz, 1H), 4,66 (q, $J=5,0$ Hz, 1H), 4,88 (d, $J=3,3$ Hz, 1H), 5,05 (br s, 7H), 5,40 (dd, $J=10,7$, $J=7,8$ Hz, 1H), 5,43 (dd, $J=10,4$, $J=7,5$ Hz, 1H), 5,89 (dd, $J=8,8$ Hz, 1H), 6,18 (s, 2H), 6,41 (s, 1H), 6,78 (s, 1H).

IVc. Синтез динатрієвої солі 4'-О-фосфоноксиметилтопозиду:



До розчину дибензилового естеру 4'-О-фосфоноксиметилтопозиду (200мг, 0,227ммоль) у тетрагідрофурані (10мл) додали паладій на вуглеці (10%, 45мг). Цю суміш розмішували під атмосферою водню протягом 10 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт, і тетрагідрофуран випарували при зменшеному тиску. Залишок, що утворився, був висушений у вакуумі, що дало 195мг (вихід 96%) цільової сполуки яка мала вигляд білої твердої речовини.

водню (1атм) протягом 25 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт. Фільтрат випарували при зменшеному тиску, і залишок висушили у вакуумі. Білий твердий залишок, розчинили у водяному розчині гідрокарбонату натрію (2,9мл 0,136М=0,394ммоль). Гетерогенну суміш, що утворилася, змішали з активованим вугіллем, перемішували протягом декількох хвилин, і потім відфільтрували через 40мкм фільтр. Гомогенний, безбарвний фільтрат був ліофілізований, що дало 140мг (вихід 96%) цільової білої твердої сполуки з більшим ніж 95% збереженням стереохімії зв'язків.

FABMS+ (NBA): $[MH]^+$, m/z 743, $[M-Na+2H]^+$, m/z 721, $[M-2Na+3H]^+$, m/z 699.

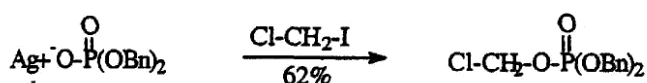
1H NMR (400MHz, D_2O , δ): 1,37 (d, J=5,1Hz, 3H), 3,10 (m, 1H), 3,37 (dd, J=8,9, J=8,0Hz, 1H), 3,48 (m, 2H), 3,65 (m, 3H), 3,75 (s, 6H), 4,29 (dd, J=10,4, J=4,5Hz, 1H), 4,41 (t, J=8,3, J=8,0Hz, 1H), 4,49 (dd, J=10,5, J=8,9Hz, 1H), 4,68 (d, J=5,7Hz, 1H), 4,74 (d, J=7,8Hz, 1H), 4,91 (q, J=5,0Hz, 1H), 5,13 (d, J=3,0Hz, 1H), 5,26 (2xd, J=5,3, J=3,3Hz, 1H), 5,28 (2xd, J=5,3, J=3,3Hz, 1H), 5,98 (d, J=10,5Hz, 2H), 6,40 (c, 2H), 6,58 (s, 1H), 7,00 (s, 1H).

^{13}C NMR (125MHz, D_2O , δ): 22,13, 40,74, 43,56, 46,11, 59,12, 68,70, 70,41, 72,40, 75,46, 75,95, 76,95, 82,46, 94,87, 102,88, 103,66, 104,62, 111,14, 112,82, 113,23, 130,73, 135,45, 135,74, 140,22, 149,56, 151,43, 154,94, 166,36, 181,61.

^{31}P NMR (200MHz, D_2O , δ): s (2,19).

V. Синтез фосфоноксиметилуючих агентів.

Va. Синтез хлорметилдобензилфосфату



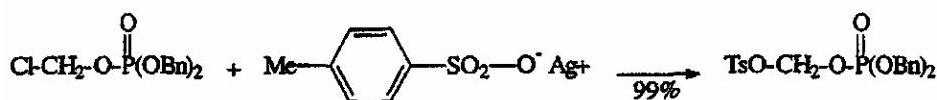
До нагрітого зі зворотним холодильником розчину хлорйодметану (25г 97%, 0,14ммоль) у толуолі (HPLC-марка, 30мл) додавали декількома частинах більш ніж 20 хвилин добензилфосфат срібла (7,0г, 0,018ммоль). Нагрівання зі зворотним холодильником продовжили протягом однієї години. Після того, як реакційна суміш остигла до кімнатної температури і фільтрування, розчинник випарували під зменшеним тиском. Масляний залишок був очищений за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (7:3 гексан/етилацетат) що дало 3,63г (вихід 62%) цільової сполуки у вигляді жовтої маслянистої речовини.

