

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 147145 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 3406/79

(51) Int.Cl.³: C 07 J 41/00

(22) Indleveringsdag: 14 aug 1979

(41) Alm. tilgængelig: 15 feb 1980

(44) Fremlagt: 24 apr 1984

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 aug 1978 JP 98795/78 08 dec 1978 JP 152175/78

(71) Ansøger: *KUREHA KAGAKU KOGYO KABUSHIKI KAISHA; Tokyo 103, JP.

(72) Opfinder: Kiro *Asano; JP, Humlo *Tamura; JP, Hiromitsu *Tanaka; JP, Satoru *Enomoto; JP.

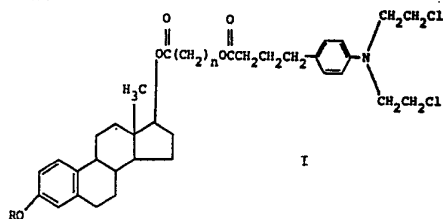
(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af
chlorambucilderivater

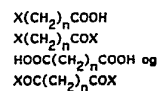
(57) Sammendrag:

3406-79

Chlorambucilderivater med formlen:



værelse af et bindemiddel udvalgt blandt forbindelser med formlerne:



hvor X betegner et halogenatom.

Chlorambucilderivaterne I, der er hidtil ukendte, er anvendelige som antitumormidler.

hvor R betegner hydrogen eller acyl og n er 1 eller 2,
fremstilles ved at omsætte chlorambucilet eller et salt deraf
med østradiol eller i β -stillingen acyleret østradiol i nær-

DK 147145 B

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte chlorambucilderivater med den i krav 1's indledning angivne almene formel, hvori R har den der angivne betydning.

5 Som det er velkendt, påvirker de fleste antitumormidler ikke blot cancerceller, men også normale celler og har følgelig alvorlige bivirkninger. De er derfor vanskelige at administrere igennem længere tid med henblik på en fuldstændig ødelæggelse af cancercellerne.

10 Fra DK pat.ans.nr. 252/77 og nr. 719/77 kendes således chlorambucilderivater med formlen 17α -[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxyacetoxy]pregn-4-ene-3,20-dion, 17α -[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxyacetoxy]-6 α -methylpregn-4-ene-3,20-dion henholdsvis 17-acetoxy-3-[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxy]-pregn-3,5-dien-20-on med anticancerogen virkning, men disse kendte chlorambucilers toksiske virkning er imidlertid så stor, at det er umuligt at opnå en effektiv kurativ virkning, d.v.s. 100% destruktion af cancerceller uden samtidig drab af værtsorganismen. Dette er imidlertid muligt med chlorambucilforbindelserne fremstillet ifølge nærværende opfindelse takket være en kombination af mindre 20 toksicitet og større anticancerogen virkning for samme daglige dosisstørrelse, jvf. efterfølgende sammenlignende afprøvning af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen og de fra ovennævnte DK patentansøgninger kendte forbindelser.

25 Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge opfindelsen har den i indledningen angivne almene formel (I), hvori R har den dér angivne betydning, og fremgangsmåden er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del angivne.

30 Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse har særlig affinitet til cancerceller og har en særlig virkning ved selektivt at angribe cancerceller.

De specifikke cancerceller har receptorer for steroidhormoner, navnlig østradiolderivater som komponenten i chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse.

35 Receptorerne kan være målet for chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse. Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse angriber følgelig cancerceller, der har receptorer for østradiol og dets derivater.

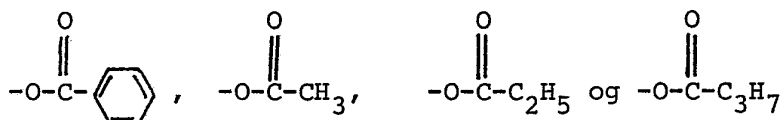
Disse cancerformer omfatter brystcancer, prostatacarcinoma, hepatoma, struma- og endometriumcarcinoma. Produkterne fremstillet ifølge

den foreliggende opfindelse er særligt effektive overfor brystcancer, endometriumcarcinoma og prostatacarcinoma.

Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse spredes selektivt til en organismes cancerceller og angriber cancercellerne uden bivirkning.

Det særlige ved forbindelserne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse er, at østradiol eller dets derivat bindes til chlorambucil uden tab af aktive steder på østradiolet eller dets derivat og uden tab af aktive antitumorsteder på chlorambucilet.

Det foretrækkes at omdanne OH-gruppen i 3-stillingen på østradiol til en acyloxy-gruppe, såsom:



Acyloxygruppen omdannes let til en OH-gruppe i en organisme af et legeme til binding af receptorerne i cellerne.

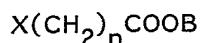
Chlorambucilderivaterne fremstilles ifølge den foreliggende opfindelse ved at binde chlorambucil til hydroxylgruppen i 17-stillingen af østradiol eller dets derivat med en halogen-alkansyre eller et halogenid deraf.

De optimale midler til binding af østradiol eller dets derivat med chlorambucil omfatter monobromacetyl bromid, monochloracetylchlorid, monochloreddikesyre og monobromeddikesyre.

Chlorambucilet og østradiolet eller dets derivat omsættes med halogen-alkansyren eller halogenidet deraf ved de i kravet angivne fremgangsmåder.

Ved en fremgangsmåde omsættes halogen-alkansyren eller halogenidet deraf f.eks. først med østradiol eller acyleret østradiol, og derpå omsættes det modificerede østradiol eller dets acylerede derivat med chlorambucil. Ved en anden fremgangsmåde omsættes halogen-alkansyren eller halogenidet deraf først med chlorambucil, og derpå omsættes det modificerede chlorambucil med østradiol eller acyleret østradiol.

Ved den første fremgangsmåde reagerer halogen-alkansyren eller halogenidet deraf med en ikke-aktiv position af østradiol eller acyleret østradiol til opnåelse af en ester med formlen:



hvor B betegner en østradiol- eller acyleret østradiolrest, fra hvilken OH-gruppen i 17-stillingen er fjernet, og X betegner et halogenatom.

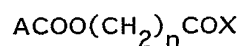
Derpå reagerer esterens halogen med chlorambucil til frembringelse af chlorambucilderivatet.

Reaktionerne vil blive yderligere belyst i det følgende.

Halogen-alkansyren eller halogenidet deraf, såsom monobromacetyl-bromid, reagerer med OH-gruppen i 17-stillingen af østradiol eller acyleret østradiol, der har en acylgruppe i 3-stillingen, i et opløsningsmiddel, såsom carbontetrachlorid, chloroform, tetrahydrofuran, dimethylsulfoxid (DMSO), dimethylformamid (DMF), pyridin og acetone. Reaktionsproduktet reagerer yderligere med chlorambucil i et opløsningsmiddel, såsom dimethylsulfoxid, dimethylformamid, pyridin, toluen, carbontetrachlorid, chloroform, tetrahydrofuran (THF). Chlorambucil kan anvendes i form af en syre eller dennes metalsalt, såsom sølvsalt og alkalimetalsalt.

