



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 178860

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 07 F 15/00, A 61 K 31/555

Styret for det industrielle rettsvern

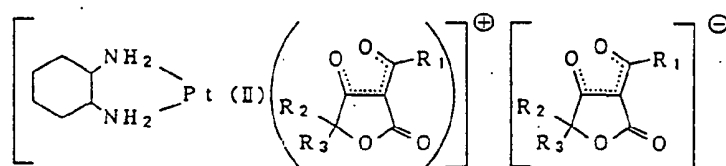
(21) Søknadsnr	913108	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	11.12.90, PCT/JP90/01610
(22) Inng. dag	09.08.91	(85) Videreføringsdag	09.08.91
(24) Løpedag	11.12.90	(30) Prioritet	12.12.89, JP, 323377/89
(41) Alm. tilgj.	10.10.91		
(44) Utlegningsdato	11.03.96		

(71) Patent søker	Toray Industries Inc, 2-1, Nihombashi Muromachi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo 103, JP
(72) Oppfinner	Go Hata, Fujisawa-shi, Kanagawa, JP Masato Mutoh, Yokohama-shi, Kanagawa, JP Hideyuki Hashimoto, Ohtsu-shi, Shiga, JP
(74) Fullmektig	Johan H. Gørbitz, Bryn & Aarflot AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Analogifremgangsmåte for fremstilling av et canserhindrende platina(II)kompleks**

(56) **Anførte publikasjoner** NO C 157505, EP A1 136012, EP A2 155705, EP A1 264109, EP A2 337459, EP A1 341318, GB A 2003468, US 4137248, US 4562275, US 4588831
J. D Hoeschele et al., Inorg. Chem. vol. 27, (1988), pp 4106-4113
The Merck Index, 11th. Ed., pp 276, 361
Platinum and Other Metal Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy, Ed. Marino Nicolini, 1988 pp 555-562, 666-669, 670-683
Organometallies in Cancer Chemotherapy, vol. II. Transition Metal Compounds, CRC Press, Boston (1990), pp 218-219

(57) **Sammendrag** Nytt platina(II)kompleks representert ved den følgende formel (A):



(A)

hvor R₁ utgjør en C₁-C₅-lavere hydrokarbongruppe, R₂ og R₃ utgjør et hydrogenatom eller en C₁-C₃-lavere hydrokarbongruppe, hvor konfigurasjonen av 1,2-diaminocykloheksan er cis, trans-*l*- eller trans-*d*-.

Siden platina(II)komplekset har sterk antitumor-aktivitet og lav giftighet, er det anvendelig som middel for behandling av maligne tumorer.

Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåte for fremstilling av et nytt cancerhindrende platina(II)kompleks som kan anvendes for behandling av maligne tumorer.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

En rekke platina(II)komplekser med organiske syrer, hvor ligand-komponenten er 1,2-diaminocykloheksan er beskrevet. Flere av disse har imidlertid liten oppløselighet slik at de ikke kan administreres intravenøst (f.eks. cyklobutan-1,1-dikarboksylat beskrevet i utlagt Japansk patentsøknad (Kokai) 60-10952) som er administrasjonsmåten for platinakomplekser. I andre tilfeller er deres stabiliteter i vandige oppløsninger lav, selv om deres oppløselighet er høy (f.eks. trimellitat omtalt av P.J. Andrusis et al., Proceedings of the Fifth International Symposium and Other Metal Compounds in Cancer Chemotherapy, s. 450 (1987)).

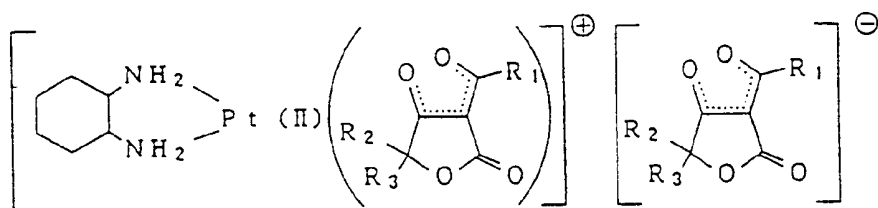
Det er dessuten et problem ved leting etter platinakomplekser med antitumor-aktivitet at en forurensning i det syntetiserte platinakompleks ofte oppviser antitumor-aktivitet. Det er følgelig nødvendig å foreta en formålstjenlig rensning av platinakomplekset. Nylig har James D. Hoeschele & N. Farrel angitt eksempler hvor antitumor-aktiviteten av et platinakompleks forsvant etter en passende opprensning av platinakomplekset, i Inorg. Chem., 27, 4106-4113 (1988). De har således angitt at blant 1,2-diaminocykloheksan-Pt-(II)-kompleksene som var angitt å være vannoppløselige og ha høy antitumor-aktivitet, mistet enkelte komplekser deres antitumor-virkning etter rensning. De har derfor understreket betydningen av å oppnå en prøve med høy renhet for vurdering av antitumor-aktiviteter.

Vi har tidligere oppdaget at platina(II)komplekser som inneholder 1 mol 1,2-diaminocykloheksan og 2 mol 3-acetyl-6-metyl-tetrahydropyran-2,4-dion eller analoger derav, har antitumor-aktiviteter (EP 337.459). Det viste seg imidlertid at disse kompleksene ikke hadde antitumor-aktiviteter når de var sterkt opprenset. Det er således viktig ved industriell fremstilling at det syntetiserte kompleks lett kan renses og at det lett kan oppnås et kompleks av høy renhet.

Formålet ved foreliggende oppfinnelse er å fremstille et nytt platina(II)kompleks med sterk antitumor-aktivitet, som lett kan renses, som har en oppløselighet som muliggjør intravenøs administrasjon og som er stabilt i vandig oppløsning.

BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for fremstilling av et nytt platina(II)kompleks representert ved den følgende formel (A):



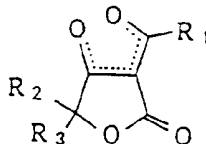
(A)

[hvor R_1 utgjør en C_1 - C_5 -lavere hydrokarbongruppe, R_2 og R_3 utgjør et hydrogenatom eller en C_1 - C_3 -lavere hydrokarbongruppe, hvor konfigurasjonen av 1,2-diaminocykloheksan er cis, trans- ℓ -eller trans-d-], som kan anvendes i et middel for behandling av maligne tumorer hvor komplekset inngår som virkestoff.

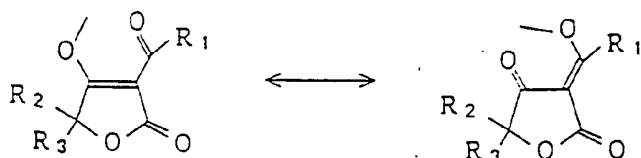
FORETRUKKET UTFØRELSESFORM AV OPPFINNELSEN

Den lavere hydrokarbongruppe som anvendes for foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis alkylgrupper og alkenylgrupper, så som metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, vinyl, isopropyl, allyl og isopropenyl. Blant disse er metyl spesielt foretrukket.

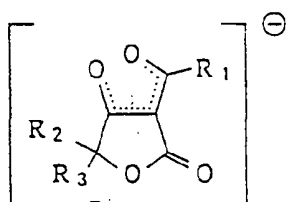
Delen representert ved formelen



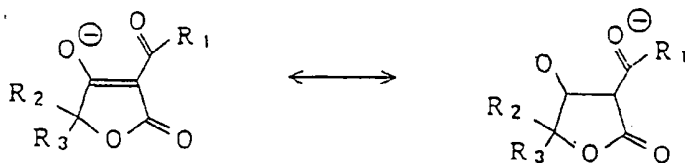
bundet til platina i komplekset med formel (A) oppviser tautomerisme som gjengitt ved ligningen:



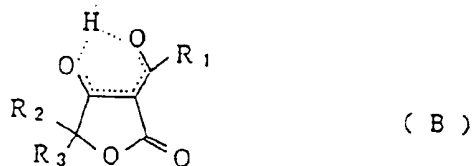
og chelaterer platina-atomet. Delen



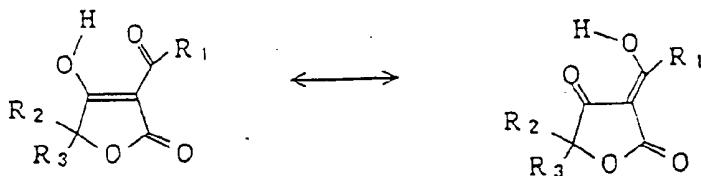
oppviser tautomerisme ifølge ligningen



Vi har oppdaget at det kan syntetiseres et kompleks hvor ett molekyl av et deprotonert derivat av en 5-leddet ringforbindelse (B) med formel:

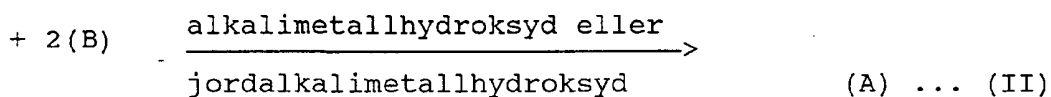
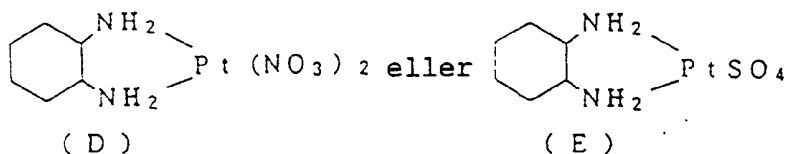
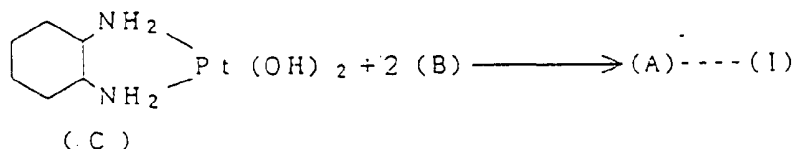


[forbindelse (B) oppviser tautomerisme ifølge ligningen:



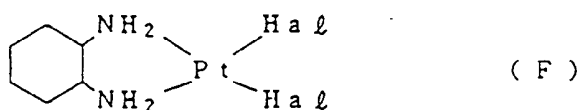
chelaterer platina(II), og et annet molekyl av det deprotonerte derivat av forbindelsen (B) i form av anionet er tilknyttet dette slik at det dannes et kompleks. Dette komplekset er høyoppløselig i vann og stabilt i vandige oppløsninger og har høy antitumor-aktivitet.