FABMS+ (NBA): $[MH]^+$, m/z 327.

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ): 5,10 (d, J=8,0Hz, 4H), 5,63 (d, J=15,7Hz, 2H), 7,36 (s, 10H).

^{13}C NMR (75MHz, $CDCl_3$, δ): 69,68, 69,75, 73,33, 73,42, 127,93, 128,51, 128,63, 135,07.

Vb. Синтез добензил-(п-толуолсульфонметил)-фосфату:

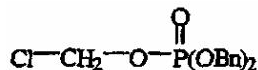


До розчину п-толуолсульфонату срібла (600мг, 2,15ммоль) у сухому ацетонітрилі (3мл), при перемішуванні додали добензилфосфат хлорметилу (150мг, 0,46ммоль) під атмосферою аргону. Після того, як реакційна суміш розмішувалася протягом 21 годин при кімнатній температурі, розчинник вилучили, і залишок екстрагували етером (3×3мл). Об'єднані екстракти профільтрували, випарували, і висушили у вакуумі, що дало 210мг (вихід 99%) цільової сполуки у вигляді білої твердої речовини.

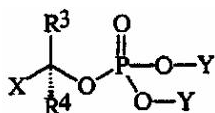
EIMS: $[MH]^+$, m/z 463.

1H NMR (300MHz, $CDCl_3$, δ): 2,37 (s, 3H), 4,91 (2xd, J=7,9Hz, 4H), 5,61 (d, J=14,2Hz, 2H), 7,29 (m, 12H), 7,78 (d, J=8,4Hz, 2H).

Щодо вищезгаданої реакції Vb, як пояснено також у Ic вище, реактив:

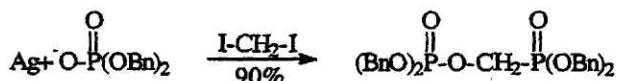


Може в бути в загальному вигляді представлений наступною формулою:



Де всі позначення мають ті ж самі значення як описано вище. Vc.

Vc. Синтез формальдегід-біс(добензилоксифосфоно)ацеталю:



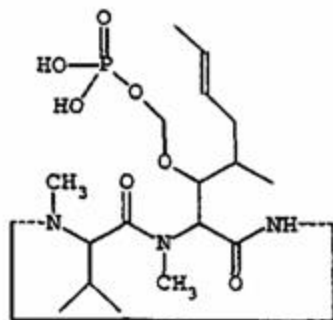
До розчину дийодметану (4мл, 50ммоль) у сухому толуолі (15мл) додали дибензилфосфат срібла (3,0г, 7,8ммоль). Суміш, що утворилася, нагріли зі зворотним холодильником протягом 15 хвилин під атмосферою аргону. Потім суміш охолодили до кімнатної температури і відфільтрували. Потім розчинник випарували у вакуумі. Масляний залишок очистили за допомогою флеш хроматографії на силікагелі (1:1 гексан/етилацетат і потім етилацетат), отримавши жовтувату олію, що закристалізувалася, отримали 1,97г (вихід 90%) цільової сполуки у вигляді білої твердої речовини, з температурою плавлення 39-42°C.

CIMS (NH₃): [MH]⁺, m/z 569.

¹H NMR (300MHz, CDCl₃, δ): 5,03 (d, J=7,9Hz, 8H), 5,49 (t, J=14,3Hz, 2H), 7,30 (m, 20H).

