



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>: C 07 J 41/00  
A 61 K 31/56

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

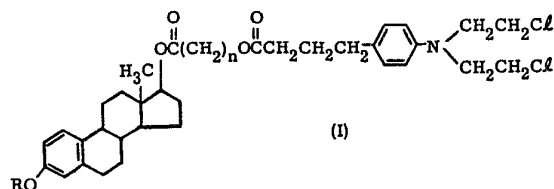
⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪ **641 817**

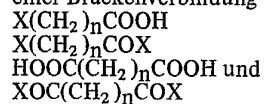
⑲ Gesuchsnummer:	7400/79	⑲ Inhaber:	Kureha Kagaku Kogyo Kabushiki Kaisha, Chuo-ku/Tokyo (JP)
⑳ Anmeldungsdatum:	13.08.1979	⑳ Erfinder:	Asano Kiro, Inashiki-gun/Ibaraki-ken (JP) Tamura Humio, Inashiki-gun/Ibaraki-ken (JP) Tanaka Hiromitsu, Setagaya-ku/Tokyo (JP) Enomoto Satoru, Fujisawa-shi/Kanagawa-ken (JP)
㉑ Priorität(en):	14.08.1978 JP 53-98795 08.12.1978 JP 53-152175	㉑ Patent erteilt:	15.03.1984
㉒ Patent erteilt:	15.03.1984	㉒ Patentschrift veröffentlicht:	15.03.1984
㉓ Patentschrift veröffentlicht:	15.03.1984	㉓ Vertreter:	Walter Fr. Moser Patent Service S.A., Genève

⑤④ **Chlorambucilderivate, Verfahren zur Herstellung derselben und Antitumormittel mit einem Gehalt derselben.**

⑤⑦ Es werden Chlorambucilderivate der folgenden allgemeinen Formel (I) geschaffen



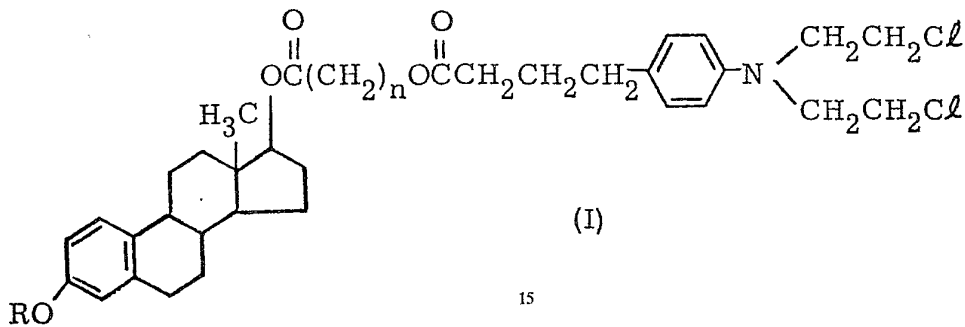
wobei R für ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe und n für 1 oder 2 stehen. Diese Verbindungen haben im Vergleich zu Chlorambucil eine drastisch gesenkte Toxizität und eine wesentlich erhöhte Antitumorwirkung. Sie werden dadurch hergestellt, dass man Chlorambucil an die Hydroxylgruppe in 17-Position von Östradiol oder acyliertem Östradiol bindet, und zwar unter Vermittlung einer Brückenverbindung der folgenden Formeln



wobei n 1 oder 2 und X ein Halogenatom bedeuten.

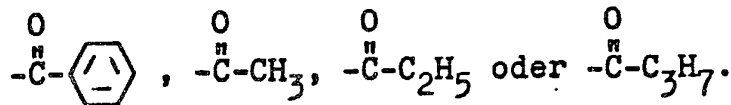
## PATENTANSPRÜCHE

## 1. Chlorambucilderivate der Formel



wobei R ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe und n 1 oder 2 bedeuten.

2. Chlorambucilderivate nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass R für eine der folgenden Gruppen steht

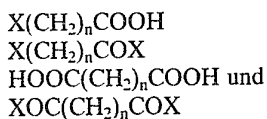


3. 3-Hydroxy- oder 3-Acyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy}]-acetat als Chlorambucilderivate nach Anspruch 1.

4. 3-Benzoyloxy-, 3-Acetoxy- oder 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy}]-acetat als Chlorambucilderivate nach Anspruch 1.

5. Antitumormittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einem Chlorambucilderivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

6. Verfahren zur Herstellung eines Chlorambucilderivats nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Chlorambucil an die Hydroxylgruppe in 17-Position von Östradiol oder acyliertem Östradiol über eine Brückenverbindung der folgenden allgemeinen Formeln bindet



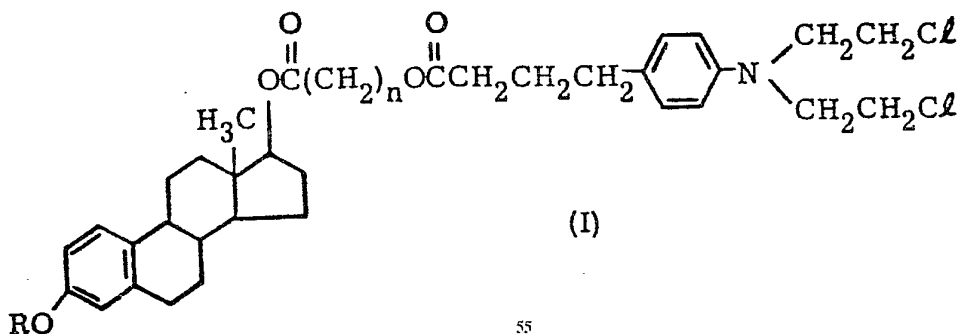
wobei n für 1 oder 2 und X für ein Halogenatom stehen.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Brückenverbindung mit der Hydroxylgruppe in 17-Position des Östradiols oder des acylierten Östradiols in einem Lösungsmittel umsetzt und dann das modifizierte Östradiol oder acylierte Östradiol mit der Carboxylgruppe des Chlorambucils in einem Lösungsmittel umsetzt.