Temperaturen for hver reaktion ligger sædvanligvis mellem -30°C og 100°C , fortrinsvis mellem -10°C og 80°C . Reaktionstiden ligger sædvanligvis mellem fra 0,5 til 74 timer. Reaktionsproduktet renses ved passende rensningsmetoder til opnåelse af chlorambucilderivatene ifølge den foreliggende opfindelse.

Ved den anden fremgangsmåde reagerer halogen-alkansyren eller halogenidet deraf med carboxylgruppen i chlorambucil til opnåelse af en forbindelse med formlen:



hvor A betegner en chlorambucilrest, fra hvilken COOH-gruppen i 1-stillingen er fjernet. Derpå reagerer forbindelsens halogen (X) med OH-gruppen i 17-stillingen af østradiol eller acyleret østradiol, der har en acylgruppe i 3-stillingen, til frembringelse af chlorambucilderivatene.

De ved disse reaktioner benyttede opløsningsmidler er respektivt de samme som dem for reaktionen af chlorambucil eller østradiol eller acyleret østradiol.

Reaktionstemperaturen og reaktionstiden kan vælges inden for de samme områder.

OH-gruppen i 3-stillingen af østradiolkomponenten i chlorambucilderivatet fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse kan være acyleret inden eller kan acyleres efter binding af chlorambucilet til østradiolen med halogen-alkansyren eller et halogenid deraf, men det foretrækkes at benytte en inden bindingen præacyleret østradiolkomponent.

Fremstillingen af den præacylerede østradiolkomponent, der dog ikke er en del af nærværende opfindelse, kan udføres ved at OH-gruppen i 3-stillingen af østradiol omsættes med alkalimetahydroxid i et opløs-

ningsmiddel, såsom THF, til omdannelse af den til en NaO-gruppe eller KO-gruppe, og derpå omsættes reaktionsproduktet yderligere med et acylchlorid, såsom benzoylchlorid, acetylchlorid og propionylchlorid, til opnåelse af den acylerede østradiol.

5 Temperaturen for hver enkelt reaktion ved fremgangsmåderne ifølge opfindelsen ligger sædvanligvis i området fra -30°C til 100°C , fortrinsvis -10°C til 80°C . Reaktionstiden ligger sædvanligvis i området fra 0,5 til 74 timer. Det resulterende produkt renses ved sædvanlige rensningsmetoder til opnåelse af chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse.

10 Nogle fremgangsmåder ifølge den foreliggende opfindelse til fremstilling af chlorambucilderivaterne vil blive belyst ved nogle eksempler, hvor reaktionsbetingelserne vælges på passende måde.

 Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse har som konjugater af chlorambucil og østradiol eller acyleret østradiol formen (I). Denne kendsgerning blev bekræftet ved IR-spektra, UV-spektra, NMR, TLC, massespektra, grundstofanalyse og smeltepunktbestemmelse på produkterne.

 Ifølge undersøgelser af akut toxicitet, indføring af forbindelsen i østrogensensitive celler og antitumorvirkning har chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse bemærkelsesværdig lav toxicitet og bemærkelsesværdig høj bindingsevne til østrogensensitive celler og stor antitumorvirkning.

 Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse er særligt effektive til ødelæggelse af cancervæv og -celler, der er østradiolsensitive, og de kan følgelig anvendes til brystcancer, prostatacarcinoma, hepatoma, struma- og endometriumcarcinoma. Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse er også virkningsfulde ved mavecancer, rectal cancer, laryngial cancer, øsophaguscarcinoma, lungecancer, hudcancer og leukosarcoma, og de har bemærkelsesværdig lav toxicitet i sammenligning med kendte anticancermidler eller antitumormidler, såsom chlorambucil alene. Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse har ikke østradiols specifikke seksuelle funktion, selv om de er østradiolderivater.

35 Grunden hertil kendes ikke på nuværende tidspunkt. Det antages, at disse virkninger understøttes af visse ukendte mekanismer ved siden af den medicinske virkning, der er baseret på det sædvanlige receptorbegreb.

Når chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse anvendes som terapeutisk medicin, kan lægemiddelsammensætninger til indgivelse fremstilles ved de for kendte antitumormidler sædvanlige metoder.

5 Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse kan formuleres i ønskelige former til injektion, oral indgivelse, suppositorier eller pasta. Når de formuleres til faste former til oral indgivelse, såsom tabletter, piller, granula, pulvere og kapsler, er det muligt at tilblende et bindemiddel, et fortyndingsmiddel, et fyldstof, et
10 smøremiddel, en olie, et overfladeaktivt middel eller en disintegrator i formulationen. Når de formuleres til flydende former til oral indgivelse, kan formulationen være en vandig suspension, en olieagtig suspension, en opløsning, en sirup eller en rystemikstur. Når de formuleres til suppositorieformen, kan formulationen fremstilles under anvendelse af en
15 hydrofob eller hydrofil basis og en stabilisator, en disintegrator eller et farvningsmiddel. Når de formuleres til injektionsformen, kan der tilføjes en vandig opløsning, et opløsningsmiddel, et næringsmiddel, en stabilisator og et overfladeaktivt middel. Til at opretholde eller forbedre den medicinske virkning kan der efter ønske inkorporeres en base, en
20 syre eller et salt. Mængden af aktivt ingrediens i sammensætningen (præparationen) ligger sædvanligvis fra 0,001 til 90 vægtprocent og fortrinsvis fra 0,01 til 60%.

De formulerede chlorambucilderivater kan administreres ved oral indgift, percutan adsorption, intramuskulær injektion, intraperitoneal
25 injektion, subcutan injektion, intravenøs injektion, intrarectal injektion og lokal administration.

Dosis for chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse ligger i området fra ca. 0,01 til 50 mg/kg/dag/voksnet individ ved oral indgift, og det ligger i området fra ca. 0,001 til 20 mg/kg/
30 dag/ voksnet individ ved intravenøs injektion.

Chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse har følgende egenskaber:

(1). Når der er dannet cancer i et væv med receptorer, angriber produktet selektivt cancercellerne i vævet og dræber cancercellerne. På
35 denne måde er det virksomt i kun små doser.

(2). Produktet har mindre bivirkning i sammenligning med den ved indgivelse af chlorambucil. Det kan derfor indgives i lang tid, og følgelig kan cancercellerne destrueres fuldstændigt.

(3). Det som bærekomponenten i chlorambucilderivatet benyttede østradiol eller acyleret østradiol har en enkelt strukturel sammensætning, og dets fysiologiske virkning er velkendt, hvorfor produktet kan indgives uden bekymring.

(4). Strukturen og virkningen af antitumorkomponenten i chlorambucilderivatet er allerede kendt, hvorfor produktet kan indgives uden bekymring.