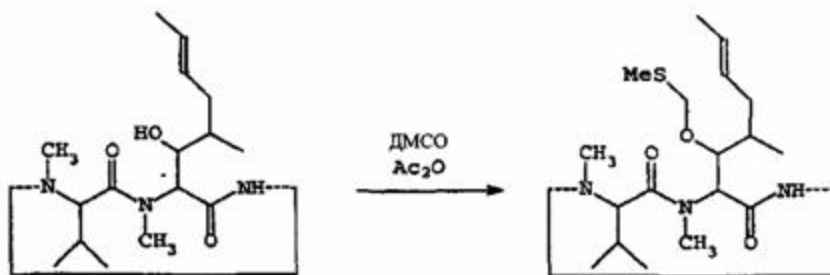
¹³C NMR (75MHz, CDCl₃, δ): 69,54, 69,61, 86,48, 127,88, 128,48, 128,55, 135,10, 135,20.

VI - Синтез О-фосфоноксиметилциклоспорину А:



Циклоспорин А

VIa. Синтез О-метилтіометилциклоспорину А:

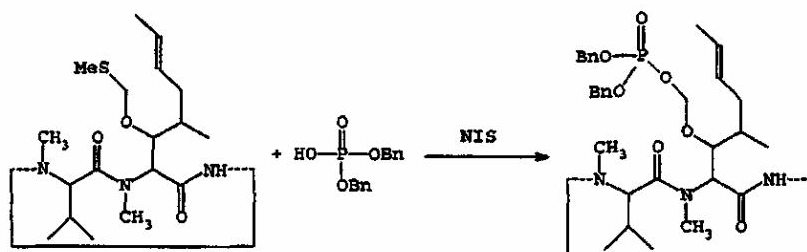


Циклоспорин

Циклоспорин А

До суспензії циклоспорину в диметилсульфоксиді (250мл) - додали оцтового ангідриду (125мл) та оцтової кислоти (35мл). Гетерогенна суміш енергійно розмішувалась при кімнатній температурі протягом 24 годин, потім її вилили на лід (800мл), розмішували протягом 30 хвилин, і потім екстрагували хлористим метиленом (4×100мл). Об'єднані екстракти хлористого метилена промили водою (2×100мл) і висушили над сульфатом магнію. Хлористий метилен вилучили при зменшеному тиску, дало продукт. Продукт далі очистили хроматографією на силікагелі.

VIb. Синтез дибензилового естеру О-фосфоноксиметилциклоспорину А:

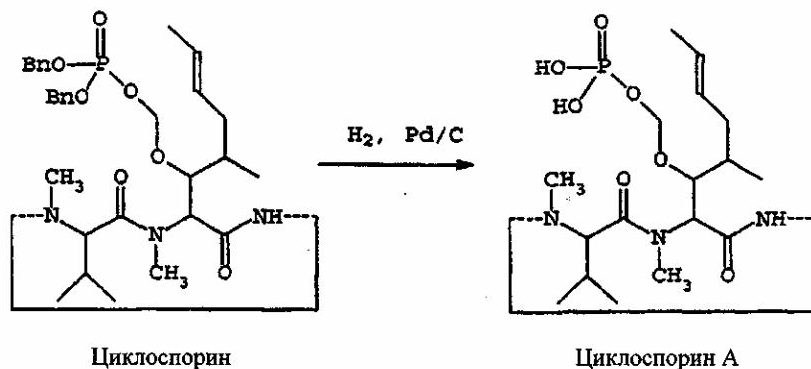


Циклоспорин

Циклоспорин А

До суспензії О-метилтіометилциклоспорину і розтертих у порошок активованих 4А млекулярних сит (5г) у тетрагідрофурани (20мл), при доброму перемішуванні, додали суспензію N-йодсукциніміду (2,00г 95%, 8,44ммоль) і дибензилфосфату (2,20г, 7,83ммоль) у хлористому метилені (12мл). Суміш, що утворилася, енергійно розмішувалась при кімнатній температурі протягом 30 хвилин, відфільтрували, і розвели етилацетатом (300мл). Розчин промили водним тіосульфатом натрію (10%, 2×15мл), водою (2×20мл), насиченим розчином солі (50мл), і висушили над сульфатом магнію. Суміш відфільтрували, і розчинник випарували при зменшеному тиску. Залишок очистили за допомогою флеш хроматографії на силікагелі.