Forbindelsen kan syntetiseres ifølge ligningene (I) og (II).



Forbindelsen (C) kan oppnås ved å sende forbindelsen (D) gjennom et sterkt ionebytter-resin.

Forbindelsene (D) og (E) som utgjør materialene for syntese av platinakomplekset ved fremgangsmåten i henhold til foreliggende oppfinnelse, kan oppnås etter kjente fremgangsmåter. For eksempel kan de lett oppnås ved å behandle forbindelsen med den følgende formel (F) med sølvnitrat eller sølvsulfat i henhold til fremgangsmåten beskrevet i Journal of Pharmaceutical Sciences, 65, 315, (1976).



[hvor Hal utgjør halogen]

Forbindelsen (F) har tre isomerer som er Pt(cis-1,2-diaminocykloheksan)Hal₂, Pt(trans-ℓ-1,2-diaminocykloheksan)Hal₂ og Pt(trans-d-1,2-diaminocykloheksan)Hal₂ som avhenger av konfigurasjonen av det anvendte 1,2-diaminocykloheksan.

Som alkalimetallhydroksyd for reaksjonen (II) foretrekkes NaOH og KOH, og som jordalkalimetallhydroksyd Ba(OH)₂ og Ca(OH)₂. Fortrinnsvis benyttes to ekvivalenter av alkalimetallhydroksydet eller én ekvivalent av jordalkalimetallhydroksydet.

Forbindelsen representert ved formel (B), som er et annet materiale, kan fremstilles etter kjente fremgangsmåter, for eksempel i henhold til E. Benary, *Berichte* 42, 3912 (1909) eller P.M. Booth et al., *J. Chem. Soc. Perkin Trans, I* 121 (1987) eller D. J. Agar et al., *Tetrahedron Lett.*, 29, 4807 (1988).

Selv om det molare forhold mellom forbindelse (B) og forbindelsene (C), (D) og (E) fortrinnsvis bør være ca. 2, forårsaker bruk av et overskudd av forbindelse (B) intet problem.

Det faktum at de to mol av de deprotonerte derivater av forbindelse (B) ikke er identiske, fremgår av at protonsignaler med samme intensitet observeres separat ved NMR. At komplekset danner en ionisk forbindelse er kjent fra det faktum at et mol av det deprotonerte derivat av B i komplekset lett erstattes med et annet ion, så som et acetation. Komplekset fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse kan være i form av et aquo-kompleks, som inneholder vann, og fremstilling av aquo-komplekset faller også inn under foreliggende oppfinnelse.

Oppfinnerne har tidligere funnet at platina(II)komplekser som inneholder 1 mol 1,2-diaminocykloheksan og 2 mol 3-acetyl-6-metyl-tetrahydropyran-2,4-dion eller analoger derav, har antitumor-virkninger. Det har imidlertid vist seg at disse kompleksene ikke oppviser antitumor-aktivitet når de renses ved bruk av væske-kromatografi (kolonne: styren-divinylbenzen-kopolymer), som vist i senere beskrevne referanse-eksempler.

Komplekset fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse kan renses ved væske-kromatografi og/eller omkrystallisasjon. Dersom komplekset består av en enkelt optisk forbindelse, kan den lett renses ved omkrystallisering. Vann benyttes fortrinnsvis som oppløsningsmiddel for omkrystallisasjonen.

Toksisiteten av komplekset i henhold til foreliggende oppfinnelse er lav, idet forholdet (LD_{50} -verdi)/(minimaldose for antitumor-aktivitet) er stor.

Et middel som inneholder en effektiv mengde av platina-komplekset fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse, kan klinisk administreres oralt eller parenteralt. Midlet kan ha form av tabletter, sukker-drasjerte tabletter, piller, kapsler,

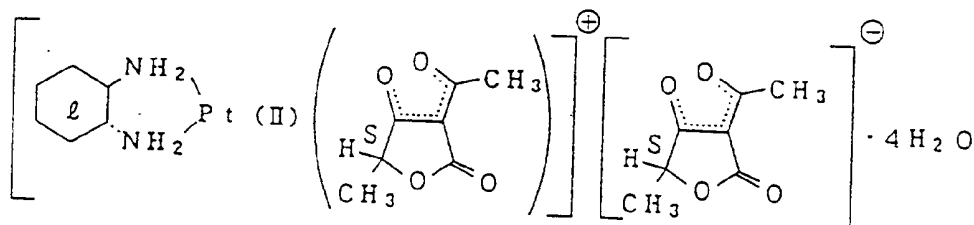
pulvere, pastiller, oppløsninger, suppositorier, injeksjonsvæsker og lignende. Midlet kan formuleres ved bruk av farmasøytisk akseptable hjelpestoffer. Eksempler på farmasøytisk akseptable hjelpestoffer innbefatter laktose, sukrose, glukose, sorbitol, mannitol, potetstivelse, amylopektin, forskjellige andre stivelser, cellulosederivater (f.eks. karboksymetylcellulose, hydroksyetylcellulose og lignende), gelatin, magnesiumstearat, polyvinylalkohol, kalsiumstearat, polyetylenglykol-voks, titandioksyd, planteoljer så som olivenolje, jordnøttolje og sesamolje, paraffinolje, nøytral fettbasis, etanol, propylen-glykol, fysiologisk saltoppløsning, sterilisert vann, glycerol, farvestoffer, smaksforbedrende stoffer, "concentrating agent" stabilisatorer, "isotonic agent", buffere og andre farmasøytisk akseptable hjelpestoffer.

Midlet kan inneholde platinakomplekset fremstilt i henhold til foreliggende oppfinnelse, i mengder på 0,001-85vektprosent, fortrinnsvis 0,005-60vektprosent.

Selv om doseringen av midlet kan variere, hovedsakelig med pasientens symptomer, utgjør dosen 0,005-200 mg, fortrinnsvis 0,01-50 mg per dag for en voksen person.

Oppfinnelsen vil i det følgende bli mer utførlig beskrevet gjennom eksempler.

Eksempel 1



(Forbindelse 1)

I 200 ml vann oppløses 11,1 g (71,1 mmol) 3-acetyl-(5S)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion og 500 ml (33,6 mmol) vandig oppløsning av platina(II)-(trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)(OH)₂ dråpevis under avkjøling i is. Den resulterende blanding omrøres ved romtemperatur i 5 timer. Vannet fordampes ved bruk av en rotasjonsfordamper og det gjenværende inndampes til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. Til residuet tilsettes 300 ml tetrahydrofuran, hvoretter produktet langs innsiden av beholderen pulveriseres. Pulveret frafiltreres, vaskes med 100 ml tetrahydrofuran og tørkes. Utbyttet er 14,2 g. Det oppnådde materialet oppløses i vann og den resulterende oppløsning vaskes-kromatograferes på en kolonne pakket med styren-divinylbenzen-kopolymer (MCI GEL CHP20P, kommersielt tilgjengelig fra Mitsubishi Kasei Corporation). Kolonnen elueres med en 7:3-blanding av vann/metanol. Fraksjoner som inneholder komplekset i høye konsentrasjoner kombineres, hvoretter totaloppløsningen konsentreres ved bruk av en rotasjonsfordamper. Residuet krystalliseres ved at konsentratet settes i kjøleskap. Krystallene frafiltreres og omkrystalliseres to ganger fra vann. Utbyttet etter lufttørring er 6,65 g (utbytte: 29%). Oppløseligheten i vann er ca. 30 mg/ml.

Smeltepunkt, elementanalyse og IR- og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): ca. 238°C

Elementanalyse: som C₂₀H₃₆N₂O₁₂Pt(tetrahydrat)

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	34,74	5,25	4,05	28,21
Funnet (%)	34,75	5,20	4,05	28,22

IR (KBr) (cm⁻¹):

3346, 3170, 3082, 2938, 1750, 1651,
1603, 1562, 1543, 1493, 1460

¹H NMR (400MHz, i D₂O, intern standard er ¹H i D₂O, målingen foretatt ved 60°C) δ (ppm):

1,2-diaminocykloheksan-delen:

2,60 (m, 2H), 2,13 (d, 2H), 1,64 (m, 2H),
ca. 1,39 (2H), 1,22 (m, 2H)

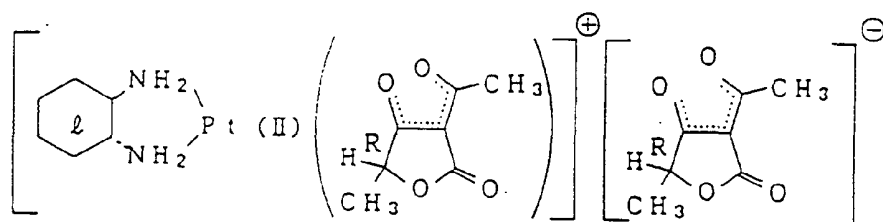
3-acetyl-(5S)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion-delen:

4,78 (q, 1H), 4,53 (q, 1H), 2,36 (s, 3H),
2,35 (s, 3H), 1,47 (d, 3H), 1,39 (d, 3H)

Røntgenstruktur-analyse av krystallene viste at den oppnådde forbindelse hadde den kjemiske struktur til Forbindelse 1.