(5). Cancecellernes receptorer kan undersøges. Det tilsvarende steroidhormon eller dets derivat kan udvælges som bærekomponent for chlorambucildervatet. Den terapeutiske virkning ved forskellige cancere kan tages i betragtning ved udvælgelse af bærekomponenten.

(6). Chlorambucilderivatet kan administreres i sædvanlige formuleringer, såsom oral indgivelse, injektion og suppositorieindgivelse.

Den foreliggende opfindelse vil blive yderligere belyst ved nogle eksempler.

EKSEMPEL 1

Fremstilling af 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlor-ethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

I) Fremstilling af 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat.

10 g 1,3,5(10)-østratrien-3,17β-diol blev opløst i 400 ml vandfri tetrahydrofuran (THF), og derpå blev der tilsat 8,8 g pyridin.

En opløsning af 22,5 g monobromacetyl bromid i 74 g carbontetrachlorid blev dråbevis tilsat til den resulterende opløsning ved ca. -5°C til -7°C. Blandingen blev opbevaret 1 nat. Efter reaktionen blev det resulterende præcipitat fraskilt ved filtrering. Opløsningsmidlet blev afdestilleret fra filtratet. Remanensen blev opløst i ether og rekrystalliseret fra ether til opnåelse af 1,3,5(10)-østratrien-3,17β-bis(monobromacetat). 2 g af produktet blev opløst i 900 ml methanol og opløsningen blev afkølet til -5°C. En opløsning af 0,24 g K₂CO₃ i 20 ml vand blev dråbevis tilsat til den resulterende opløsning. Efter 30 minutters reaktion blev 1000 ml vand tilsat, og det resulterende præcipitat blev fraskilt og tørret. Det blev ved grundstofanalyse og IR-spektrum bekræftet, at produktet var 3-hydroxy-1,3,5(10)-østradien-17β-monobromacetat.

II) Fremstilling af 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4[p-[bis(2-chlor-ethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat. (Chlorambucil-østradiolkonjugat)

200 mg sølv[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat (sølv salt af chlorambucil) blev tilsat 10 ml DMSO til dannelse af en hvid, colloidal opløsning.

Derpå blev der tilsat 190,8 mg 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat, og blandingen blev i mørke omrørt ved stuetemperatur i 64 timer. Præcipitatet skiftede til en gulliggrøn farve. Der blev tilsat en lille mængde acetone, og præcipitatet blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter. Præcipitatet skiftede fra gulliggrøn farve til en sortagtig grøn farve ved lysbestråling. Filtratet var farveløst og transparent. DMSO blev afdestilleret under reduceret tryk på et vandbad ved 80°C, og der blev tilsat 100 ml vand til præcipitering af hvide krystaller. Krystallerne blev opbevaret i 1 time til fjernelse af DMSO, og krystallerne blev frasepareret med et G-4 filter, vasket grundigt med destilleret vand og tørret under reduceret tryk i en desiccator. Det urensede udbytte var 330,5 mg.

a. Rensning af produktet

330,5 mg råkrystaller blev opløst i et blandet solvent af 50 volumendele cyclohexan og 10 volumendele ethylacetat. Opløsningen blev langsomt ført gennem en søjle, der var fyldt med 40 g silicagel, og produktet blev gradvist adskilt, hvorved der opnåedes 188,2 mg rent produkt (udbytte: 62,86%).

Resultaterne af grundstofanalyse, smeltepunktsbestemmelse og IR-spektrum på produktet er som følger:

Grundstofanalyse:

	C	H	N	Cl
Fundet (%):	66,0	7,0	2,3	11,0
Beregnet (%):	66,22	6,98	2,27	11,52

Smeltepunkt: halvsmelter ved 25°C.

IR-spektrum (cm⁻¹)

	3420	2920	2840	1750	1740	1612	1582	1516
	1450	1380	1350	1280	1250	1210	1175	1142
	1070	1000	960	917	867	810	800	740
	655							

EKSEMPEL 2

Fremstilling af 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlor-ethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

10 g 1,3,5(10)-østratrien-3,17β-diol blev opløst i 100 ml THF, og der blev tilsat 10 ml af en vandig opløsning indeholdende 1,47 g NaOH. Blandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter. Blandingen

blev derpå koncentreret til tørhed under reduceret tryk på et vandbad ved 80°C til fjernelse af vandet. Remanensen blev opløst i vandfri THF, og til den resulterende opløsning blev der dråbevis tilsat 50 ml af en ethyletheropløsning indeholdende 5,5 g benzoylchlorid, hvorpå reaktionen blev udført ved stuetemperatur i 16 timer. Efter reaktionen blev den fremkomne natriumchlorid fraskilt på sædvanlig måde. Filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk. Til fjernelse af ikke-om-

5 sat benzoylchlorid blev der tilsat 200 ml af en vandig 0,1 N NaOH-opløsning, og blandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 15 minutter. De

10 resulterende hvide krystaller blev fraskilt med et G-3 filter, blev vasket grundigt med destilleret vand og tørret under reduceret tryk i en desiccator.

Produktet blev analyseret ved tyndtlagschromatografi på silicagel med en blandet udviklings-solvent (ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 50:30), hvorved der fremkom en hovedplet med $R_f = 0,34$.

Råkrystallerne blev rekrystalliseret fra ethylacetat, og der blev derved opnået 8,6 g hvide krystaller.

Ved smeltepunktsbestemmelsen, grundstofanalyse og IR-spektrum blev det bekræftet, at produktet er 17 β -hydroxy-1,3,5(10) østratrien-3-benzoat.

20

Af det resulterende produkt blev 7,0 g opløst i THF, og der blev tilsat 2,0 g pyridin, og blandingen blev afkølet til -5°C.

En opløsning indeholdende 15,5 g 30% monobromacetyl bromid-carbontetrachlorid i 50 ml THF blev efterhånden dråbevist tilsat den resulterende blanding. Efter tilsætningen blev blandingen omrørt ved -5°C i 2 timer og derpå på et isbad i 4 timer og blev endeligt opbevaret i et køleskab i 16 timer. Efter reaktionen blev det resulterende hvide præcipitat fraskilt med et G-4 filter, tørret under reduceret tryk på et vandbad ved 30°C, 200 ml ethylether blev tilsat, og blandingen blev omrørt, hvorved der opnåedes 5,3 g hvide krystaller.

25

30

Resultaterne af grundstofanalysen og smeltepunktsbestemmelse er som følger:

35 Grundstofanalyse:

	C	H	Br
Fundet (%):	64,3	5,8	15,7
Beregnet (%):	64,23	5,78	15,8
Smeltepunktsbestemmelse:	145-146°C		

Produktet blev analyseret ved tyndtlagschromatografi på silicagel med en blandet udviklings-solvent (ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 50:30), hvorved der fremkom en enkelt plet med $R_f = 0,77$. På IR-spektret blev der ikke konstateret absorption baseret på OH-gruppen, og det var følgelig bekræftet, at produktet er 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -monobromacetat.