VIc. Синтез О-фосфоноксиметилциклоспорину А:



До розчину дибензилового естеру О-фосфоноксиметилциклоспорину у тетрагідрофурані (100мл) та воді (5мл) - додали паладій на вуглі (10%, 500мг). Цю суміш розмішували під атмосферою водню (1атм) протягом 35 хвилин. Каталізатор вилучили фільтрацією через Целіт. Потім Целіт промили тетрагідрофураном (300мл) і об'єднані фільтрати випарували при зменшеному тиску. Твердий залишок, що утворився промили етером (2×20мл), гексаном (50мл), висушили у вакуумі, і потім розчинили у гарячому метанолі (60мл). Розчин відфільтрували, сконцентрували при пониженому тиску до об'єму - 10мл. Після стояння при кімнатній температурі протягом однієї години, розчин помістили у холодильник на ніч. Кристалічний осад, що утворився протягом ночі, відфільтрували і висушили у вакуумі, що дало цільову сполуку у вигляді твердої речовини. Фільтрат сконцентрували до об'єму ~1мл і помістили в холодильник на одну годину, що дало додатковий продукт.

Біологічна оцінка

Сполуки існуючого винаходу - нові фармацевтичні агенти; представлені сполуки формули I були оцінені *in vitro* та *in vivo*. В усіх цих дослідженнях проліки були перетворені у їхній фармацевтично активні батьківські сполуки.

(1) Оцінка розчинності проліків пропофолу у воді

Розчинність у воді проліків пропофолу приблизно 500мг/мл - на основі HPLC аналізу насиченого водного розчину.

(2) перетворення *in vitro* проліків пропофолу до пропофолу

Перетворення *in vitro* проліків пропофолу до пропофолу виконували, використовуючи основну фосфатазу в гліциновому буферному розчині з рН середовища 10,4. Підготували 25мл (100мг/мл) проліків пропофолу в гліциновому буфері. Один мілілітр цього розчину зберігли для початкової точки відліку часу, а 24мл, що залишилися, помістили в водяну ванну з температурою 37°C. Розчин основної фосфатази в гліциновому буфері 960мкл (0,1мг/мл) додали до 24мл розчину проліків пропофолу, перемішали, і повернули до водяної бані. 1,5мл зразка вилучили в 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300 і 360 хвилин. До кожного зразка, негайно додали 10мкл льодяної оцтової кислоти, щоб зупинити ферментну реакцію. За допомогою HPLC дослідили концентрацію проліків пропофолу та пропофолу у зразку. Результати перетворення *in vitro* показані фігурі 1. Ці результати демонструють, що проліки пропофолу - субстратами для основної фосфатази.

(3) Груба оцінка токсичності в пацюках

Проліки пропофолу підготували для *i.v.* введення концентрацією 68мг/мл у 0,9% хлориді натрію для ін'єкцій, USP. Ця концентрація еквівалентна 36мг/мл пропофолу. Розчин проліків пропофолу профільтрували через 0,22мкм нейлонову мембрану перед введенням.

Оцінка проліків пропофолу на пацюках проводилася на двох самцях пацюків Харлена Спрауге-Давлея, що важили 820 та 650г. Пацюку вагою 820г ввели у хвостову вену 200мкл композиції *i.v.* проліків пропофолу (еквівалентно 9мг/кг пропофолу). Приблизно через 12 хвилин взяли зразок крові з хвостової вени. Пацюку вагою 650г ввели дозу помірного заспокійливого Metaphane® до одержання проліків пропофолу. Потім через хвостову вену ввели 125мкл проліків пропофолу, а після приблизно шести хвилин з хвостової вени взяли зразок крові. Зразки крові від обох пацюків були проаналізовані на пропофол за допомогою HPLC.

Результати введення проліків пропофолу в обох пацюках були подібні. Обидва пацюка стали хитливими після декількох хвилин, але ніколи не втратили їхніх рефлексів. Опираючись на візуальні спостереження, пацюки цілком відійшли від ін'єкції проліків пропофолу. Кров, вилучена від обох пацюків проаналізували за допомогою HPLC, що підтвердило присутність пропофолу. Пацюки не показували ознак дискомфорту через проліки пропофолу.