Til en vandig oppløsning inneholdende 2 ekvivalenter 2-acetyl-(5S)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion og 1 ekvivalent bariumhydroksyd tilsettes en vandig oppløsning inneholdende 1 ekvivalent $\text{Pt}(\text{trans-}\ell\text{-1,2-diaminocykloheksan})\text{SO}_4$, hvorefter den resulterende blanding omrøres over natten. Bariumsulfat-utfellingen fjernes ved filtrering. Vann fjernes fra filtratet ved bruk av en rotasjonsfordamper og det gjenværende inndampes til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. Ved å gjenta operasjonen beskrevet i eksemplet ovenfor, oppnås også Forbindelse 1.

Eksempel 2



(Forbindelse 2)

I 100 ml vann oppløses 5,84 g (37,4 mmol) 3-acetyl-(5R)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion og det tilsettes dråpevis 278,5 ml (17,8 mmol) av en vandig oppløsning av $\text{Pt}(\text{II})(\text{trans-}\ell\text{-1,2-diaminocykloheksan})(\text{OH})_2$. Etter omrøring av den resulterende blanding

over natten ved romtemperatur, fordampes vannet ved bruk av en rotasjonsfordamper, hvorefter det gjenværende inndampes til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. Residuet tilsettes 100 ml tetrahydrofuran og utgnis. Pulveret frafiltreres og tørkes. Det resulterende pulver oppløses i vann, hvorefter oppløsningen væskechromatograferes som i Eksempel 1. Prøven elueres med en 7:3-blanding av vann/metanol. Fraksjoner som inneholder det ønskede produkt kombineres, og den samlede oppløsning konsentreres ved bruk av en rotasjonsfordamper. Ved henstand av konsentratet utfelles krystaller. Krystallene omkrystalliseres to ganger fra vann. Vekten etter lufttørking er 1,64 g. Oppløseligheten i vann er ca. 30 mg/ml.

Smeltepunkt, elementanalyse og IR- og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): ca. 239°C

Elementanalyse: som $C_{20}H_{28}N_2O_8Pt$

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	38,77	4,56	4,52	31,49
Funnet (%)	38,75	4,54	4,55	31,46

IR (KBr) (cm^{-1}):

3130, 3030, 2938, 1765, 1649, 1609, 1572,
1502, 1460, 1013

1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O , målingen foretatt ved 60°C) δ (ppm):

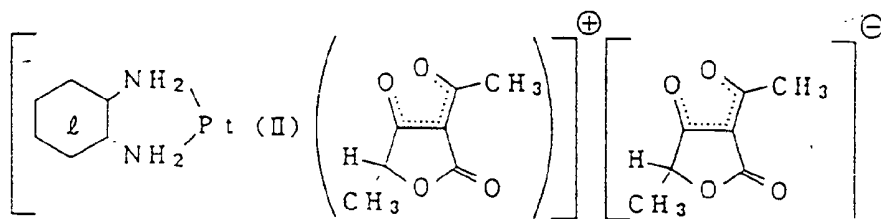
1,2-diaminocykloheksan-delen:

2,60 (m, 2H), 2,13 (d, 2H), 1,64 (m, 2H),
ca. 1,38 (2H), 1,22 (m, 2H)

3-acetyl-(5R)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion-delen:

4,79 (q, 1H), 4,53 (q, 1H), 2,36 (s, 3H),
2,35 (s, 3H), 1,46 (d, 3H), 1,39 (d, 3H)

Eksempel 3



(Forbindelse 3)

I 50 ml vann oppløses 4,4 g (28,2 mmol) racemisk 3-acetyl-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion og tilsettes dråpevis 190 ml (12,8 mmol) av en vandig oppløsning av pt(II)(trans- ϵ -1,2-diaminocykloheksan)(OH)₂. Etter omrøring ved romtemperatur i fire timer fordampes vannet ved bruk av en rotasjonsfordamper og det gjenværende fordampes til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. THF tilsettes til residuet og innholdet pulveriseres. Pulveret frafiltreres og tørkes. Det oppnådde pulver er 4,3 g. Pulveret oppløses i vann og oppløsningen væske-kromatograferes på en kolonne som inneholder MCI GEL CHP20P. Det anvendte elueringsmiddel var en 7:3-blanding av vann/metanol. Fraksjoner som inneholder det ønskede produkt oppsamles og konsentreres ved bruk av en rotasjonsfordamper. Ved henstand av konsentratet utfelles krystaller. Bunnfallet oppsamles ved filtrering og tørkes. Utbyttet er 2,2 g. Oppløseligheten i vann er ca. 33 mg/ml.

Smeltepunkt, elementanalyse og IR- og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): 250-254°C

Elementanalyse: som $C_{20}H_{28}N_2O_8Pt$

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	38,77	4,56	4,52	31,49
Funnet (%)	38,68	4,42	4,47	31,51

IR (KBr) (cm^{-1}):

3062, 2932, 1756, 1647, 1609, 1566,
1502, 1460, 1330, 1238, 1089, 1067,
1029, 787, 661, 632, 590

1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O , ved romtemperatur) δ (ppm):

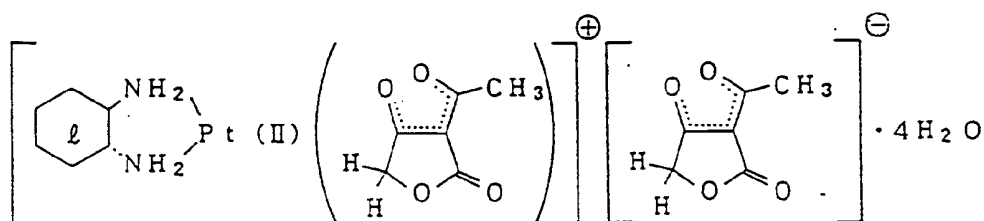
1,2-diaminocykloheksan-delen:

1,20 (m, 2H), ca. 1,4 (2H), 1,61 (d, 2H),
2,11 (d, 2H), 2,57 (d, 2H)

3-acetyl-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion-delen (racemisk):

1,38 (d, 3H), 1,43 (d, 1,5H), 1,45 (d, 1,5H),
2,32 (s, 3H), 2,34 (s, 3H), 4,54 (m, 1H), 4,74 (m, 1H)

Eksempel 4



(Forbindelse 4)

I 30 ml vann oppløses 2,71 g (19 mmol) 3-acetyl-tetrahydrofuran-2,4-dion og den resulterende oppløsning avkjøles i is. Blandingen tilsettes dråpevis 135 ml (9 mmol) av en vandig oppløsning av pt(II)(trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)(OH)₂ fra en dråpetrakt. Den resulterende blanding får stå over natten, hvorpå

vannet fordampes ved bruk av en rotasjonsfordamper. THF tilsettes til residuet og innholdet pulveriseres. Ved oppsamling av pulveret ved filtrering og tørking av pulveret oppnås 4,09 g gult pulver. Det gule pulveret oppløses i vann og den resulterende oppløsning vaskerkromatograferes på en kolonne som inneholder MCI-GEL CHP20P. Elueringsmidlet er en 9:3-blanding av vann/metanol. Ved konsentrering av hovedfraksjoner og ved å la dem stå utfeltes krystaller. Krystallene oppsamles ved filtrering og lufttørkes. Oppløseligheten i vann er ca. 53 mg/ml.