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

	2920	1735	1728	1595	1579	1490
10	1448	1412	1382	1286	1280	1260
	1210	1200	1170	1145	1095	1075
	1019	1004	897	780	700	680

182,3 mg 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -monobromacetat og 148,5 mg 0,6 sølv 4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat blev tilsat til 5 ml DMSO, og reaktionen blev udført i mørke ved stuetemperatur i 3 dage. Efter reaktionen blev det præcipiterede sølvbromid fraskilt ved filtrering, og til filtratet blev der tilsat 400 ml vand. Det resulterende hvide præcipitat blev fraskilt ved centrifugeringsadskillelse. Præcipitatet blev opløst i 50 ml acetone, og det uopløselige materiale blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter.

Filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 165 mg af et olieagtigt produkt.

Produktet blev analyseret ved tyndtlagschromatografi på silicagel med en blandet udviklings-solvent (ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50), hvorved der fremkom en hovedplet med $R_f = 0,44$.

Da der var ikke-omsat materiale tilbage, blev reaktionsproduktet chromatograferet på silicagel med en blandet solvent (ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50) til opnåelse af et rensede produkt. Det rensede produkt var en hvid, krystallinsk forbindelse ved 20°C. Resultaterne af grundstofanalyse og IR-spektrum af produktet er som angivet nedenfor. Det blev bekræftet, at produktet er 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

Grundstofanalyse:

	C	H	N	Cl
Fundet (%):	68,5	6,60	1,99	9,79
Beregnet (%):	68,33	6,53	1,94	9,86

5 Smeltepunkt ($^{\circ}\text{C}$) 110-111.

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

	2920	2860	1755	1735	1612	1582
	1516	1491	1450	1420	1380	1355
10	1260	1224	1210	1174	1145	1079
	1022	1005	960	915	890	800
	740	705				

EKSEMPEL 3

15 Fremstilling af 3-propionyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlor-ethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat

10 g 1,3,5(10)-østratrien-3,17 β -diol blev opløst i 100 ml THF, og der blev tilsat 10 ml af en vandig opløsning indeholdende 1,47 g NaOH, og blandingen blev omrørt ved stuetemperatur i 30 minutter. Reaktionsproduktet blev koncentreret til tørhed under reduceret tryk på et vandbad ved 80°C til fjernelse af vandet. Remanensen blev opløst i vandfri THF, og der blev dråbevist tilsat en opløsning indeholdende 3,40 g propionylchlorid i 50 ml vandfri THF, hvorpå reaktionen blev udført ved stuetemperatur i 16 timer. Efter reaktionen blev natriumchloridpræcipitatet fraskilt, og filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk, og remanensen blev rekrystalliseret fra ethanol, hvorved der opnåedes 9 g hvide krystaller.

Det blev ved grundstofanalyse og IR-spektrum bekræftet, at produktet er 17 β -hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-3-propionat.

30 7,0 g af produktet blev opløst i 70 ml vandfri THF, 3,0 g pyridin blev tilsat og blandingen blev afkølet til -5°C . En opløsning indeholdende 17,3 g 30% monobromacetyl bromid-carbontetrachlorid i 50 ml THF blev dråbevist tilsat til den resulterende blanding. Efter tilsætningen blev blandingen holdt ved -5°C i 2 timer og derpå opbevaret i et køleskab
35 i 16 timer til omsætning af dem. Efter reaktionen blev det resulterende præcipitat fraskilt ved filtrering. Filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk på et vandbad ved 30°C , hvorpå 200 ml ethyl-ether blev tilsat og blandingen blev omrørt, hvorved der opnåedes 6,0 g hvide krystaller. Filtratet blev yderligere koncentreret, hvorved der

opnåede 3,5 g hvide krystaller. Krystallerne blev rekrystalliseret fra en blandet solvent af ether og ethanol.

Resultatet af grundstofanalysen er som følger.

5 Grundstofanalyse:

	C	H	Br
Fundet (%):	61,5	6,5	17,9
Beregnet (%):	61,43	6,45	17,78

10 I IR-spektrret blev der ikke konstateret absorption baseret på OH-grupper, og det blev følgelig bekræftet, at produktet er 3-propionyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat.

15 1,0 g af produktet og 0,91 g sølv 4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat blev dispergeret og opløst i 50 mg DMSO, og reaktionen blev udført i mørke ved stuetemperatur i 3 dage. Efter reaktionen blev sølvpræcipitatet fraskilt ved filtrering, og der blev tilsat 4 l vand. Præcipitatet blev fraskilt ved centrifugeringsadskillelse, og det hvide præcipitat blev opløst i 50 ml acetone, og uopløseligt materiale blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter. Filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 1,3 g af et olieagtigt produkt.

20 For at rense produktet blev det chromatograferet på silicagel med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50. Det rensede produkt var ved 20°C et viskøst, olieagtigt produkt.

Resultaterne af grundstofanalyse og IR-spektrum var som følger.

25 Grundstofanalyse:

	C	H	N	Cl
Fundet (%):	67,1	7,0	2,1	11,0
Beregnet (%):	66,0	6,99	2,08	10,56

30 IR-spektrum (cm⁻¹):

2916 2840 1750 1740 1610 1512 1488 1441
1415 1379 1361 1270 1210 1200 1170 1140
1068 1004 956 931 885 817 793 735 cm⁻¹.

35 Det blev bekræftet, at produktet er 3-propionyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

EKSEMPEL 4Fremstilling af 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chloroethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

1,0 g 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat, der var opnået ved samme proces som i eksempel 2, og 0,9 g sølv 4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat blev tilsat til 50 ml DMSO, og reaktionen blev udført i mørke ved 25⁰C i 3 dage. Efter reaktionen blev sølvbromid-præcipitatet fraskilt, og til filtratet blev der tilsat 4 l vand. Det resulterende hvide præcipitat blev fraskilt ved centrifugeringsadskillelse. Præcipitatet blev opløst i 50 ml acetone. Det uopløselige materiale blev fraskilt med et G-4 filter, og filtratet blev inddampet til tørhed under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 1,2 g af et olieagtigt produkt. Produktet blev chromatograferet på silicagel med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50. Det rensede produkt var ved 20⁰C et viskøst, olieagtigt materiale.

Resultatet af grundstofanalysen var som følger.

Grundstofanalyse:

	C	H	N	Cl
Fundet (%):	66,0	6,9	2,0	10,9
Beregnet (%):	65,64	6,84	2,13	10,79

I IR-spektret blev der ikke konstateret absorption baseret på OH-gruppe, det blev følgelig bekræftet, at produktet er 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

IR-spektrum (cm⁻¹):

2915	2840	1750	1740	1610	1512
1488	1442	1415	1378	1360	1270
1210	1200	1170	1140	1068	1005
956	931	885	817	793	735

EKSEMPEL 5

1 g 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat og 0,8 g natrium 4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat blev tilsat 50 ml THF til omsætning af dem ved 60⁰C i 24 timer.