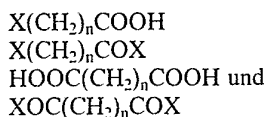
8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Brückenverbindung zunächst mit der Carboxylgruppe des Chlorambucils in einem Lösungsmittel umgesetzt wird, worauf das modifizierte Chlorambucil mit der Hydroxylgruppe in der 17-Position des Östradiols oder des acylierten Östradiols in einem Lösungsmittel umgesetzt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man das Chlorambucil in Form seines Silbersalzes oder Alkalisalzes einsetzt.

10. Verfahren zur Herstellung eines Chlorambucilderivats der Formel



wobei R eine Acylgruppe und n 1 oder 2 bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man Chlorambucil an die Hydroxylgruppe in 17-Position von Östradiol über eine Brückenverbindung der folgenden allgemeinen Formeln bindet



wobei n für 1 oder 2 und X für ein Halogenatom stehen und nachfolgend das erhaltene Chlorambucilderivat mit einem Säure-

reanhydrid oder einem Säurehalogenid in einem Lösungsmittel acyliert.

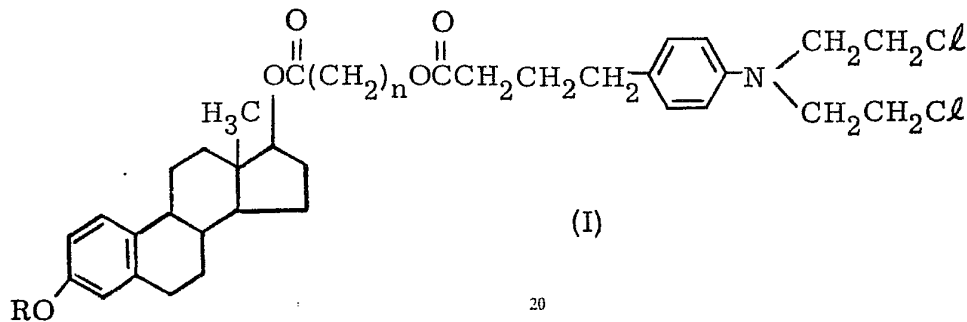
Die Erfindung betrifft neue Derivate der 4-{p-[Bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-buttersäure (Chlorambucil) sowie Antitumormittel mit einem Gehalt derselben und Verfahren zur Herstellung derselben. Insbesondere betrifft die Erfindung Chlorambucilderivate, welche erhalten werden durch chemische Bindung von Chlorambucil an die Hydroxylgruppe in 17-Position des Östradiols oder eines Derivats des Östradiols, und zwar unter

Vermittlung einer Brückenverbindung. Ferner betrifft die Erfindung Antitumormittel mit einem Gehalt dieser Chlorambucilderivate.

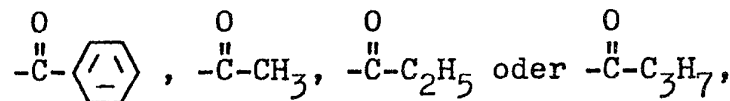
Es ist wohlbekannt, dass die meisten Antitumormittel sowohl Krebszellen als auch normale Zellen angreifen und daher zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen. Es ist daher schwierig, diese Mittel für lange Zeiträume anzuwenden, um die Krebszellen vollständig zu beseitigen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Chlorambucilderivate zu schaffen, welche eine selektive Wirkung gegen Krebszellen zeigen sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Chlorambucilderivate und neue Antitumormittel mit einem Gehalt derselben.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate sind Verbindungen der Formel (I)

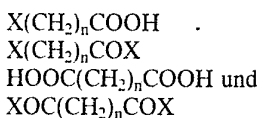


wobei R für Wasserstoff oder eine Acylgruppe, z. B. für



steht und wobei n für 1 oder 2 steht.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate können hergestellt werden durch Binden des Chlorambucils an die Hydroxylgruppe in 17-Position des Östradiols oder eines Derivats desselben, und zwar in Anwesenheit einer Brückenverbindung, welche aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist

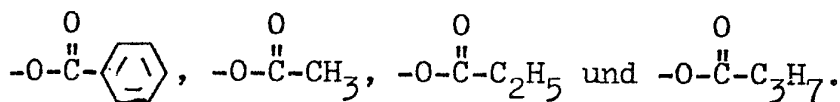


wobei n für 1 oder 2 und X für ein Halogenatom stehen.

Bei den erfindungsgemässen Chlorambucilderivaten handelt es sich um Konjugate des Chlorambucils und des Östradiols oder eines Östradiolderivats mit einer Brückenverbindung. Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate zeigen eine spezielle Affinität zu Krebszellen, und sie führen daher zu einem selektiven Angriff auf diese Krebszellen. Die spezifischen Krebszellen, welche durch die erfindungsgemässen Wirkstoffe angegriffen

werden, enthalten Rezeptoren für die Steroidhormone und insbesondere für die Teil der erfindungsgemässen Chlorambucilderivate bildenden Östradiolderivate. Diese Rezeptoren sind die Zielrezeptoren der erfindungsgemässen Chlorambucilderivate. Daher greifen die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate nur diejenigen Krebszellen an, welche Rezeptoren für Östradiol oder seine Derivate aufweisen. Derartige Krebszellen finden sich insbesondere bei Brustkrebs, Prostatakarzinomen, Hepatomen, Kropf und Endometritiskarzinom. Insbesondere sind die erfindungsgemässen Produkte wirksam bei Brustkrebs, Endometritiskarzinom und Prostatakarzinom. Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate greifen selektiv diese Krebszellen im Organismus an, ohne dass Nebeneffekte auftreten. Es ist ein besonderes Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass Östradiol oder ein Derivat desselben mit Chlorambucil verbunden wird, ohne dass die aktiven Positionen des Östradiols oder des Östradiolderivats dabei verlorengehen und ohne dass die aktiven Antitumorpositionen des Chlorambucils verlorengehen.