Smeltepunkt, elementanalyse og IR- og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): 250°C

Elementanalyse: som $C_{18}H_{32}N_2O_{12}Pt$ (tetrahydrat)

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	32,58	4,83	4,22	29,41
Funnet (%)	33,56	4,82	4,26	29,50

IR (KBr) (cm^{-1}):

3390, 3162, 3076, 1752, 1649,
1605, 1497, 1460, 1056, 1025,
768, 702, 658

1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O , romtemperatur) δ (ppm):

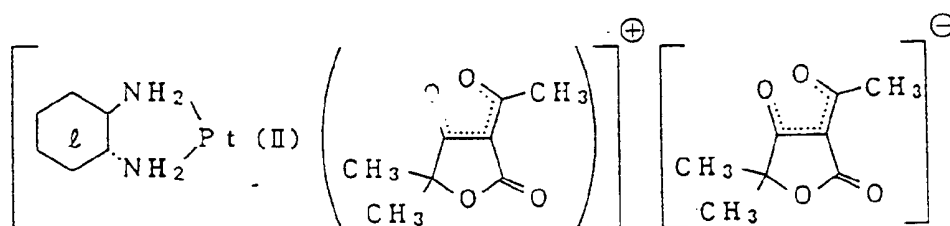
1,2-diaminocykloheksan-delen:

1,03 (m, 2H), 1,21 (m, 2H), 1,45 (d, 2H),
1,93 (d, 2H), 2,40 (m, 2H)

3-acetyl-tetrahydrofuran-2,4-dion-delen:

2,15 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 4,23 (s, 2H),
4,33 (s, 2H)

Eksempel 5



(Forbindelse 5)

I 140 ml etanol oppløses 3,57 g (21 mmol) 3-acetyl-5,5-dimetyltetrahydrofuran-2,4-dion og tilsettes dråpevis 148,8 ml (10 mmol) av en vandig oppløsning av pt(II)(trans- ϵ -1,2-diaminocykloheksan)(OH)₂. Etter henstand ved romtemperatur over natten, oppvarmes blandingen under omrøring ved 50-60°C i 2 timer. Etter fordamping av vannet fra reaksjonsblandingen ved bruk av en rotasjonsfordamper, fordampes det gjenværende ytterligere til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. Etylacetat tilsettes til residuet og innholdet pulveriseres. Pulveret oppsamles ved filtrering og tørkes. Utbyttet er 4,47 g. Pulveret oppløses i vann og den resulterende oppløsning vaskes på kromatograferes på en kolonne som inneholder MCI-GEL CHP20P. Det anvendte elueringsmiddel var en 7:3-blanding av vann/metanol. Fraksjoner som inneholder produktet samles og konsentreres ved bruk av en rotasjonsfordamper. Ved å tilsette THF til konsentratet utfelles et hvitt pulver. Bunnfallet oppsamles ved filtrering og vaskes med THF. Det resulterende tørkes under vakuum. Utbyttet er 2,45 g (Forbindelse 5).

Smeltepunkt, elementanalyse og IR- og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): 210-215°C

Elementanalyse: som C₂₂H₃₂N₂O₈Pt

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	40,80	4,98	4,33	30,12
Funnet (%)	40,61	4,99	4,32	29,98

IR (KBr) (cm⁻¹):

3500, 3428, 3076, 2936, 1738,
1709, 1638, 1607, 1491, 1464
1369, 1311, 1294, 1265, 1232,
1170, 1149, 1033, 961, 793,
658, 613

¹H NMR (400 MHz, i D₂O, intern standard er ¹H i D₂O) δ (ppm):

1,2-diaminocykloheksan-delen:

1,20 (m, 2H), ca. 1,4 (2H), 1,61 (d, 2H),
2,12 (d, 2H), 2,57 (m, 2H)

3-acetyl-5,5-dimetyltetrahydrofuran-2,4-dion-delen:

1,38 (s, 3H), 1,45 (s, 3H), 2,33 (s, 3H),
2,34 (s, 3H)

Ved omkrystallisering av det ovenfor beskrevne kompleks fra vann, ble dihydratet av Forbindelse 5 oppnådd. Oppløseligheten er 7 mg/ml.

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): ca. 220°C

Elementanalyse: som $C_{22}H_{36}N_2O_{10}Pt$ (dihydrat)

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	38,65	5,27	4,09	28,55
Funnet (%)	38,72	5,28	4,09	28,60

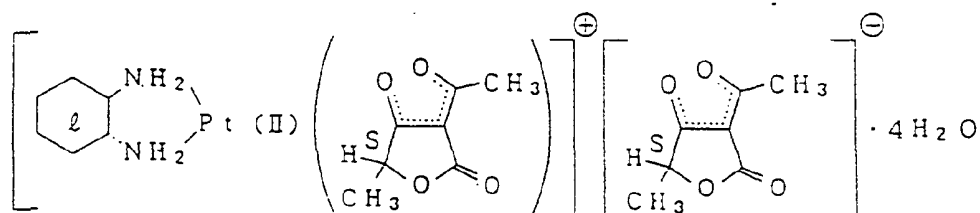
IR (KBr) (cm^{-1}):

3374, 3032, 2926, 1771, 1738,
1709, 1638, 1611, 1578, 1493,
1452, 1367, 1315, 1255, 1027,
961, 611

1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O) δ (ppm):

Spekteret av det dehydratiserte kompleks er det samme som av det ikke-hydratiserte kompleks.

Eksempel 6



(Forbindelse 1)

I 150 ml vann oppløses 8,8 g (56,4 mmol) 3-acetyl-(5S)-5-metyltetrahydrofuran-2,4-dion og det tilsettes dråpevis en vandig oppløsning av 335 ml (28,6 mmol) av en vandig oppløsning av Pt(II) (trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan) (OH)₂ under avkjøling i is. Den resulterende blanding omrøres over natten ved romtemperatur. Vannet fordampes fra blandingen ved bruk av en rotasjonsfordamper, hvorefter det gjenværende inndampes til tørrhet under redusert trykk ved bruk av en vakuumpumpe. Residuet tilsettes 200 ml tetrahydrofuran og produkt festet til innerveggen av beholderen utgnis. Pulveret isoleres ved filtrering og det oppnådde pulver vaskes med 50 ml tetrahydrofuran og tørkes. Det oppnådde pulver tilsettes 20 ml vann, hvorefter blandingen omrøres. Etter avkjøling i is frafiltreres det oppståtte bunnfall. Til det oppnådde bunnfall tilsettes 30 ml vann, hvorpå bunnfallet oppløses ved oppvarming. Ved henstand i kjøleskap utfelles krystaller. Omkrystallisering på samme måte fra vann gjentas. De dannede krystallene lufttørkes. Utbyttet er 3,61 g. Ved å konsentrere moderluten fra omkrystalliseringen, oppnås ytterligere 2,72 g krystaller. Elementanalyse og ¹H NMR-spektrum viste at de oppnådde krystallene var Forbindelse 1.

Eksempel 7

I abdominalhulen til CDF₁-mus (hanner, 6 uker gamle, 5-10 mus/gruppe) ble det transplantert 10⁵ museleukemi L1210 celler utviklet i DBA/2-mus. Med transplantasjonsdagen som Dag 0 som utgangspunkt, ble Forbindelsene 1-5 i henhold til foreliggende oppfinnelse, administrert separat intraperitonealt i mus på Dag 1, Dag 5 og Dag 9, i alt tre ganger. Hver forbindelse ble administrert etter oppløsning i destillert vann for injeksjon. Vurdering av antitumor-aktivitetene av platinakompleksene overfor L1210-transplanterte mus skjedde på basis av T/C-verdien som oppnås gjennom følgende ligning:

$$T/C (\%) = \frac{\text{Gjennomsnittlig overlevelsestid for behandlede mus}}{\text{Gjennomsnittlig overlevelsestid for kontrollmus}} \times 100$$

Resultatene er vist i Tabell 1.

Tabell 1 Antitumor-aktivitet i L1210-transplanterte mus

Forb.	Dose (mg/ kg)	Overlevelsestid i dager (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik)	T/C (%)	Ant.overlev. mus (Dag 30)
Kontr.		8,4 $\pm$ 0,5	100	0/10
gruppe	3,1	10,8 $\pm$ 1,3	129	0/6
Forb. 1	6,3	11,5 $\pm$ 1,2	137	0/6
i henh.	12,5	11,7 $\pm$ 0,8	139	0/6
til oppf.	25	13,8 $\pm$ 2,7	164	0/6
	50	12,8 $\pm$ 1,2	152	0/6
	100	9,8 $\pm$ 1,3	117	0/6
Kontr.		8,4 $\pm$ 0,5	100	0/10
gruppe	3,1	10,7 $\pm$ 1,0	127	0/6
Forb. 2	6,3	11,7 $\pm$ 0,8	139	0/6
i henh.	12,5	16,0 $\pm$ 7,9	190	1/5
til oppf.	25	15,3 $\pm$ 7,4	182	1/6
	50	15,0 $\pm$ 2,3	179	0/6
	100	11,3 $\pm$ 1,5	135	0/6
Kontr.		8,0 $\pm$ 1,6	100	0/10
gruppe	1	9,3 $\pm$ 2,2	116	0/6
Forb. 3	5	10,2 $\pm$ 1,3	128	0/6
i henh.	10	15,0 $\pm$ 4,8	188	0/5
til oppf.	25	12,0 $\pm$ 3,8	150	0/6
	50	12,8 $\pm$ 3,8	160	0/6
	100	10,0 $\pm$ 1,5	125	0/6
Kontr.		8,8 $\pm$ 1,2	100	0/10
gruppe	3,1	12,5 $\pm$ 1,2	142	0/6
Forb. 4	6,3	13,8 $\pm$ 1,6	157	0/6
i henh.	12,5	14,0 $\pm$ 1,3	159	0/6
til oppf.	25	15,0 $\pm$ 4,7	170	1/6
	50	6,2 $\pm$ 0,8	70	0/6
Kont.		8,2 $\pm$ 0,6	100	0/10
gruppe	1	8,5 $\pm$ 1,2	104	0/6
Forb. 5	10	9,3 $\pm$ 1,0	113	0/6
i henh.	25	11,4 $\pm$ 2,1	139	0/5
til oppf.	50	11,4 $\pm$ 1,5	139	1/5
	100	13,5 $\pm$ 2,3	165	1/6

Eksempel 8

I abdominalhulen til CDF₁-mus (hanner, 6 uker gamle, 5-10 mus/gruppe) ble det transplantert 10^5 Cisplatin-resistente museleukemi L1210/CDDP-celler utviklet i DBA/2-mus. Med transplantasjonsdagen som dag 0 som utgangspunkt, ble forbindelsene i henhold til foreliggende oppfinnelse, og kontrollmedikamenter administrert separat intraperitonealt i mus på Dag 1, Dag 5 og Dag 9, i alt tre ganger.