Efter reaktionen blev præcipitatet fraskilt ved filtrering, og filtratet blev koncentreret og tørret. Produktet blev separeret og rensat på en silicagel-søjle med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan, hvorved der opnåedes 0,9 g rensat produkt. Produktet var 3-acetoxy-

1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

EKSEMPEL 6

5 Fremstilling af 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlor ethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

200 mg sølv 4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyrat (sølv salt af chlorambucil) blev tilsat til 10 ml DMSO til dannelse af en hvid, colloidale opløsning. Til den colloidale opløsning blev der derpå tilsat 190,8 mg 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-monobromacetat, og blandingen blev i mørke omrørt ved stuetemperatur i 64 timer. Efter 64 timer skiftede præcipitatet til en gulliggrøn farve. En lille mængde acetone blev tilsat til præcipitatet, og præcipitatet blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter. Filtratet var farveløst og transparent. DMSO blev afdestilleret på et vandbad ved 80°C, og derpå blev der tilsat 100 ml vand til præcipitering af hvide krystaller. Blandingen blev opbevaret i en time, og DMSO blev derpå afdestilleret. De hvide krystaller blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter, blev derpå vasket med destilleret vand og tørret under reduceret tryk i en desiccator. Det urensede udbytte var 330,5 mg.

330,5 mg urensede produkt blev opløst i en blandet solvent af cyclohexan og ethylacetat i et volumenforhold på 50:10. Opløsningen blev langsomt ført gennem en søjlefyldning af 40g silicagel til gradvis separering af produktet, og der blev opnået 188,2 mg rent produkt (udbytte: 62,86%).

Resultaterne af grundstofanalyse og smeltepunktsbestemmelse på produktet er som følger.

Grundstofanalyse:

30	C	H	N	Cl
Fundet (%):	66,0	7,0	2,3	11,0
Beregnet (%):	66,22	6,98	2,27	11,52

Smeltepunkt: halvsmeltet ved 25°C.

Det blev bekræftet, at produktet er 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

50 mg af produktet blev opløst i 1 ml vandfri pyridin, og der blev tilsat 1 ml eddikesyreanhydrid til omsætning af dem i et køleskab i 16 timer. Efter reaktionen blev reaktionsblandingen koncentreret og tørret under reduceret tryk på et vandbad ved 30°C. Resten blev tilblandet

destilleret vand, og blandingen henstod 1 time, hvorved der udfældedes et olieagtigt produkt i hvid colloidal form. Pyridin og eddikesyre blev fjernet sammen med destilleret vand, og produktet blev vasket med vand til neutralitet. Det olieagtige produkt blev fraskilt fra en vandig opløsning, koncentreret og tørret i en desiccator under reduceret tryk, hvorved der opnåedes 45 mg af et olieagtigt produkt.

Produktet blev analyseret ved tyndtlagschromatografi på silicagel med en blandet udviklings-solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 30:50, hvorved der fremkom en enkelt plet med $R_f = 0,78$.

Til rensning af produktet blev dette chromatograferet på silicagel med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50. Det rensede produkt var ved 20°C en viskøs, olieagtig forbindelse.

Resultatet af grundstofanalysen var som følger.
Grundstofanalyse:

	C	H	N	Cl
Fundet (%):	66,0	6,5	2,0	10,9
Beregnet (%):	65,64	6,84	2,13	10,79

I IR-spektret blev der ikke konstateret absorption baseret på OH-gruppe, og det var følgelig bekræftet, at produktet er 3-acetoxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

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

2915	2840	1750	1740	1610	1512
1488	1442	1415	1378	1360	1270
1210	1200	1170	1140	1068	1005
956	931	885	817	793	735

30

EKSEMPEL 7

Fremstilling af 3-propionyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

50 mg 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17β-[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat blev opløst i 1 ml vandfri pyridin, og der blev tilsat 1,5 ml propionsyreanhydrid, hvorefter blandingen blev opbevaret i et køleskab i én dag. Reaktionsblandingen blev inddampet til tørhed under reduceret tryk på et vandbad ved 30°C. Remanensen blev blandet med destilleret vand, og blandingen henstod i 2 timer

til dannelse af et colloidt, olieagtigt produkt. Pyridin og eddikesyre blev fjernet med destilleret vand, og produktet blev vasket med vand til neutralitet. Vandfasen blev fraskilt, og oliefasen blev tørret under reduceret tryk i en desiccator, hvorved der opnåedes 40 mg af et olieagtigt produkt. For at rense produktet blev det chromatograferet på silicagel med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50. Det rensede produkt var en viskøs, olieagtig forbindelse. I IR-spektret blev der ikke konstateret absorption ved 3600-3200 cm^{-1} . I betragtning af resultatet var det bekræftet, at produktet er 3-propionyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

EKSEMPEL 8

Fremstilling af 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

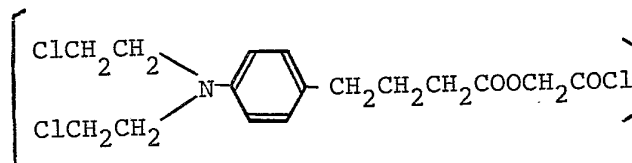
50 mg 3-hydroxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat blev opløst i 1 ml vandfri pyridin, og der blev tilsat 2 g benzosyreanhydrid, hvorpå blandingen blev opbevaret i et køleskab i en dag. Reaktionsblandingen blev indampet til tørhed under reduceret tryk på et vandbad ved 30°C. Remanensen blev tilblandet destilleret vand, og blandingen henstod i 1,5 time til dannelse af et colloidt, olieagtigt produkt. Pyridin og eddikesyre blev fjernet med destilleret vand, og produktet blev vasket med vand til neutralitet. Vandfasen blev fraskilt, og oliefasen blev indampet til tørhed under reduceret tryk i desiccator, hvorved der opnåedes 45 mg af et olieagtigt produkt.

For at rense produktet blev det chromatograferet på silicagel med en blandet solvent af ethylacetat og cyclohexan i et volumenforhold på 10:50. Det rensede produkt var en viskøs, olieagtig forbindelse.

I IR-spektret blev der ikke konstateret absorptionsbånd ved 3600 til 3200 cm^{-1} . I lyset af denne kendsgerning var det bekræftet, at produktet er 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-østratrien-17 β -[4-[p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl]butyryloxy]acetat.

EKSEMPEL 9Fremstilling af 3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-[bis(2-chlor-ethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetat.

1000 mg Sølv-[4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyrat], (sølv-saltet af chlorambucil), blev sat til 10 ml DMSO til dannelse af en hvid kolloidal opløsning. Derpå blev 406,6 mg monobromeddikesyre tilføjet, og den resulterende blanding blev omrørt ved stuetemperatur i 48 timer i mørke. Precipitatet ændrede farve til gulligtgrøn. En lille mængde acetone blev tilføjet, og præcipitatet blev fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter. Filtratet var farveløst og transparent. DMSO blev afdestilleret under reduceret tryk på et vandbad ved 80°C, og der blev tilføjet 100 ml vand til dannelse af hvide krystaller. De hvide krystaller (552,4 mg) blev opløst i 10 ml THF, og POCl₃ (468,1 mg) blev derpå tilføjet ved stuetemperatur. Efter omsætningen blev POCl₃ afdestilleret under reduceret tryk til opnåelse af 4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetylchlorid.