(4) Фармакокінетична оцінка на собаках

Дослідження фармакокінетики, що включає Diprivan® чи проліки пропофолу виконували в собак з достатнім періодом очищення між дослідженнями. Концентрації крові визначали, використовуючи HPLC флюоресцентним детектором, у той час як мозкову діяльність перевіряли двома послідовними електроенцефалограмами (EEG). Перед дослідженнями, собаці зав'язали очі, в вуха помістили бавовну, ноги собаки зв'язали, щоб мінімізувати рух і інші зовнішні подразники, щоб вплив пропофолу на мозкову діяльність собаки можна було б відслідковувати найбільш ефективно.

Перевірка зміни концентрації пропофолу в крові протягом часу проводилася на гончій собаці вагою - 13кг. Перед введенням ліків у собаки взяли приблизно 8мл крові, яку використовували для стандартної підготовки кривої і визначення нульового рівня. Собаці вводили через головну вену Diprivan® чи проліки пропофолу еквівалентну 7мг/кг пропофолу.

Два мілілітри зразка крові взяли з іншої головної вени (не з тієї ж самої вени як використовувалася для введення) після 1, 3, 5, 10, 15, 20 і 30 хвилин після введення препаратів. Зразки крові були також взяті після

60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480, та 1440 хвилин. Зразки крові, що були взяті з собаки, відразу піддали екстракції, щоб видалити пропופол. Собаку не годували приблизно 20 годин до одержання Diprivan® чи проліків пропופолу. Після 120 хвилин взяття проб зразків, собаці дозволяли пити воду. Їжу давали собаці після того, як зразки крові отримували 480 хвилин. Собаку годували за "науковою дієтою підтримки" Хілла. Собака була на світлому/темному циклі по 12 годин світла в день.

Концентрація пропופолу у зразках крові була визначена, використовуючи HPLC з флюоресцентним детектором. Результати зображені на фігурі 2. Екстрагування крові та HPLC використовувались за методиками, що ґрунтувались на роботі, опублікованій Пламером (1987) з незначними модифікаціями. Типова підготовка і використання процедура іспиту були наступними:

До 1мл зразка крові додали, перемішуючи після кожного додавання, 10мкл тимолу в якості внутрішнього стандарту (20мкг/мл) та 1мл фосфатного буферу (0,1М, pH 7,2). Потім додали п'ять мл циклогексану, і зразок перемішували при 75-и оборотах в хвилину протягом 20-30 хвилин. Органічний шар був відділений після однієї хвилини центрифугування при приблизно 2000 обертах за хвилину. Приблизно 4,5мл органічного шару перемістили до пробірки, що містить 50мкл приблизно 1,8% (w/v) розведеного розчину тетраметиламонійгідроксиду (ТМАН). Розчинник повністю випаровувався під потоком азоту і відновлювався з 200мкл рухомої фази А. Зразки були відцентрифуговані при 15,000 обертах в хвилину протягом 30 секунд, для видалення будь-як часточок, після цього рідку фазу проаналізували за допомогою HPLC. Стандартні зразки кривої були підготовлені вприскуючи 1мл аліквоти початкової крові з пропополом з концентраціями 5, 1, 0,5, 0,1 і 0,01мкг/мл. Ці стандарти обробляли таким же самим чином, як і зразки.

HPLC система складалася з визначених Шимадзу компонентів: LC-10AT насоси, SCL-10A диспетчер системи, RF 353 флюоресцентний датчик, та SIL-10A автоподаччик зразків. HPLC параметри були наступні: збудження при 275нм, емісія при 320нм; швидкість потоку - 1мл/хвилину; об'єм введення був 3-30мкл у залежності від концентрації пропополу. HPLC колонка була Zorbax RX-C18, 15см×4,6мм, розмір частинок - 5мкм. Рухома фаза А - 60:40 (v/v) ацетонітрил : 25мМ фосфат, 15мМ TBAP pH буферу 7,1. Рухома фаза В - 80:10:10 (v/v/v) ацетонітрил:вода:THF. Рухома фаза В використовувалася, щоб очистити колонку після тимолу а пропопол вимивався використовуючи рухому фазу А (відповідно 4,2 та 7,4 хвилин).

Собака показав ознаки анестезії після введення обох композицій, що було видно візуально і на зразках електроенцефалограми. Собака поправлявся від анестезії від обох композицій протягом 20-30 хвилин. Рівень пропополу в крові, внаслідок введення проліків пропополу наближався до рівню пропополу після введення Diprivan®.