Forbindelsene i henhold til foreliggende oppfinnelse og Carboplatin ble administrert etter oppløsning i destillert vann for injeksjon, og Cisplatin ble benyttet etter oppløsning i fysiologisk saltoppløsning for injeksjon. Effekten av forbindelsene ble vurdert ved bruk av T/C-verdien som i Eksempel 7. Resultatene er vist i Tabell 2.

Tabell 2 Antitumor-aktivitet i Cisplatin-resistente L1210-transplanterte mus

Forb.	Dose (mg/kg)	Overlevelsestid i dager (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik)	T/C (%)	Ant. overlev. mus (Dag 30)
Kontr. gruppe		9.1 $\pm$ 0.7	100	0/10
Forb. 1 i henh. til oppf.	3.2	10.8 $\pm$ 1.9	119	0/6
	6.3	10.5 $\pm$ 2.4	115	0/6
	12.5	16.2 $\pm$ 10.7	178	2/6
	25	20.3 $\pm$ 10.7	223	3/6
	50	13.0 $\pm$ 9.6	143	1/6
	100	8.0 $\pm$ 2.1	88	0/6
Forb. 4 i henh. til oppf.	3.2	9.5 $\pm$ 1.2	104	0/6
	6.3	16.5 $\pm$ 8.5	181	1/6
	12.5	14.2 $\pm$ 8.0	156	1/6
	25	10.0 $\pm$ 2.6	110	0/6
	50	6.7 $\pm$ 1.6	74	0/6
	100	5.0 $\pm$ 2.8	55	0/6
Cisplatin	2.5	9.3 $\pm$ 1.0	102	0/6
	5	8.3 $\pm$ 0.5	91	0/6
	10	8.7 $\pm$ 0.8	96	0/6
	25	7.2 $\pm$ 1.6	79	0/6
Carbo- platin	25	9.0 $\pm$ 1.1	99	0/6
	50	9.7 $\pm$ 0.8	107	0/6
	100	9.3 $\pm$ 0.8	102	0/6
	200	7.3 $\pm$ 1.5	80	0/6

Eksempel 9

Undersøkelser av akutt toksisitet ble foretatt med Forbindelse 1 oppnådd i Eksempel 1 og Forbindelse 4 oppnådd i Eksempel 4.

Hver testforbindelse ble administrert intraperitonealt til Slc:ICR-mus (hanner, 5 uker gamle, 6 mus/gruppe). Testforbindelsen ble benyttet etter oppløsning i destillert vann. Ut fra dødeligheten 14 dager etter administrasjon, ble LD₅₀-verdien beregnet i henhold til Miller-Tainter-metoden. Resultatene er vist i Tabell 3.

Tabell 3

Forbindelse	LD ₅₀ (mg/kg)
Forbindelse 1	132
Forbindelse 4	52

Undersøkelsen av akutt toksisitet på mus ble foretatt med Forbindelse 3 fremstillet i Eksempel 3. LD₅₀ ble bestemt på samme måte som ovenfor bortsett fra at musene var 6 uker gamle og at 0,05% Tween 80 ble benyttet i stedet for destillert vann for oppløsning av forbindelsen. LD₅₀ av dette komplekset er 83 mg/kg.

Referanse-eksempel 1

[Pt(II)(trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)](3-acetyl-6-metyltetrahydropyran-2,4-dion)₂·H₂O

(1) Syntese av kompleks i henhold til EP 337.459

I 100 ml (4,2 mmol) av en vandig oppløsning av [Pt(trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)(OH)₂] ble 1,72 g (10,1 mmol) 3-acetyl-6-metyltetrahydropyran-2,4-dion tilsatt, hvorpå den resulterende blanding ble omrørt ved romtemperatur i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble deretter konsentrert til tørrhet ved 45-50°C.

Etter vask av det resulterende faststoff med etylacetat, ble det gjenværende tørket under redusert trykk ved 40-45°C for å oppnå 2,40 g (utbytte: 86%) av et lysegult kompleks (Prøve A).

Smeltepunkt, elementanalytiske data og IR-data for dette kompleks var som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): 184-188°C

Elementanalyse: som $C_{22}H_{34}N_2O_9Pt$

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	39,70	5,15	4,21	29,31
Funnet (%)	39,3	4,9	4,3	28,0

Ir (KBr) (cm^{-1}):

3420, 3200, 3080, 2980, 2940,
2860, 1700, 1660, 1620, 1570,
1390, 1290, 1260, 1060, 970,
770

Reaksjonen beskrevet ovenfor ble gjentatt to ganger, hvorved det i alt ble oppnådd 7,10 g lysegult kompleks.

(2) Rensing av komplekset oppnådd under (1)

Til det lysegule kompleks oppnådd under (1) tilsettes 200 ml tetrahydrofuran, hvorpå blandingen omrøres og utgnis. Pulveret oppsamlet ved filtrering vaskes med 100 ml tetrahydrofuran. Filtratet er gult. Det oppnådde pulver oppløses i vann, hvorefter den resulterende oppløsning sendes gjennom en kolonne pakket med MCI GEL CHP20P (kommersielt tilgjengelig fra Mitsubishi Kasei Corporation) som er en styren-divinylbenzen-kopolymer. Som elueringsmiddel benyttes en 7:3-blanding av vann/metanol. Ved å vurdere væskerkromatogrammet ble fraksjoner inneholdende høye konsentrasjoner kompleks oppsamlet og kombinert og deretter konsentrert ved bruk av en rotasjonsfordamper. Det resulterende konsentrat underkastes en ny væskerkolonnekromatografi ved bruk av samme kolonne og samme elueringsmiddel. Fraksjoner inneholdende høye konsentrasjoner av kompleks oppsamles og konsentreres ved hjelp av en rotasjonsfordamper. Det resulterende konsentrat inndampes til tørrhet ved bruk av et frysetørkingsapparat. Hvitt pulver i en mengde på 2,64 g ble oppnådd (Prøve B).

Smeltepunkt, elementanalyse og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): ca. 230°C

Elementanalyse: som $C_{22}H_{34}N_2O_9Pt$

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	39,70	5,15	4,21	29,31
Funnet (%)	39,42	4,91	4,15	29,1

1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O) δ (ppm):

4,78 (m, 1H), 4,48 (m, 1H), 2,6-2,3 (m, 8H),
 2,29 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 2,04 (d, 2H)
 1,57 (d, 2H), 1,33 (d, 3H), 1,31 (d, 3H)
 1,14 (m, 2H)

Referanse-eksempel 2

[Pt(II)(trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)](3-acetyltetrapyran-2,4-dion) $_2 \cdot H_2O$

I 50 ml etanol ble det oppløst 1,56 g (10 mmol) 3-acetyltetrahydropyran-2,4-dion som under omrøring og avkjøling i is ble tilsatt 60 ml (4,0 mmol) av en vandig oppløsning av [Pt(Trans- ℓ -1,2-diaminocykloheksan)(OH) $_2$]. Etter henstand av den resulterende blanding i 2 dager ved romtemperatur, ble reaksjonsblandingen konsentrert under redusert trykk ved 40°C og deretter tørket. Tetrahydrofuran ble tilsatt til det oppnådde faststoff, hvorefter blandingen ble pulverisert og vasket. Etter filtrering ble pulveret tørket under redusert trykk ved romtemperatur for å gi 2,30 g lysegult kompleks (utbytte: 90%). Det lysegule komplekset ble oppløst i vann og rensset ved væskkromatografi på samme måte som under Referanse-eksempel 1(2) for å oppnå 0,75 g hvitt pulver (Prøve C).

Smeltepunkt, elementanalyse og NMR-spektraldata er som følger:

Smeltepunkt (dekomponeringspunkt): ca. 240°C

Elementanalyse: som $C_{20}H_{30}N_2O_9Pt$

	C	H	N	Pt
Beregnet (%)	37,68	4,74	4,39	30,60
Funnet (%)	37,44	4,56	4,40	30,9

^1H NMR (400 MHz, i D_2O , intern standard er 1H i D_2O) δ (ppm):

4,30 (t, 2H), 4,24 (t, 2H), 2,59 (t, 2H),
2,50-2,47 (m, 4H), 2,32 (s, 3H), 2,25 (s, 3H),
2,07 (d, 2H), 1,58 (m, 2H), 1,34 (m, 2H)
1,17 (m, 2H)

Referanse-eksempel 3

Prøvene A, B og C syntetisert under Referanse-eksempel 1 og 2, ble undersøkt med henblikk på deres antitumor-aktivitet etter følgende metode:

I abdominalhulen til CDF_1 -mus (hanner, 6 uker gamle, 6-10 mus/gruppe) ble det transplantert 10^5 museleukemi L1210 celler dyrket i subkultur i DBA/2-mus. Med transplantasjonsdagen som Dag 0 som utgangspunkt, ble testforbindelsene administrert separat intraperitonealt i mus på Dag 1, Dag 5 og Dag 9, i alt tre ganger. Hvert medikament ble administrert etter oppløsning eller suspensjon i 0,05% Tween 80-oppløsning. Effekten av forbindelsene ble vurdert ved bruk av T/C-verdien oppnådd ved den følgende ligning og på basis av antall overlevende mus på Dag 30.

$$\text{T/C (\%)} = \frac{\text{Gjennomsnittlig overlevelsestid for behandlede mus}}{\text{Gjennomsnittlig overlevelsestid for kontrollmus}} \times 100$$

Resultatene er vist i Tabell 4.