Es ist bevorzugt, die OH-Gruppe in 3-Position des Östradiols in eine Acyloxygruppe umzuwandeln, z. B. in eine Gruppe der folgenden Formeln

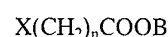


Die Acyloxygruppe wird in einem Organismus leicht in eine OH-Gruppe umgewandelt, so dass eine Bindung an die Rezeptoren in den Zellen möglich ist.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate können hergestellt werden durch Binden von Chlorambucil an die Hydroxylgruppe in 17-Position von Östradiol oder einem Derivat desselben, und zwar unter Vermittlung einer Brückenverbindung. Diese Brückenverbindung sollte keine Toxizität verursachen. Optimale Brückenverbindungen für die Bindung des Östradiols oder der Derivate desselben an Chlorambucil sind Monobromacetyl bromid, Monochloracetylchlorid, Monochloressigsäure, Monobromessigsäure oder dgl. Das Chlorambucil kann unter Vermittlung der Brückenverbindungen nach verschiedenen Ver-

fahren an das Östradiol oder das Östradiolderivat gebunden werden. Zum Beispiel kann man die Brückenverbindung zunächst mit dem Östradiol oder dem acylierten Östradiol umsetzen, worauf man das modifizierte Östradiol oder acylierte Östradiol mit Chlorambucil umsetzt. Bei einem anderen Verfahren wird die Brückenverbindung zunächst mit Chlorambucil umgesetzt, worauf man das modifizierte Chlorambucil mit Östradiol oder einem acylierten Östradiol umsetzt.

Bei dem ersten Verfahren reagiert die Brückenverbindung mit der nicht-aktiven Position des Östradiols oder des acylierten Östradiols, und man erhält einen Ester der Formel

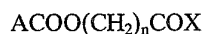


wobei B den Rest des Östradiols oder des acylierten Östradiols bedeutet, bei dem die OH-Gruppe in 17-Position fehlt, und wobei X ein Halogenatom bedeutet. Sodann reagiert das Halogenatom des Esters mit dem Chlorambucil unter Erzeugung des erfindungsgemässen Chlorambucilderivats.

Die Brückenverbindung, z. B. Monobromacetyl bromid, reagiert mit der OH-Gruppe in 17-Position des Östradiols oder des acylierten Östradiols mit einer Acylgruppe in 3-Position, und zwar in einem Lösungsmittel, wie Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform, Tetrahydrofuran, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Pyridin und Aceton. Das Reaktionsprodukt wird ferner mit Chlorambucil in einem Lösungsmittel, wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid, Pyridin, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform oder Tetrahydrofuran (THF), umgesetzt. Chlorambucil kann in Form der freien Säure oder des Metallsalzes, z. B. des Silbersalzes oder Alkalisalzes, eingesetzt werden.

Die Reaktionstemperatur liegt bei jeder der Reaktionen gewöhnlich im Bereich von  $-30$  bis  $100^{\circ}\text{C}$  und vorzugsweise im Bereich von  $-10$  bis  $80^{\circ}\text{C}$ . Die Reaktionszeit liegt jeweils im Bereich von 0,5 bis 74 h. Das Reaktionsprodukt wird durch geeignete Reinigungsverfahren gereinigt. Dabei erhält man das reine Chlorambucilderivat gemäss vorliegender Erfindung.

Bei dem letzteren Verfahren reagiert die Brückenverbindung zunächst mit der Carboxylgruppe des Chlorambucils unter Bildung einer Verbindung der allgemeinen Formel



wobei A einen Rest des Chlorambucils bedeutet, bei dem die COOH-Gruppe in 1-Position fehlt. Sodann reagiert das Halogenatom (X) dieser Verbindung mit der OH-Gruppe in 17-Position des Östradiols oder des acylierten Östradiols mit einer Acylgruppe in 3-Position unter Bildung des erfindungsgemässen Chlorambucilderivats.

Dabei können die gleichen Lösungsmittel eingesetzt werden, wie bei dem ersteren Verfahren; auch die Reaktionstemperatur und die Reaktionszeit werden wie bei der ersteren Verfahrensvariante gewählt.

Die OH-Gruppe in 3-Position der Östradiolkomponente des erfindungsgemässen Chlorambucilderivats kann acyliert werden, und zwar vor oder nach dem Binden des Chlorambucils an das Östradiol unter Vermittlung der Brückenverbindung. Es ist jedoch bevorzugt, das Östradiol vor der Konjugierung zu acylieren.

Im folgenden soll die Acylierung näher erläutert werden. Die OH-Gruppe in 3-Position des Östradiols reagiert mit Alkalimetallhydroxid in einem Lösungsmittel, wie THF, unter Bildung einer NaO-Gruppe oder KO-Gruppe, worauf das Reaktionsprodukt nachfolgend mit einem Acylchlorid, wie Benzoylchlorid, Acetylchlorid oder Propionylchlorid, umgesetzt wird. Dabei erhält man das acylierte Östradiol. Sodann wird die Brückenverbindung, z. B. Monobromacetyl bromid, mit der OH-Gruppe in 17-Position des acylierten Östradiols umgesetzt, und zwar in einem Lösungsmittel, wie DMSO, DMF, Pyridin, Aceton oder THF. Sodann wird das modifizierte acylierte Östradiol mit Chlorambucil in einem Lösungsmittel, wie DMSO, DMF, Pyridin, Toluol, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform oder THF, umgesetzt. Die Temperatur liegt bei jeder Reaktion gewöhnlich im Bereich von  $-30$  bis  $100^{\circ}\text{C}$  und vorzugsweise im Bereich von  $-10$  bis  $80^{\circ}\text{C}$ . Die Reaktionszeit liegt gewöhnlich im Bereich von 0,5 bis 74 h. Das Reaktionsprodukt wird durch geeignete Reinigungsverfahren gereinigt, wobei man die erfindungsgemässen reinen Chlorambucilderivate erhält.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate haben die Formel (I), d. h. es handelt sich um Konjugate von Chlorambucil und Östradiol oder acyliertem Östradiol. Diese Tatsache wurde durch umfangreiche, der Strukturaufklärung dienende Untersu-

chungen belegt, insbesondere durch das IR-Spektrum, das UV-Spektrum, NMR, TLC, das Massenspektrum, die Elementaranalyse und den Schmelzpunkt.