(5) Оцінка розчинності проліків камптотечину у воді

Розчинність проліків камптотечину у воді більша чим 50мг/мл - на основі HPLC аналізу та візуальних спостережень.

(6) Ензимне дослідження проліків камптотечину (p-cpt)

16мкг/мл p-cpt розщепили кислотною фосфатазою (0,02 одиниці/мл розчину p-cpt). Середовищем був 0,09М буфер солі лимонної кислоти, pH 4,8, температура - 37°C. Перетворення p-cpt до камптотечину було перевірено HPLC.

HPLC Параметри:

Рухома фаза: 24% буфер фосфатів калію pH 4,76 % ацетонітрилу;

Колонка: Zorbax RX-C18, 15см×4,6мм, розмір частинок - 5мкм;

Виявлення: 370нм UV;

Швидкість потоку: 1мл/хвилину.

Кислотна фосфатаза - бичачої передміхурової залози (сіма). Результати показані на фігурі 3. Результати показують, що проліки камптотечину - субстрат для фосфатази.

(7) Фармакінетичні дослідження проліків камптотечину, з використанням пацюків

Фармакінетичні дослідження, включало дозування самцям пацюків Спрауге-Давлея композицій проліків камптотечину та камптотечину. Дві композиції проліків камптотечину, що були досліджені, містили розчинені в 15мМ фосфаті проліки, pH 4,0 та камптотечин, розчинений в органічному співрозчиннику. Далі приведено резюме фармакінетичних експериментів:

Об'єми композицій проліків камптотечину або камптотечину приготували таких концентрацій, щоб вони були еквівалентні дозам 1мг камптотечину на 1кг ваги пацюка. Композиція вводилася пацюку, використовуючи постійно закріплену канюлю у лівій яремній вені пацюка. Зразки крові брались через використовуючи постійно закріплену канюлю у лівій яремній вені пацюка. Обидві канюлі обполісувалися гепаринізованим солончаком до використання і містили гепаринізований солончак протягом вивчення.

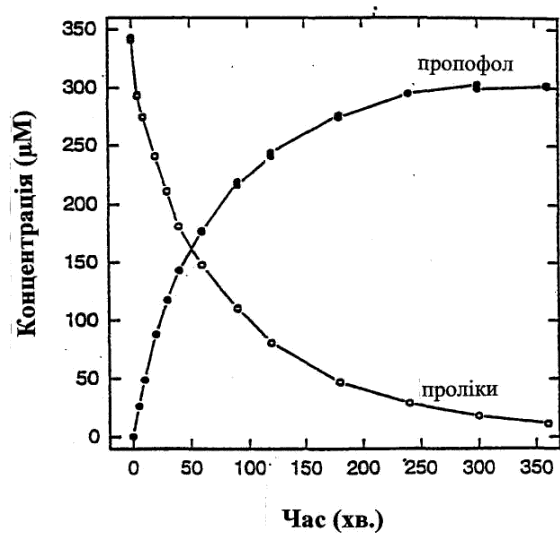
Пацюки були анестезовані пентабарбіталом натрію перед введенням канюль у яремні вени і підтримували анестезію пентабарбіталом натрію протягом дослідження. Пацюків помістили в 37°C термокамеру, де вони були протягом всього дослідження. Зразки крові - приблизно 150мкл були взяті перед дозуванням та після 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 та 90 хвилин після того, як пацюкам вводили композиції.

Зразки крові були поміщені в пробірки мікроцентрифуги і центрифугувались протягом 20 секунд при приблизно 15000 оборотах в хвилину. 50мкл аліквоти плазми від кожного зразка крові перемістили до другої пробірки для мікроцентрифуги. 150мкл аліквоти охолодженого ацетонітрилу додали до плазми, і суміш струшували протягом 5 секунд. Тоді додали 450мкл аліквоти охолодженого фосфату натрію (0,1М, pH 7,2). Зміст трубок мікроцентрифуги струшували протягом 5 секунд і центрифугували протягом 20 секунд при приблизно 15000 оборотах в хвилину. Рідку фазу перемістили до HPLC автодозатора при 4°C і проаналізували (вводили 50мкл).