Tabell 4 Antitumor-aktivitet i L1210-transplanterte mus

Forb.	Dose (mg/kg)	Overlevelsestid i dager (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik)	T/C (%)	Ant.overlev. mus (Dag 30)
Kontr. gruppe	1	8.4 $\pm$ 1.0 8.5 $\pm$ 0.5	100 101	0/10 0/6
Ref.eks.1	10	11.5 $\pm$ 1.2	137	0/6
Prøve A	25	14.2 $\pm$ 3.2	169	0/6
	50	17.0 $\pm$ 3.0	202	0/6
	100	15.5 $\pm$ 5.0	185	0/6
	200	6.0	71	0/6
Kontr. gruppe	25	8.4 $\pm$ 1.2 8.5 $\pm$ 0.5	100 101	0/10 0/6
Ref.eks.1	50	8.8 $\pm$ 0.8	105	0/6
Prøve B	100	9.2 $\pm$ 1.5	110	0/6
	200	9.5 $\pm$ 2.3	113	0/6
Kontr. gruppe	1	8.4 $\pm$ 1.0 8.7 $\pm$ 0.8	100 104	0/6 0/6
Ref.eks.2	10	9.8 $\pm$ 1.6	117	0/6
Prøve C	25	9.5 $\pm$ 0.5	113	0/6
	50	8.7 $\pm$ 2.2	104	0/6
	100	8.3 $\pm$ 0.8	99	0/6
	200	6.2 $\pm$ 1.5	74	0/6
Kontr. gruppe	2	8.4 $\pm$ 1.2 13.0 $\pm$ 2.3	100 155	0/10 0/6
Cisplatin	5	13.8 $\pm$ 1.1	164	0/5
	7.5	18.3 $\pm$ 6.2	218	0/6

En terapeutisk indeks, dvs. en verdi som oppnås ved å dele LD₅₀-verdien med minimum effektiv dose (i L1210 testen, den dose som oppviser T/C = 125%), anvendes vanligvis som en indeks for sikkerhetsområdet. De terapeutiske indekser for forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen, er vist i den nedenstående tabell 5. Minimum effektiv dose ble beregnet ved intrapolering av dose-reaskjons-kurven oppnådd fra tabell 1.

Tabell 5: Sammenligning mellom sikkerhetsområder for forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen og kontrollforbindelser

Forbindelse	LD ₅₀ -verdi (mg/kg)	Minimum effektiv dose (MED; mg/kg) ^{a)}	Terapeutisk indeks ^{b)}
Forbindelse 1	132	2,0	66,0
Forbindelse 2	52	3,2	16,3
Cisplatin	16	2,4	6,7
Karboplatin	150	40,0	3,8

a) dosē som oppviser T/C = 125%

b) (terapeutisk indeks) = (LD₅₀-verdi)/(minimum effektiv dose)

Jo høyere den terapeutiske indeks er, desto bedre er sikkerhetsmarginen. Det betyr nemlig at man kan oppnå anticancer-virkning med mindre giftig virkning. Som det fremgår av ovenstående tabell 5, har forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen en meget større sikkerhetsmargin enn cisplatin og karboplatin, og de ansees derfor som anticancer-midler med en større sikkerhet.

Det er også foretatt en undersøkelse for å vurdere tumorvekst-hemming av legemidler, og denne undersøkelse er prinsipielt forskjellig fra det undersøkelsessystem som benytter L1210 leukemi for vurdering av økningen i overlevelsestid. Det amerikanske National Cancer Institute (NCI) har som sin standard at når den maksimale grad av tumorvekst-hemming er mer enn 50%, har systemet en antitumor-virkning. Den maksimale grad av tumorvekst-hemming med forbindelse 1 er vist på fig. 1-8, og er oppsummert i den nedenstående tabell 6. Som det fremgår av denne tabell, oppviser forbindelse 1 fremstilt ifølge oppfinnelsen en klar tumorhemmende virkning overfor menneskelig lungecancer, eggstokk-cancer, tykktarm-cancer, prostata-cancer, lever-cancer, bukspyttkjertel-cancer, galleveis-cancer osv. Det er således åpenbart at forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen oppviser antitumor-virkning ikke bare på muse-tumor, men også på forskjellige typer av menneske-tumor.

Undersøkelsene vist på fig. 1 til 8 er således ikke foretatt med L1210 eller lignende muse-tumor, men derimot ble menneske-tumortyper benyttet. Menneske-tumorcellerne ble innpodet i ryggen på "nakne" mus og "scid" mus som er spesielle mus som ikke har noe immunsystem som frastøter humane tumor-celler. Overlevelsestiden ble ikke bestemt i disse tumorsystemer, men bare størrelsen av tumoren, og bedømmelse av denne blir vanskelig etter ca. 17 dager.

Tabell 6: Antitumor-aktivitet av forbindelse 1 på menneske-cancer av forskjellig opprinnelse

Tumor	Opprinnelse	Maksimal grad av tumorveksthemming (%)
KF-1	eggstokk	72
PANC-1	bukspyttkjertel	78
PC-3	prostata	84
GB3-jck	galleveiene	91
HuH-7	lever	68
QG-56	lunge	78

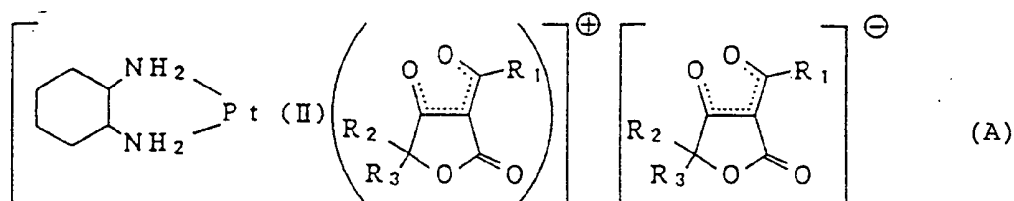
Når det gjelder BUN-verdi henvises det til fig. 9 som viser at forbindelse 1 fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse (TOP-361) har en BUN-verdi som er minst like god som for karboplatin (CBDCA) og mye mindre enn for cisplatin (CDDP).

INDUSTRIELL ANVENDELIGHET

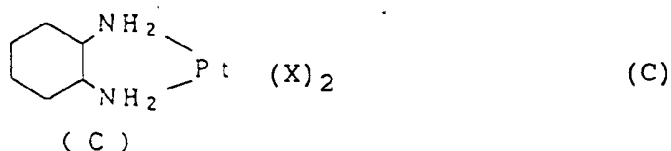
Som beskrevet ovenfor har platinakomplekset i henhold til foreliggende oppfinnelse en oppløselighet som muliggjør intravenøs administrasjon og som er stabilt i vandige oppløsninger. Det lar seg lett rense ved krystallisasjon og lignende. Det har en sterk antitumor-aktivitet og toksisiteten er lav. Platinakomplekset i henhold til foreliggende oppfinnelse er således egnet som middel for behandling av maligne tumorer.

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåte for fremstilling av et cancerhindrende platina(II)kompleks representert ved den følgende formel (A):



hvor R_1 utgjør en C_1 - C_5 -lavere hydrokarbongruppe, R_2 og R_3 utgjør et hydrogenatom eller en C_1 - C_3 -lavere hydrokarbongruppe, hvor konfigurasjonen av 1,2-diaminocykloheksan er cis, trans-l- eller trans-d-, k a r a k t e r i s e r t v e d a t e n v a n d i g oppløsning av en forbindelse med formelen



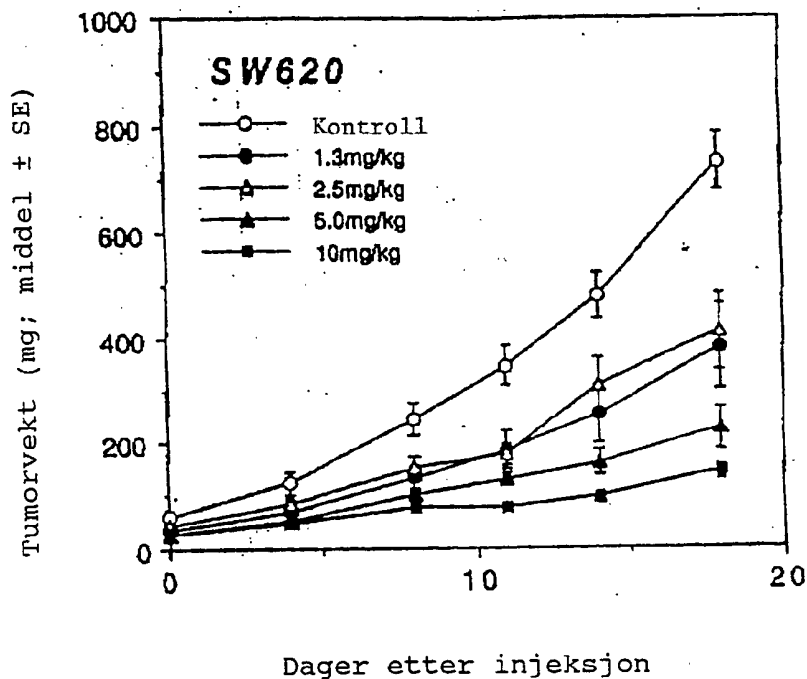
hvor konfigurasjonen av 1, 2-diaminocykloheksan er cis, trans-l- eller trans-d-, og X er et anion eller OH, settes til en vandig oppløsning av en forbindelse med formelen



hvor R_1 betyr en C_1 - C_5 lavere hydrokarbongruppe, R_2 og R_3 betyr et hydrogenatom eller en C_1 - C_3 lavere hydrokarbongruppe, i nærvær av et alkalmetallhydroksyd eller jordalkalimetallhydroksyd når X er et anion, eller i fravær av alkalmetallhydroksyd eller jordalkalimetallhydroksyd når X er OH, og platina (II) komplekset utvinnes fra oppløsningen og renses på i og for seg kjent måte.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d at anionet betegnet med X er NO_3^- eller SO_4^{--} .
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2 for fremstilling av et platina(II)kompleks med formel A, hvor R_1 er metyl,
k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.
4. Fremgangsmåte ifølge krav et av kravene 1 - 3, hvor R_2 og R_3 er et hydrogenatom eller metyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4, hvor R_2 er et hydrogenatom og R_3 er metyl, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes tilsvarende utgangsmaterialer.