Die erfindungsgemässen Verbindungen wurden auf ihre akute Toxizität untersucht sowie auf die Einführung der Verbindungen in für Östrogen empfindliche Zellen und auf den Antitumoreffekt. Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate haben eine äusserst geringe Toxizität. Ferner zeigen sie einen hohen Antitumoreffekt und darüber hinaus sind die Verbindungen in hohem Masse befähigt, an für Östrogen empfindliche Zellen gebunden zu werden.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate sind insbesondere wirksam zum Angriff von Krebsgeweben und -zellen mit einer Östradiolempfindlichkeit. Sie eignen sich daher insbesondere für Brustkrebs, Prostatakarzinome, Hepatome, Kropf- und Endometritiskarzinome. Ferner sind die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate wirksam bei Magenkrebs, Krebs des Rektums, Kehlkopfkrebs, Speiseröhrenkrebs, Lungenkrebs, Hautkrebs und Leukosarkomen, und sie zeigen eine äusserst geringe Toxizität im Vergleich zu herkömmlichen Antikrebsmitteln oder Antitumormitteln, z. B. im Vergleich zu Chlorambucil. Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate zeigen nicht die spezifischen Sexualfunktionen des Östradiols, obgleich sie Östradiolderivate sind. Der Grund für dieses Verhalten ist noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass diesen Effekten ein unbekannter Mechanismus zugrundeliegt neben der üblichen Rezeptorwirkung.

Wenn die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate als therapeutische Mittel verwendet werden, so können verabreichbare Medikamente nach herkömmlichen Verfahren hergestellt werden, wie bei den bekannten Antitumormitteln.

Es können mit den erfindungsgemässen Chlorambucilderivaten als Wirkstoff beliebige Arzneimittel hergestellt werden, und zwar für Injektionszwecke, für orale Verabreichungen, in Form von Suppositorien oder Pasten. Bei Herstellung von Arzneimitteln in fester Form für orale Verabreichung kann man Tabletten, Pillen, Granulate, Pulver oder Kapseln herstellen. Hierzu verwendet man Bindemittel, Verdünnungsmittel, Füllstoffe, Gleitmittel, Öle, oberflächenaktive Mittel, Sprengmittel oder dgl. Bei Herstellung von flüssigen Mitteln für orale Verabreichung kann man wässrige Suspensionen, ölige Suspensionen, Lösungen, Sirup oder Schüttelmischungen verwenden. Bei Herstellung von Suppositorien verwendet man eine hydrophobe oder hydrophile Grundlage sowie Stabilisatoren, Sprengmittel oder Färbemittel. Bei Herstellung von Injektionsflüssigkeiten kann man insbesondere wässrige Lösungen herstellen und Lösungsvermittler, Nährstoffe, Stabilisatoren oder oberflächenaktive Mittel zusetzen. Zur Erhaltung oder Verbesserung des medizinischen Effekts kann man, falls erwünscht, eine Base, eine Säure oder ein Salz einsetzen. Die Menge des Wirkstoffs in dem Arzneimittel liegt im allgemeinen im Bereich von 0,001 bis 90 Gew.-% und vorzugsweise im Bereich von 0,01 bis 60 Gew.-%.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate können oral verabreicht werden oder durch perkutane Adsorption oder intramuskuläre Injektion, intraperitoneale Injektion, subkutane Injektion, intravenöse Injektion, intrarektale Injektion oder durch lokale Verabreichung.

Die Dosis des erfindungsgemässen Chlorambucilderivats liegt im Bereich von etwa 0,01 bis 50 mg/kg/Tag/erwachsener Patient bei oraler Verabreichung und im Bereich von etwa 0,001 bis 20 mg/kg/Tag/erwachsener Patient bei intravenöser Verabreichung.

Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate haben die folgenden charakteristischen Eigenschaften:

(1) Wenn Krebs in einem Gewebe mit Rezeptoren für den erfindungsgemässen Wirkstoff vorhanden ist, so greift das Produkt selektiv die Krebszellen des Gewebes an und zerstört diese Krebszellen. Daher ist das erfindungsgemässe Mittel in äusserst geringen Dosen wirksam.

(2) Das Produkt zeigt nur geringe Nebenwirkungen im Vergleich zu einer Verabreichung von Chlorambucil. Daher kann der Wirkstoff während langer Zeit verabreicht werden, und die Krebszellen können vollständig zerstört werden.

(3) Das im erfindungsgemässen Chlorambucilderivat als Träger verwendete Östradiol oder acylierte Östradiol hat eine definierte Struktur und seine physiologische Aktivität ist bekannt. Daher kann dieses Produkt verabreicht werden, ohne zu Befürchtungen Anlass zu geben.

(4) Die Struktur und Wirksamkeit der Antitumorkomponente, nämlich des Chlorambucilderivats, sind bereits bekannt, und daher kann das Produkt auch unter diesem Gesichtspunkt gefahrlos verabreicht werden.

(5) Man kann jeweils die Rezeptoren der Krebszellen untersuchen und das entsprechende Steroidhormon oder das Derivat desselben als Trägerkomponente für das Chlorambucilderivat auswählen. Man kann das therapeutische Mittel für verschiedene Krebsarten unter Auswahl der jeweiligen Trägerkomponente festlegen.