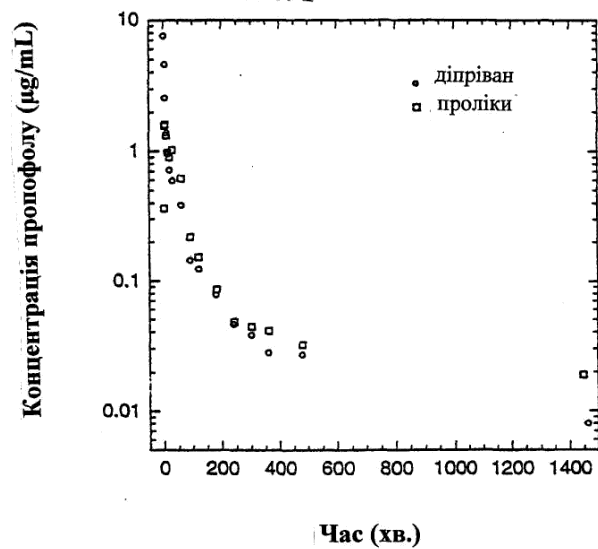
HPLC система складалася з визначених Шимадзу компонентів: LC-10AT насоси, SCL-10A диспетчер системи, RF 353 флюоресцентний датчик, та SIL-10A автоподаччик зразків (встановлений на 4°C) та CTO-10A термошфак колонки (з температурою 30°C). HPLC параметри були наступні: збудження при 370нм, емісія при 435нм; швидкість потоку - 2мл/хвилину; HPLC колонка була Hypersil ODS, 15см×4,5мм, розмір частинок - 5мкм. Рухома фаза - 75% 25нМ фосфат натрію, pH 6,5/25% ацетонітрил (v/v) з 25мМ дигідротетрабутиламонійфосфат, доданий як іон-послаблюючий реактив.

Як можна побачити на графіку (фігура 4), проліки забезпечують рівень камптотечину у плазмі, що є

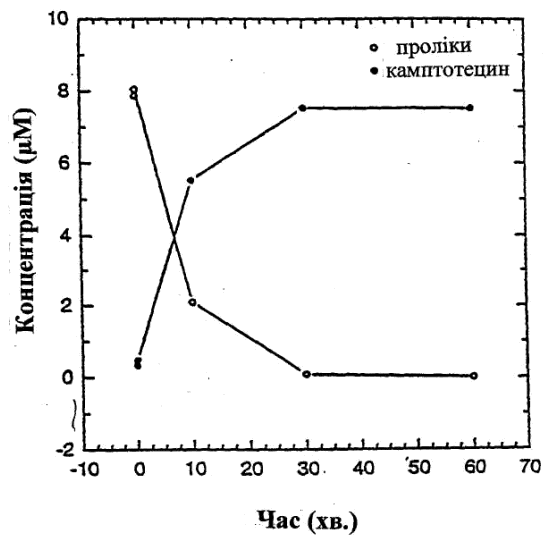
еквівалентними, досягнутому внаслідок прямого введення камптотецину в органічному співрозчиннику. Графік показує середнє стандартне відхилення для п'яти пацієнтів, яким ввели проліки і шести пацієнтів, яким ввели камптотецин.



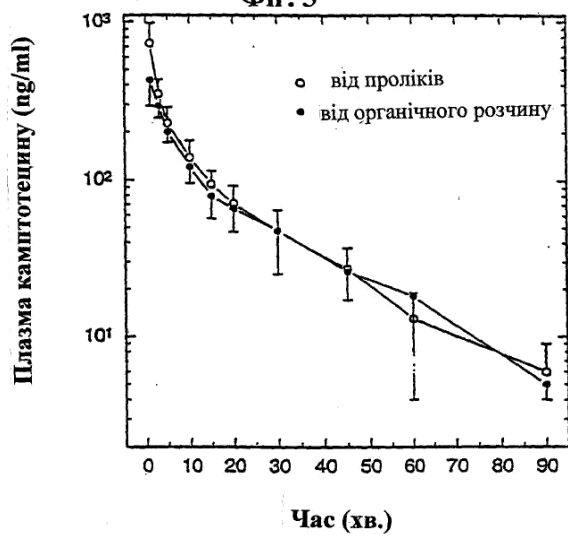
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4