FIG 1.

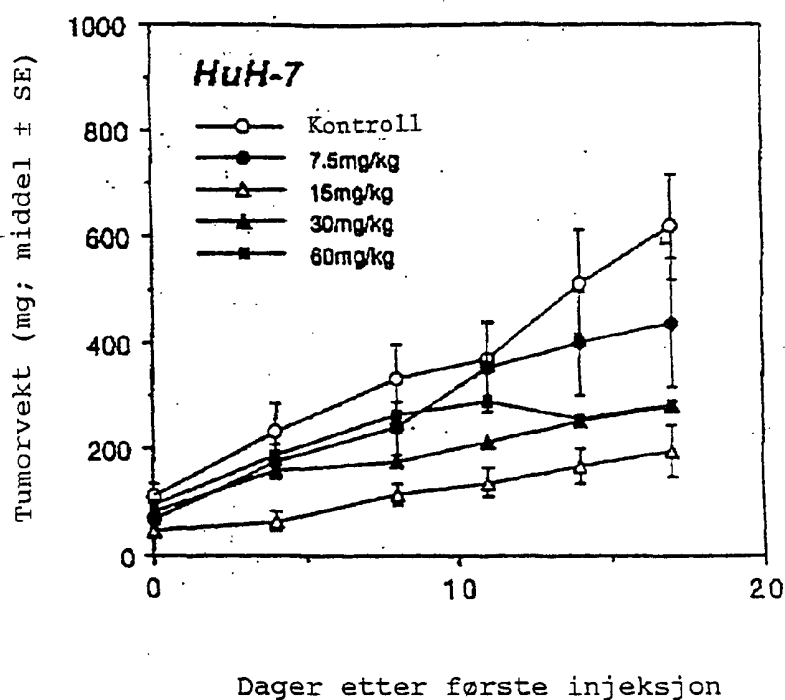


ANITUMOREFFEKT MOT SW620 HUMAN TYKKTARMCANCER I NAKNE MUS

Når SW-620 human tykktarmcarcinom som var inokulert s.c. i nakne mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 2

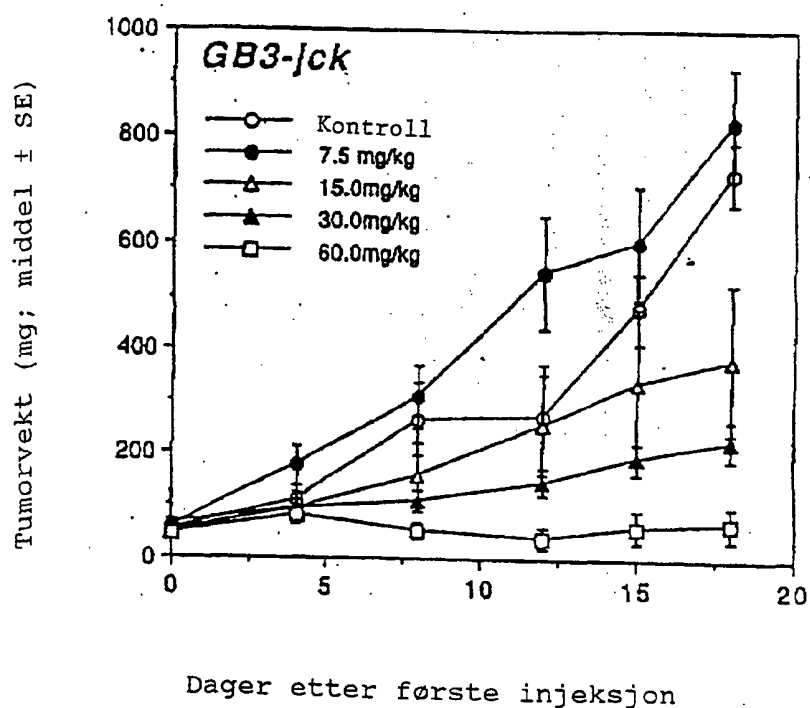


ANITUMOREFFEKT MOT HuH-7 HUMAN LEVERCANCER I SCID MUS

Når HuH-7 human hepatom som var inokulert s.c. i scid mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 3

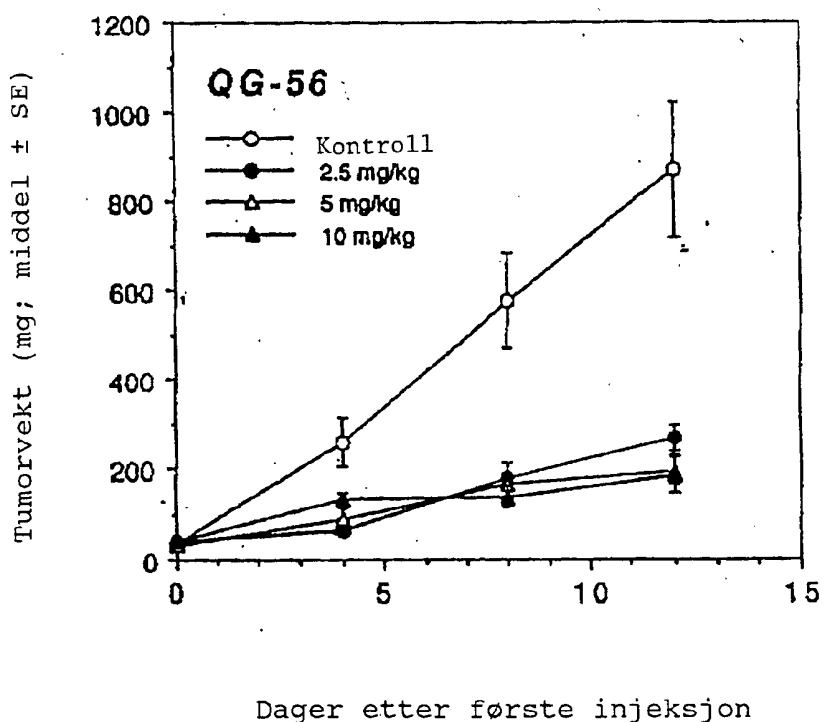


ANITUMOREFFEKT MOT GB3-JCK HUMAN GALLEVEICANCER I SCID MUS

Når GB3-JCK human galleveicancer som var inokulert s.c. i scid mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 4

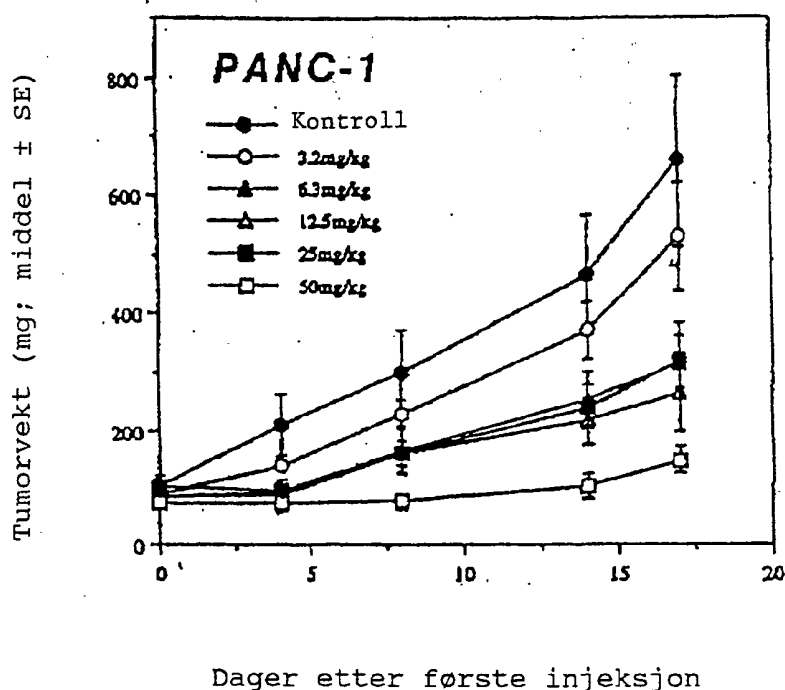


ANITUMOREFFEKT MOT QG-56 HUMAN LUNGEACANCER I NAKNE MUS

Når QB-56 human lungecancer som var inokulert s.c. i nakne mus, nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 5