(6) Das Chlorambucilderivat kann in herkömmlicher Form verabreicht werden, z. B. oral, durch Injektion oder in Form von Suppositorien.

Das erfindungsgemässe Chlorambucilderivat trägt somit in hohem Masse zur Entwicklung der Humanmedizin bei. Die erfindungsgemässen Chlorambucilderivate eignen sich aber auch als Stabilisatoren für Hochpolymere, insbesondere für Polyolefine.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

#### Beispiel 1

Herstellung von 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat

(I) Herstellung von 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat

10 g 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 $\beta$ -diol werden in 400 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) aufgelöst und 8,8 g Pyridin werden zugegeben. Eine Lösung von 22,5 g Monobromacetyl-bromid in 74 g Tetrachlorkohlenstoff wird tropfenweise zu der erhaltenen Lösung bei etwa  $-5$  bis  $-7^{\circ}\text{C}$  gegeben. Die Mischung wird über Nacht stehengelassen. Nach der Umsetzung wird der gebildete Niederschlag abfiltriert, und das Lösungsmittel wird vom Filtrat abdestilliert. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und aus Äther umkristallisiert, wobei man 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 $\beta$ -bis-(monobromacetat) erhält. 2 g des Produktes werden in 900 ml Methanol aufgelöst und die Lösung wird auf  $-5^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Eine Lösung von 0,24 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  in 20 ml Wasser wird tropfenweise zu der erhaltenen Lösung gegeben und die Umsetzung wird während 30 min durchgeführt, worauf 1000 ml Wasser hinzugegeben werden und der gebildete Niederschlag abgetrennt und getrocknet wird. Bei dem Produkt handelt es sich um 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östradien-17 $\beta$ -monobromacetat (Elementaranalyse und IR-Spektrum).

(II) Herstellung von 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat (Chlorambucil-Östradiol-Konjugat)

200 mg Silber-[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryl]] (Silbersalz des Chlorambucils) werden zu 10 ml DMSO gegeben, wobei eine weisse, kolloidale Lösung erhalten wird. Sodann gibt man 190,8 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat hinzu, und die Mischung wird bei Zimmertemperatur während 64 h im Dunkeln gerührt. Der Niederschlag nimmt eine gelblich-grüne Färbung an. Eine kleine Menge Aceton wird hinzugegeben und sodann wird der Niederschlag durch ein G-4-Filter abfiltriert. Der Niederschlag nimmt sodann eine gelblich-grüne bis schwärzlich-grüne Färbung an, und zwar aufgrund der Bestrahlung mit Licht. Das Filtrat ist farblos und

transparent. DMSO wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad bei  $80^{\circ}\text{C}$  abdestilliert und 100 ml Wasser werden zu dem Rückstand gegeben, wobei weisse Kristalle ausgefällt werden. Die Kristalle werden während 1 h stehengelassen, um DMSO zu entfernen und durch ein G-4-Filter abfiltriert und sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck in einem Exsikkator getrocknet. Die Rohausbeute beträgt 330,5 mg.

#### (a) Reinigung des Produktes

330,5 mg der rohen Kristalle werden in einer Mischung von 50 Vol.-Teilen Cyclohexan und 10 Vol.-Teilen Äthylacetat aufgelöst. Man lässt die Lösung langsam durch eine Säule mit 40 g Silikagel laufen, wobei das Produkt allmählich abgetrennt wird. Man erhält 188,2 mg (Ausbeute 62,86 %) des reinen Produktes. Im folgenden seien die Werte der Elementaranalyse, der Schmelzpunkt und die Werte des IR-Spektrums angegeben:

Elementaranalyse:

ber.: C 66,2 % H 6,98 % N 2,27 % Cl 11,52 %

gef.: C 66,0 % H 7,0 % N 2,3 % Cl 11,0 %

Schmelzpunkt: halbgeschmolzen bei  $25^{\circ}\text{C}$

IR-Spektrum ( $\text{cm}^{-1}$ ):

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.

#### Beispiel 2

Herstellung von 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat

10 g 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 $\beta$ -diol werden in 100 ml THF aufgelöst und 10 ml einer wässrigen Lösung von 1,47 g NaOH werden zugegeben. Die Mischung wird 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Sodann wird das Reaktionsgemisch unter einem verminderten Druck auf einem Wasserbad von  $80^{\circ}\text{C}$  eingeengt, um das Wasser zu entfernen. Der Rückstand wird in wasserfreiem THF aufgelöst und 50 ml Äthylätherlösung von 5,5 g Benzoylchlorid werden tropfenweise zu der erhaltenen Lösung gegeben und die Umsetzung wird bei Zimmertemperatur während 16 h durchgeführt. Nach der Umsetzung wird das erhaltene Natriumchlorid auf übliche Weise abgetrennt und das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Zur Entfernung des nichtumgesetzten Benzoylchlorids werden 200 ml 0,1n NaOH (wässrige Lösung) zugesetzt und die Mischung wird 15 min bei Zimmertemperatur gerührt. Die erhaltenen, weissen Kristalle werden mit einem G-3-Filter abfiltriert und sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck in einem Exsikkator getrocknet. Das Produkt wird dünnschichtchromatographisch analysiert, wobei Silikagel verwendet wird und wobei als Entwicklerlösungsmittel ein Gemisch von Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 50:30 verwendet wird. Man erhält einen Hauptfleck mit einem  $R_F$  Wert von 0,34. Die Rohkristalle werden aus Äthylacetat umkristallisiert, wobei man 8,6 g weisse Kristalle erhält. Es wurde durch Schmelzpunktbestimmung, Elementaranalyse und IR-Spektrum bestätigt, dass es sich bei dem Produkt um 17 $\beta$ -Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-3-benzoat handelt.