De rå krystaller (220 mg) af 4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetylchloridet blev sat til 10 ml pyridin til dannelse af en opløsning heraf. Derpå blev 51 mg 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol tilsat til opløsningen, og den resulterende blanding blev omrørt ved stuetemperatur i 24 timer. Efter 24 timer blev præcipitatet fraskilt ved filtrering gennem et G-4 filter. Filtratet var farveløst. 134 mg af produktet blev opløst i en blandet solvent (methanol og acetone i volumenerforholdet 50:50), og opløsningen blev afkølet til 0°C. 11 mg K₂CO₃ opløst i 2 ml vand blev dråbevist tilsat til den resulterende opløsning. Efter 60 minutters reaktion blev der tilsat 100 ml vand, og det resulterende præcipitat blev fraskilt og tørret.

De rå krystaller blev opløst i en blandet solvent bestående af 50 volumendele cyclohexan og 10 volumendele ethylacetat. Opløsningen blev langsomt ledt gennem en søjle, der var fyldt med 40 g silicagel, og produktet blev gradvist adskilt til opnåelse af 69 mg rent produkt. Ved elementær analyse og IR-spektret blev det bekræftet, at produktet var 3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetat.

EKSEMPEL 10

Fremstilling af 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetat.

380 mg 4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxyacetylchlorid blev sat til 10 ml pyridin til dannelse af en opløsning.

Derpå blev 130 mg 17 β -hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-3-benzoat tilblandet ved stuetemperatur. Efter 24 timer blev pyridinen afdestilleret under reduceret tryk på et vandbad ved 40°C. Remanensen blev opløst i en blandet solvent bestående af 50 volumendele cyclohexan og 10 volumendele EttoH. Opløsningen blev langsomt ledt gennem en søjle fyldt med 40 g silicagel, og produktet blev gradvist adskilt til opnåelse af 170 mg rent produkt. Det blev ved elementær analyse og IR-spektrret bekræftet, at produktet var 3-benzoyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-[bis(2-chlorethyl)amino]phenyl}butyryloxy]acetat.

AFPRØVNING 1

Akut toxicitet og antitumorvirkning (in vivo) af chlorambucilderivater fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse

(1) Akut toxicitet (LD₅₀)

Til bestemmelse af LD₅₀ blev der som en gruppe benyttet 8 ICR-JCL hunmus (5 uger gamle) til formering i et transparent polybur, og hver forbindelse blev opløst i olivenolie og indgivet musene i en dosis ved intraperitoneal injektion (i.p.), oral indgift (p.o.) og subcutan injektion (s.c.), og derpå blev LD₅₀-værdien efter 7 dage evalueret ved Litchfield-Wilcoxon's grafiske metode. Resultaterne var som følger:

LD₅₀ for chlorambucil var: 20 mg/kg ved i.p., 80 mg/kg ved p.o. og 26 mg/kg ved s.c.

LD₅₀ for prøve nr. 2 i tabel 1 fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse var: større end 3000 mg/kg ved i.p., større end 6000 mg/kg ved p.o. og større end 3000 mg/kg ved s.c.

(2) Antitumor-prøvning (in vivo)

Stykker af humane brystcancer-celler med steroid hormonreceptor blev subcutant planteret under forbenene på mus [BALB/C-nu,nu, (5 uger gamle)] til dannelse af faste tumorer. Fra 24 efter implanteringen blev olivenoliedispersioner eller -opløsninger af det aktive ingrediens indgivet subcutant eller oralt hver anden dag, ialt 10 gange. 25 dage efter implanteringen blev tumorerne fjernet. Tumor-inhiberingsvirkningen blev bestemt ud fra (A): den gennemsnitlige vægt af udskårne tumorer fra 10 mus (på hvilke det aktive ingrediens var

blevet anvendt) og (B): den gennemsnitlige vægt af udskårne tumorer fra 10 kontrolmus.

$$\% \text{ tumorinhiberingsvirkning} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

Både ved subcutan og oral indgift af chlorambucil i en dosis på 15 mg/kg var inhiberingsvirkningen fra ca. 50 til 70%, medens inhiberingsvirkningen ved indgivelse af chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse var større end 90%. Når chlorambucilderivaterne fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse blev indgivet, overlevede alle musene.

Undersøgelse af autopsier afslørede alvorlige forandringer af milt, uterus og thymus efter indgivelse af chlorambucil, medens der ikke blev konstateret forandringer efter indgivelse af prøver fremstillet ifølge den foreliggende opfindelse.

TABEL 1LD₅₀

Prøve nr.	1	2	3	4
LD ₅₀ (mg/kg) (Oral indgift)	80	6000<	3000<	3000<
LD ₅₀ (mg/kg) (Subcutan indgift)	26	2000<	2000<	2000<

TABEL 2

Antitumorvirkning

Prøve nr.	1	2	3	4	5
<u>Antitumorprøve</u>					
<u>Oral indgift</u>					
<u>Dosis (mg/kg)</u>	10	10	10	10	15
<u>Fraktion overlevende*</u>	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10
<u>% Inhiberingsvirkning</u>	55	92	91	93	97
<u>Subcutan indgift</u>					
<u>Dosis (mg/kg)</u>	5	5	5	5	10
<u>Fraktion overlevende*</u>	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
<u>% Inhiberingsvirkning</u>	53	90	93	92	94

SAMMENLIGNENDE AFPRØVNING AF FORBINDELSER FREMSTIL-
LET IFØLGE OPFINDELSEN OG IFØLGE KENDT TEKNIK.

Stykker på 2 mm x 2 mm af human brystcancer-celler blev implanteret subcutant under forbenet på hver af 8 nøgne mus (BALA/CA-Nu). Fra 24 timer efter implantationen blev den aktive substans i en opløsning af sesamolie indgivet dagligt i en oral dosis i 14 dage. 21 Dage efter den påbegyndte indgivelse blev tumorerne udskåret og vejet. Den hæmmende virkning på tumorvækst blev bestemt ud fra den gennemsnitlige vægt (A) af udskårne tumorer fra 8 mus, som var blevet indgivet den aktive substans, og den gennemsnitlige vægt (B) af tumorer udskåret fra 8 kontrolmus.

$$\text{Tumorhæmmende virkning (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

De opnåede resultater er anført i omstående tabel 1.

Med henblik på at undersøge bivirkninger blev koncentrationen af frit chlorambucil og antallet af hvide blodlegemer i blodet bestemt en time efter den sidste indgivelse.