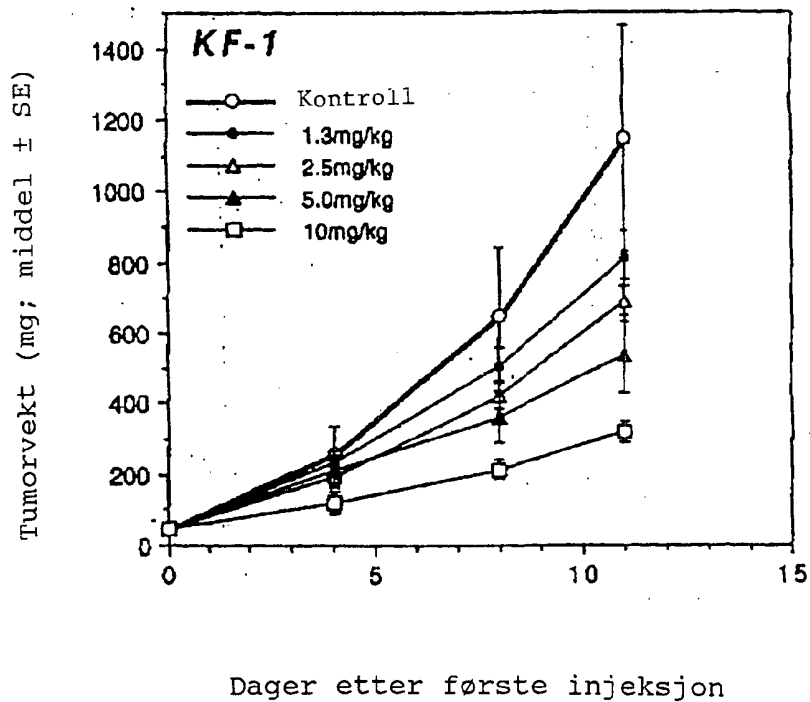


ANITUMOREFFEKT MOT PANC-1 HUMAN BUKSPYTTKJERTELCANCER I SCID MUS

Når PANC-1 human bukspyttkjertelcancer som var inokulert s.c. i scid mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 6

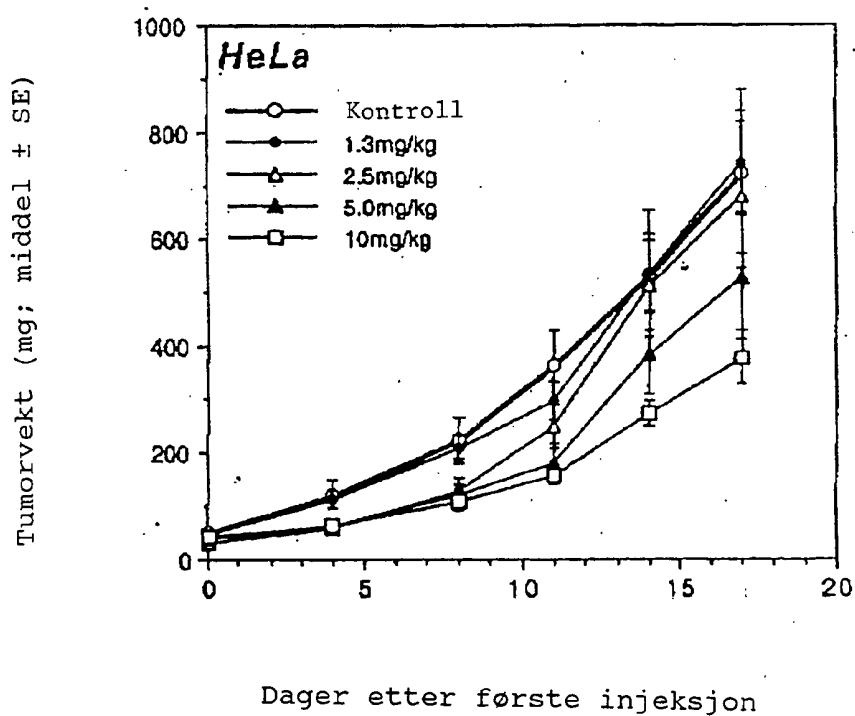


ANITUMOREFFEKT MOT KF-5 HUMAN EGGSTOKKCANCER I NAKNE MUS

Når KF-1 human eggstokkcancer som var inokulert s.c. i nakne mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorenlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 7

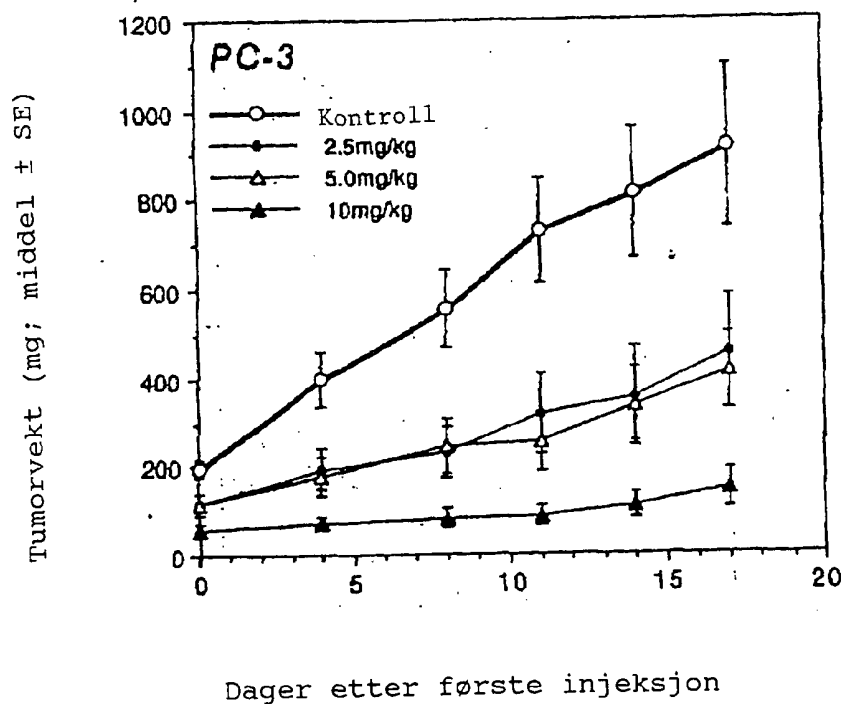


ANITUMOREFFEKT MOT HeLa HUMAN LIVMORCANCER I NAKNE MUS

Når HeLa human livmorcancer som var inokulert s.c. i nakne mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorenlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 8

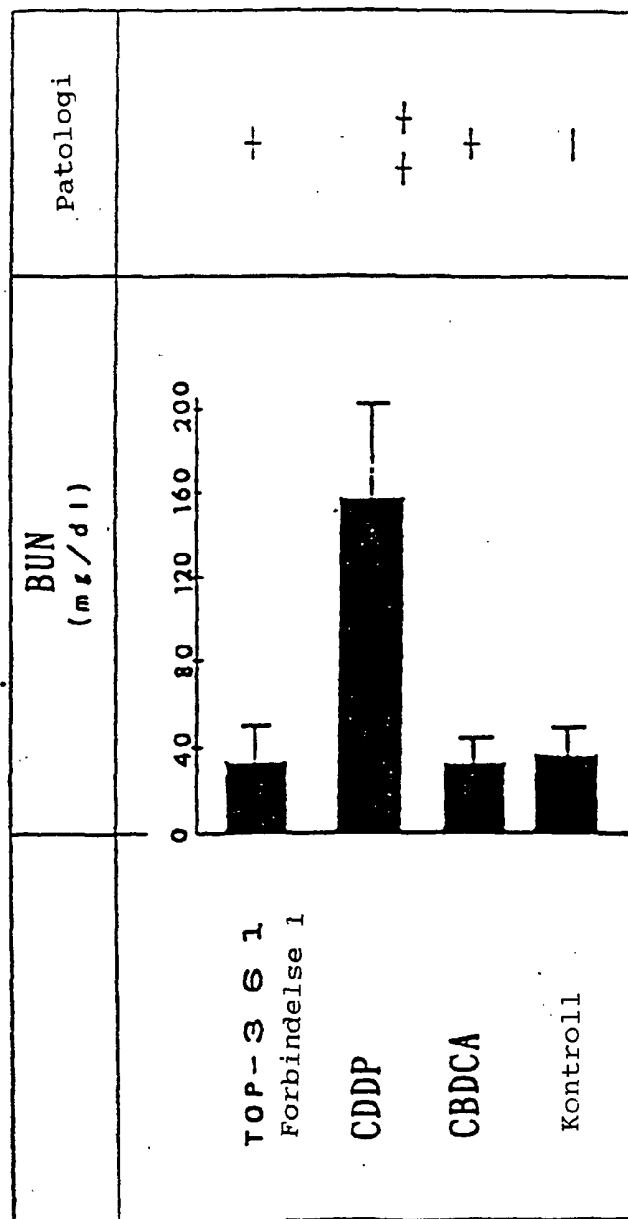


ANITUMOREFFEKT MOT PC-3 HUMAN PROSTATACANCER I NAKNE MUS

Når PC-3 human prostatacancer som var inokulert s.c. i nakne mus nådde ca. 5 mm i diameter (dag 0), ble administrasjon av prøveforbindelsen startet. Forbindelsen ble administrert intravenøst (i.v.) på dag 0, 4 og 8. Den beregnede tumorvekt ble bestemt ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Tumorvekt (mg)} = \text{tumorlengde (mm)} \times \text{tumorbredde (mm)}^2 \times 0,5$$

FIG. 9

Nyre-giftighet hos mus (dose = LD₅₀, i.p.)