Das erhaltene Produkt (7,0 g) wird in THF aufgelöst und 2,0 g Pyridin werden zugesetzt und die Mischung wird auf  $-5^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Eine Lösung aus 15,5 g 30 % Monobromacetyl-bromid/Tetrachlorkohlenstoff in 50 ml THF wird allmählich tropfenweise zu der erhaltenen Mischung gegeben. Danach wird die Mischung 2 h bei  $-5^{\circ}\text{C}$  gerührt und sodann 4 h im Eisbad gerührt und sodann 16 h im Kühlschrank stehengelassen. Nach der Umsetzung wird der erhaltene, weisse Niederschlag durch ein G-4-Filter abfiltriert und unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von  $30^{\circ}\text{C}$  getrocknet. 200 ml Äthyläther werden hinzugegeben und die Mischung wird gerührt, wobei man 5,3 g weisse Kristalle erhält. Die Ergebnisse der Elementaranalyse

und der Schmelzpunktbestimmung sind im folgenden angegeben.

Elementaranalyse:

gef.: C 64,3 % H 5,8 % Br 15,7 %

ber.: C 64,23 % H 5,78 % Br 15,8 %

Schmelzpunkt: 145 bis 146°C

Das Produkt wird dünnstichtchromatographisch untersucht, wobei man Silikagel verwendet und wobei man als Entwicklerlösungsmittel ein Gemisch von Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 50:30 einsetzt. Man erhält einen einzigen Fleck mit einem  $R_f$ -Wert von 0,77. Im IR-Spektrum finden sich keine Absorptionen aufgrund der OH-Gruppe. Dies zeigt, dass es sich ausschliesslich um das 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat handelt.

IR-Spektrum ( $\text{cm}^{-1}$ )

2920, 1735, 1728, 1595, 1579, 1490, 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)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat und 148,5 mg Silber-4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyrat werden in 5 ml DMSO gegeben und die Reaktion wird bei Zimmertemperatur während 3 Tagen im Dunkeln durchgeführt. Nach der Umsetzung wird das ausgefällte Silberbromid abfiltriert und 400 ml Wasser werden zu dem Filtrat gegeben. Die ausgeschiedenen weissen Kristalle werden abzentrifugiert. Der Niederschlag wird danach in 50 ml Aceton aufgelöst und das unlösliche Material wird durch Filtrieren über einen G-4-Filter abgetrennt. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingengt, wobei man 165 mg eines öligen Produktes erhält. Dieses wird dünnstichtchromatographisch an Silikagel analysiert, wobei man ein Gemisch von Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 10:50 als Entwicklerlösungsmittel verwendet. Man erhält einen Hauptfleck mit einem  $R_f$ -Wert von 0,44.

Da noch nichtumgesetztes Material zugegen ist, wird das Reaktionsprodukt an Silikagel chromatographiert, wobei man ein Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 10:50 einsetzt. Man erhält ein gereinigtes Produkt, welches bei 20°C in Form weisser Kristalle vorliegt. Die Ergebnisse der Elementaranalyse und des IR-Spektrums des Produktes sind im folgenden angegeben. Es handelt sich um 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat.

Elementaranalyse:

gef.: C 68,5 % H 6,60 % N 1,99 % Cl 9,79 %

ber.: C 68,33 % H 6,53 % N 1,94 % Cl 9,86 %

Schmelzpunkt: 110 bis 111°C

IR-Spektrum ( $\text{cm}^{-1}$ )

1920, 2860, 1755, 1735, 1612, 1582, 1516, 1491, 1450, 1420, 1380, 1355, 1260, 1224, 1210, 1174, 915, 1145, 1079, 1022, 1005, 960, 890, 800, 740, 705.

### Beispiel 3

Herstellung von 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat

10 g 1,3,5(10)-Östratrien-3,17 $\beta$ -diol werden in 100 ml THF aufgelöst und 10 ml einer wässrigen Lösung von 1,47 g NaOH in 10 ml Wasser werden zugesetzt und das Gemisch wird 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Das Reaktionsprodukt wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 80°C zur Entfernung des Wassers bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in wasserfreiem THF aufgenommen und eine Lösung von 3,40 g Propionylchlorid in 50 ml wasserfreiem THF wird tropfenweise hinzugegeben und die Umsetzung wird bei Zimmertemperatur während 16 h durchgeführt. Nach der Umsetzung wird der Natriumchloridniederschlag abgetrennt und das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert, wobei man 9 g weisse

Kristalle erhält. Bei dem Produkt handelt es sich ausweislich der Elementaranalyse und des IR-Spektrums um 17 $\beta$ -Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-3-propionat.

7,0 g des Produktes werden in 70 ml wasserfreiem THF aufgelöst und 3,0 g Pyridin werden zugesetzt und die Mischung wird auf -5°C abgekühlt. Eine Lösung von 17,3 g 30% Monobromacetyl bromid/Tetrachlorkohlenstoff in 50 ml THF wird tropfenweise zu dem erhaltenen Gemisch gegeben. Nach der Zugabe wird die Mischung 2 h bei -5°C stehengelassen und sodann während 16 h im Kühlschrank. Nach der Umsetzung wird der erhaltene Niederschlag abfiltriert und das Filtrat wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 30°C zur Trockene eingedampft. Sodann gibt man 200 ml Äthyläther hinzu und die Mischung wird gerührt, wobei man 6,0 g weisse Kristalle erhält. Das Filtrat wird weiter eingengt, wobei man 3,5 g weisse Kristalle erhält. Die Kristalle werden aus einem gemischten Lösungsmittel von Äther und Äthanol umkristallisiert. Die Elementaranalyse liefert die folgenden Ergebnisse.

Elementaranalyse:

gef.: C 61,5 % H 6,5 % Br 17,9 %

ber.: C 61,43 % H 6,45 % Br 17,78 %

Das IR-Spektrum zeigt, dass keine OH-Gruppen mehr vorliegen. Somit handelt es sich um 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat.