De til undersøgelsen benyttede forbindelser er anført nedenfor og blev fremstillet ifølge de anførte referencer:

Substans nr 1:

17 α -[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxyacetoxy]pregn-4-ene-3,20-dion

fremstillet ifølge DK patentansøgning nr. 252/77, eksempel 3, forbindelse 2 (USA patent nr. 4.177.269)

Substans nr 2:

17 α -[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxyacetoxy]-6 α -methylpregn-4-ene-3,20-dion

fremstillet ifølge DK patentansøgning nr. 252/77, eksempel 3, forbindelse 16 (USA patent nr. 4.177.269).

Substans nr 3:

17-acetoxy-3-[4-(4-(N,N-bis(2-chlorethyl)amino)phenyl)-butanoyloxy]pregn-3,5-dien-20-on

fremstillet ifølge DK patentansøgning nr. 719/77, eksempel 1, forbindelse 1 (USA patent nr. 4.150.126).

Substans nr 4:

chlorambucil.

Substans nr 5:

3-benzoyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-(bis(2-chlorethyl)amino)-phenyl}butanoyloxy]acetat

fremstillet ifølge nærværende opfindelse.

Substans nr 6:

3-acetoxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-(bis-chlorethyl)amino)-phenyl}butanoyloxy]acetat

fremstillet ifølge nærværende opfindelse.

Substans nr 7:

3-propionyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -[4-{p-(bis-chlorethyl)amino)-phenyl}butanoyloxy]acetat

fremstillet ifølge nærværende opfindelse.

Bemærkning til tabellen:1) CBL:

Koncentrationen af alkaliseringsmiddel i blodet 1 time efter sidste indgivelse 14 dage efter påbegyndelsen af indgivelsen.

2) WBC:

Antallet af hvide blodlegemer i blodet efter sidste indgivelse den 14. dag efter påbegyndelsen af indgivelsen.

3) Terapeutisk index beregnet ud fra følgende data:

LD₅₀ = 50% reduktion af antallet af hvide blodlegemer og

ED₉₀ = 90% inhibering (hæmning) af cancercellerne.

4) IR:

Inhiberingsforhold (hæmningsforhold)

5) Procentvis formindskelse af antallet af hvide blodlegemer.

Det ses af de opnåede resultater i nedenstående tabel 3, at dels er forbindelserne fremstillet ifølge nærværende ansøgning langt mindre toksiske end de kendte forbindelser, jvf. søjle 2 og 3 i tabellen, og dels er den kurative virkning af forbindelserne fremstillet ifølge nærværende ansøgning for samme daglige dosisstørrelse væsentlig bedre end den af de kendte forbindelser. Kombinationen af disse to effekter bevirker, at der med forbindelserne fremstillet ifølge nærværende ansøgning kan opnås en 100% kurativ virkning, hvilket, som det ses, ikke er tilfældet med nogen af de kendte forbindelser.

Tabel 3
Hæmningsvirkning og bivirkninger

Sub- stans	Dosis (mg/kg)	1) CBL ⁻⁹ (x 10 ⁻⁹ g/ml)	2) WBC (cell/mm ³)	Cancer (mm ³)	4) IR (%)	3) Terapeutisk index (WBC LD ₅₀ /ED ₉₀)	Refe- rence
Kon- trol	0,5% Methyl- cellulose- H ₂ O	0	7990	2800	0	0	
1	6,25	360	5) 3920(-51%)	1850	33,9	0,25	DK pat. ans.nr. 252/77
	12,5	600	2900(-64%)	1021	63,5		
	25,0	1020	2010(-75%)	280	90,0		
	100,0	døde	-	-	-		
2	6,25	350	4000(-50%)	1900	32,1	0,25	DK pat. ans.nr. 252/77
	12,5	520	2900(-64%)	810	71,1		
	25,0	1050	2250(-72%)	290	89,7		
	100,0	døde	-	-	-		
3	6,25	380	4000(-50%)	2000	28,6	0,25	DK pat. ans.nr. 719/77
	12,5	630	2300	1100	60,7		
	25,0	1100	2100	275	90,2		
	100,0	døde	-	-	-		
4	0,5	530	4000(-50%)	1460	47,9	0,2	Chlor- ambucil
	2,5	700	2000(-75%)	307	89,0		
	12,5	døde	-	-	-		
5	6,25	1,9	7900(-1%)	500	82,1	32<	Ifølge opfin- delsen
	12,5	5,0	7700(-4%)	290	90,0		
	25,0	9,3	7800(-2%)	0	100,0		
	100,0	53,0	7400(7,4%)	0	100,0		
6	6,25	2,3	7750(3%)	490	82,5	32<	Ifølge opfin- delsen
	12,5	10,1	7760(2,9%)	300	89,3		
	25,0	20,3	7700(3,6%)	0	100,0		
	100,0	101,5	7350(8,0%)	0	100,0		
7	6,25	3,9	7700(3,6%)	510	81,8	32<	Ifølge opfin- delsen
	12,5	12,1	7700(3,6%)	313	88,8		
	25,0	25,9	7650(4,3%)	0	100,0		
	100,0	112,7	7400(7,4%)	0	100,0		

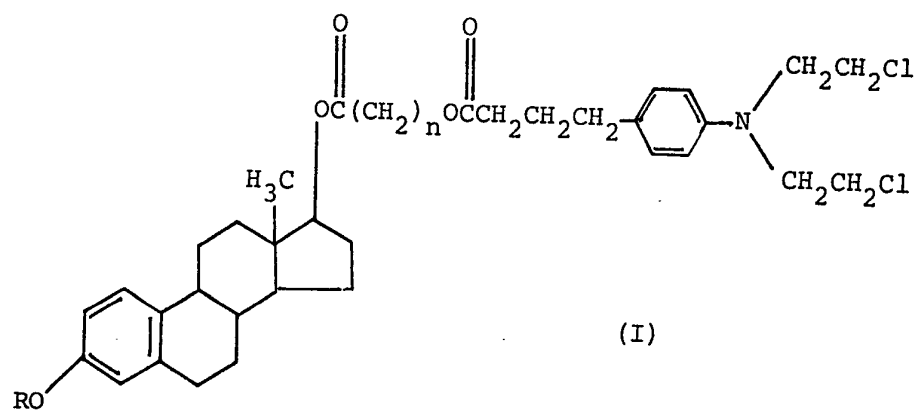
P a t e n t k r a v .

Analogifremgangsmåde til fremstilling af chlorambucilderivater med den almene formel:

5

10

15

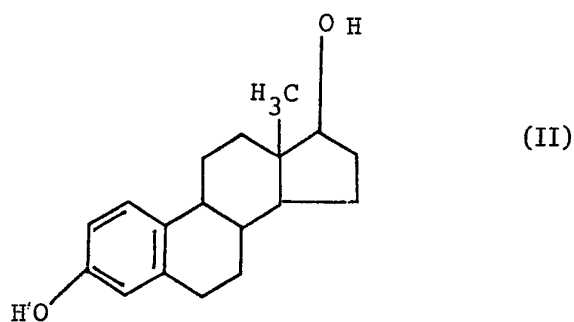


hvor R betegner et hydrogenatom eller en acylgruppe med 1-7 carbon-atomer, og n er 1 eller 2, k e n d e t e g n e t v e d,

1) at hydroxylgruppen i 17-stillingen af østradiol med formelen:

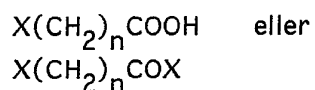
20

25



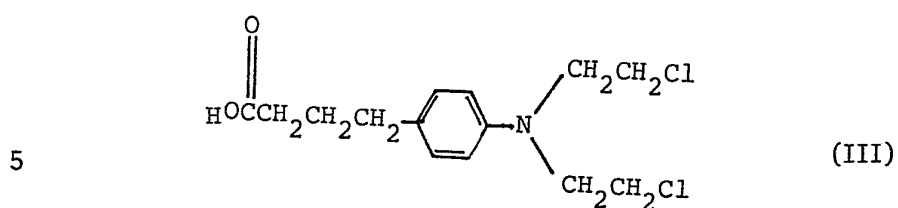
30

omsættes i et opløsningsmiddel med en forbindelse udvalgt fra gruppen af forbindelser, der har formelen:

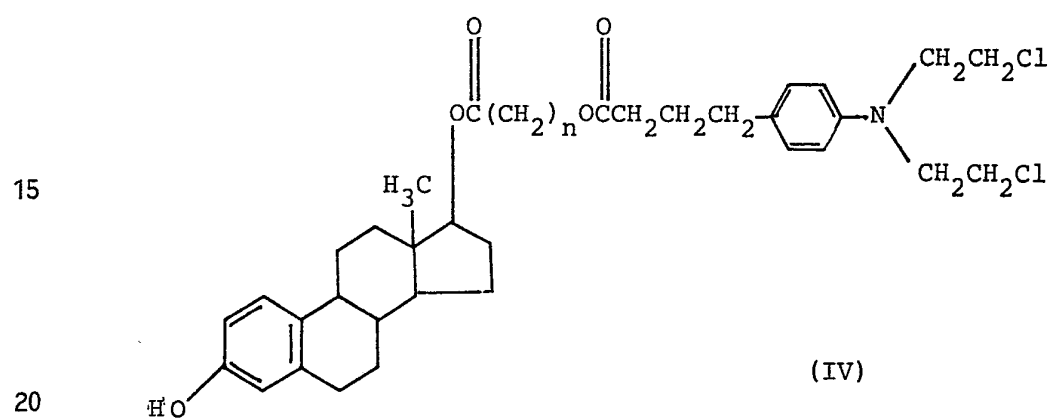


35

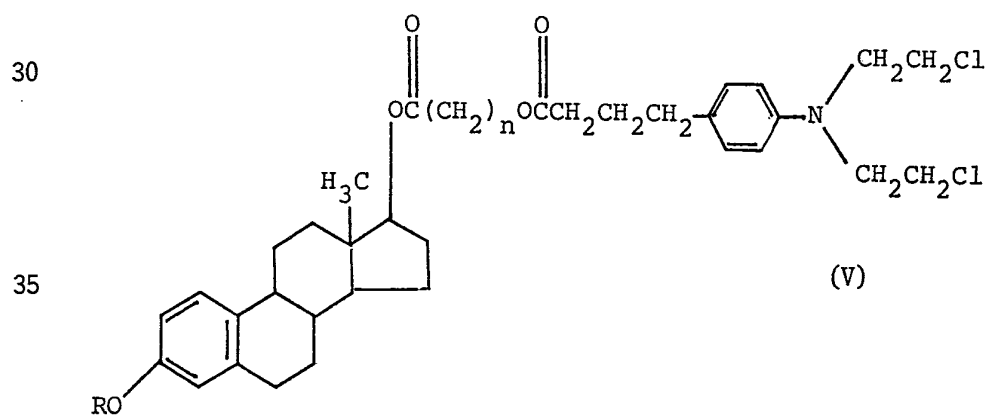
hvor n er 1 eller 2, og X er et halogenatom, hvorefter den herved dannede østradiolforbindelse i et opløsningsmiddel omsættes med carboxylgruppen i chlorambucil med formelen:



10 eller et metalsalt heraf til dannelse af forbindelsen:



25 hvori hydroxylgruppen i 3-stillingen af østradioldelen af forbindelsen (IV) i et opløsningsmiddel derefter evt. acyleres med et syreanhydrid R-O-R eller et syrehalogenid R-X, hvori R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer og X betegner et halogenatom til dannelse af forbindelsen:

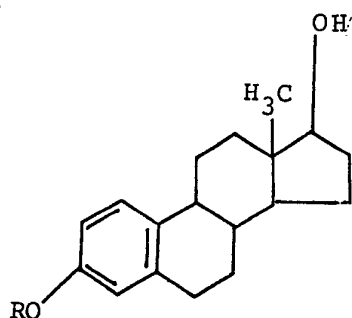


hvor R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer, og at forbindelsen IV eller V isoleres, eller

2) at hydroxylgruppen i 17-stillingen af acyleret østradiol med den almene formel:

5

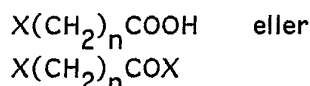
10



(VI)

hvor R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer, i et opløsningsmiddel omsættes med en forbindelse udvalgt fra gruppen af forbindelser, der har formlen:

15

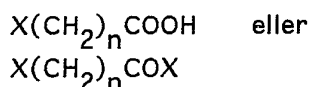


hvor n er 1 eller 2, og X er et halogenatom, hvorefter den herved dannede østradiolforbindelse i et opløsningsmiddel omsættes med carboxylgruppen i chlorambucil med formlen (III) eller et metalsalt heraf til dannelse af forbindelsen (V), hvor R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer, og at forbindelse V isoleres, eller

20

3) at carboxylgruppen i chlorambucil med formlen (III) eller et metalsalt heraf i et opløsningsmiddel omsættes med en forbindelse udvalgt fra gruppen af forbindelser, der har formlen:

25



hvor n er 1 eller 2, og X er et halogenatom, hvorefter den herved dannede halogenforbindelse i et opløsningsmiddel omsættes med hydroxylgruppen i 17-stillingen af:

30

a) østradiol med formlen (II) til dannelse af forbindelsen med formlen (IV), hvor hydroxylgruppen i 3-stillingen af østradioldelen i et opløsningsmiddel derefter evt. acyleres med et syreanhydrid R-O-R eller et syrehalogenid R-X, hvor R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer og X betegner et halogenatom til dannelse af forbindelsen (V), hvor R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer, eller

35

- b) acyleret østradiol med den almene formel (VI), hvori R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer til dannelse af forbindelsen med formlen (V), hvori R betegner en acylgruppe med 1-7 carbonatomer, og at forbindelsen IV eller V dannet ifølge a) eller V dannet ifølge b) isoleres.
- 5

Fremdragne publikationer:

DK ansøgninger nr. 252/77, 719/77.