1,0 g des Produktes und 0,91 g Silber-4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyrat werden in 50 mg DMSO dispergiert und aufgelöst und die Umsetzung wird bei Zimmertemperatur während 3 Tagen im Dunkeln durchgeführt. Nach der Reaktion wird der Niederschlag von Silberbromid abfiltriert und 4 l Wasser werden zugesetzt. Der Niederschlag wird sodann abzentrifugiert und in 50 ml Aceton aufgelöst, worauf die unlöslichen Bestandteile durch Filtrieren über ein G-4-Filter abgetrennt werden. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, wobei man 1,3 g eines öligen Produktes erhält. Das Produkt wird an Silikagel chromatographiert, und zwar mit einem Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan in einem Volumenverhältnis von 10:50. Das gereinigte Produkt liegt bei 20°C in Form eines viskosen Öls vor. Im folgenden seien die Ergebnisse der Elementaranalyse und des IR-Spektrums angegeben.

Elementaranalyse:

gef.: C 67,1 % H 7,0 % N 2,1 % Cl 11,0 %

ber.: C 66,0 % H 6,99 % N 2,08 % Cl 10,56 %

IR-Spektrum ( $\text{cm}^{-1}$ )

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

Die Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei dem Produkt um 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat handelt.

### Beispiel 4

Herstellung von 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -[[4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat

1,0 g 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17 $\beta$ -monobromacetat, erhalten gemäss Beispiel 2, und 0,9 g Silber-4- $\{p$ -[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyrat werden zu 50 ml DMSO gegeben, und die Reaktion wird während 3 Tagen im Dunkeln bei 25°C durchgeführt. Nach der Umsetzung wird der Silberbromidniederschlag abgetrennt und 4 l Wasser werden zu dem Filtrat gegeben. Der erhaltene weisse Niederschlag wird abzentrifugiert und in 50 ml Aceton aufgenommen. Das unlösliche Material wird mit einem G-4-Filter abgetrennt und das Filtrat wird unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, wobei man 1,2 g eines öligen Produktes erhält. Dieses wird an Silikagel chromatographiert, wobei man ein Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan in einem Volumenverhältnis von 10:50 verwendet. Es handelt sich bei dem gereinigten Produkt

um ein bei 20°C viskoses, öliges Material.

Elementaranalyse:

gef.: C 66,0 % H 6,9 % N 2,0 % Cl 10,9 %  
ber.: C 65,64 % H 6,84 % N 2,13 % Cl 10,79 %

Im IR-Spektrum zeigt sich keine Absorptionsbande, welche auf die OH-Gruppe zurückgeführt werden könnte. Dies bestätigt, dass es sich bei dem Produkt um 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat handelt.

IR-Spektrum (cm<sup>-1</sup>)

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

#### Beispiel 5

1 g 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-monobromacetat und 0,8 g Natrium-4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyrat werden in 50 ml THF gegeben und 24 h bei 60°C umgesetzt. Nach der Reaktion wird der Niederschlag abfiltriert und das Filtrat wird eingedampft und getrocknet. Das Produkt wird abgetrennt und an einer Silikagelsäule gereinigt, wobei man ein Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan verwendet. Man erhält 0,9 g 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat.

#### Beispiel 6

Herstellung von 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat

200 mg Silber-4-}p-(2-chloräthyl)-amino}-phenyl}-butyrat (Silbersalz von Chlorambucil) werden in 10 ml DMSO unter Bildung einer weissen, kolloidalen Lösung zugegeben. Dann gibt man 190,8 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-monobromacetat zu dieser kolloidalen Lösung und die Mischung wird 64 h bei Zimmertemperatur im Dunkeln gerührt. Nach 64 h nimmt der Niederschlag eine gelblich-grüne Färbung an. Eine geringe Menge Aceton wird zu dem Niederschlag gegeben und dieser wird durch Filtrieren über ein G-4-Filter abgetrennt. Das Filtrat ist farblos und transparent. DMSO wird auf einem Wasserband bei 80°C abdestilliert. Dann gibt man 100 ml Wasser hinzu, wobei weisse Kristalle ausgeschieden werden. Die Mischung wird 1 h stehengelassen. Dann wird DMSO abdestilliert. Die weissen Kristalle werden durch Filtrieren über ein G-4-Filter abgetrennt, mit destilliertem Wasser gewaschen und unter vermindertem Druck in einem Exsikkator getrocknet. Die Rohausbeute beträgt 330,5 mg.

330,5 mg des Rohproduktes werden in einer Lösungsmittelmischung aus Cyclohexan und Äthylacetat in einem Volumenverhältnis von 50:10 aufgelöst. Man lässt diese Lösung langsam über eine mit 40 g Silikagel gefüllte Säule laufen, wobei das Produkt allmählich abgetrennt wird. Man erhält 188,2 mg (Ausbeute 62,86 %) eines reinen Produktes. Die Ergebnisse der Elementaranalyse und der Schmelzpunktbestimmung sind im folgenden zusammengestellt:

Elementaranalyse:

gef.: C 66,0 % H 7,0 % N 2,3 % Cl 11,0 %  
ber.: C 66,22 % H 6,98 % N 2,27 % Cl 11,52 %

Schmelzpunkt: bei 25°C halbgeschmolzen.

Bei dem Produkt handelt es sich um 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat.

50 mg dieses Produktes werden in 1 ml wasserfreiem Pyridin aufgenommen und 1 ml Essigsäureanhydrid wird zugegeben und die Umsetzung findet während 16 h in einem Kühlschranks statt. Nach der Reaktion wird das Reaktionsgemisch eingeeengt und unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 30°C getrocknet. Der Rückstand wird mit destilliertem Wasser vermischt und die Mischung wird während 1 h stehengelassen, wobei ein öliges Produkt in Form eines weissen, kolloidalen Schaums

abgetrennt wird. Pyridin und Essigsäure werden mit dem destillierten Wasser entfernt und das Produkt wird mit Wasser gewaschen, bis es neutral reagiert. Das ölige Produkt wird von der wässrigen Lösung abgetrennt und eingeeengt und im Exsikkator unter vermindertem Druck getrocknet. Man erhält 45 mg eines öligen Produktes.

Dieses Produkt wird durch Dünnschichtchromatographie an Silikagel analysiert, wobei man ein Gemisch des Entwicklerlösungsmittels aus Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 30:50 verwendet. Man erhält nur einen einzigen Fleck bei einem R<sub>F</sub>-Wert von 0,178.

Das Produkt wird sodann an Silikagel chromatographiert, wobei man ein Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 10:50 verwendet. Bei dem gereinigten Produkt handelt es sich um bei 20°C viskoses, öliges Produkt. Die Ergebnisse der Elementaranalyse sind im folgenden angegeben.

Elementaranalyse:

gef.: C 66,0 % H 6,5 % N 2,0 % Cl 10,9 %  
ber.: C 65,64 % H 6,84 % N 2,13 % Cl 10,79 %

Im IR-Spektrum zeigt sich keine Absorption, welche auf eine OH-Gruppe zurückgeführt werden könnte. Dies zeigt, dass es sich bei dem Produkt um 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat handelt.

IR-Spektrum (cm<sup>-1</sup>)

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

#### Beispiel 7

Herstellung von 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat

50 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat werden in 1 ml wasserfreiem Pyridin aufgelöst und 1,5 ml Propionsäureanhydrid werden zugegeben und die Mischung wird einen Tag in einem Kühlschranks stehengelassen. Das Reaktionsgemisch wird unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 30°C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit destilliertem Wasser vermischt und die Mischung wird 2 h stehengelassen, wobei ein kolloidales, öliges Produkt gebildet wird. Pyridin und Propionsäure werden mit destilliertem Wasser entfernt und das Produkt wird mit Wasser gewaschen, bis es neutral ist. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die ölige Phase wird unter vermindertem Druck in einem Exsikkator getrocknet, wobei man 40 mg eines öligen Produktes erhält. Das Produkt wird an Silikagel chromatographiert, wobei man ein gemischtes Lösungsmittel aus Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 10:50 verwendet. Das gereinigte Produkt liegt als viskose ölige Substanz vor. Im IR-Spektrum wird bei 3600–3200 cm<sup>-1</sup> keine Absorption festgestellt. Man erkennt daran, dass es sich um 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat handelt.

#### Beispiel 8

Herstellung von 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat

50 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat werden in 1 ml wasserfreiem Pyridin aufgelöst und 2 g Benzoessäureanhydrid werden hinzugegeben und die Mischung wird einen Tag im Kühlschranks stehengelassen. Die Reaktionsmischung wird sodann unter vermindertem Druck auf einem Wasserbad von 30°C zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird mit destilliertem Wasser vermischt und die Mischung wird während 1,5 h stehengelassen, wobei ein kolloidales, öliges Produkt erhalten wird.

Pyridin und Essigsäure werden mit destilliertem Wasser entfernt und das Produkt wird mit Wasser gewaschen, bis es neutral reagiert. Die wässrige Phase wird abgetrennt und die ölige Phase wird unter vermindertem Druck im Exsikkator bis zur Trockene eingedampft. Man erhält 45 mg eines öligen Produkts. Dieses wird an Silikagel chromatographiert, wobei ein Lösungsmittelgemisch aus Äthylacetat und Cyclohexan im Volumenverhältnis 10:50 verwendet wird. Es handelt sich bei der gereinigten Verbindung um ein viskoses Öl. Das IR-Spektrum zeigt keine Absorptionsbande bei 3600 bis 3200 cm<sup>-1</sup>. Man erkennt, dass es sich um 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat handelt.

Versuch 1

Akute Toxizität und Antitumorwirkung (in vivo) der erfindungsgemässen Chlorambucilderivate

(1) Akute Toxizität (LD<sub>50</sub>)

Zur Messung der LD<sub>50</sub>-Werte werden acht weibliche ICR-JCL-Mäuse (Alter: 5 Wochen) als eine Gruppe in einem transparenten Polykäfing verwendet. Der jeweilige Wirkstoff wird in Olivenöl aufgelöst und durch intraperitoneale Injektion (i.p.) orale Verabreichung (p.o.) und subkutane Injektion (s.c.) in einer Dosis verabreicht. Sodann wird der LD<sub>50</sub>-Wert nach dem graphischen Litchfield-Wilcoxon-Verfahren nach 7 Tagen ermittelt. Es werden die folgenden Ergebnisse erzielt: Chlorambucil hat einen LD<sub>50</sub>-Wert von 20 mg/kg (i.p.) bzw. 80 mg/kg (p.o.) bzw. 26 mg/kg (s.c.). Der LD<sub>50</sub>-Wert des erfindungsgemässen Wirkstoffs Nr. 2 beträgt gemäss Tabelle 1 mehr als 3000 mg/kg (i.p.) bzw. mehr als 6000 mg/kg (p.o.) bzw. mehr als 3000 mg/kg (s.c.).

(2) Antitumortest (in vivo)

Proben von menschlichen Brustkrebszellen mit Steroidhor-

monrezeptoren werden subkutan unter das Vorderbein von Mäusen (BALB/C-nu/nu; 5 Wochen alt) implantiert, wobei feste Tumore gebildet werden. Nach 24 h nach der Implantation wird jeweils eine Olivenöldispersion oder -lösung des Wirkstoffs subkutan oder oral verabreicht, und zwar an jedem zweiten Tag 10 mal. 25 Tage nach der Implantation werden die Tumore entnommen. Die Wirksamkeit der Tumoringhibition wird ermittelt aus (A) dem durchschnittlichen Gewicht der entnommenen Tumore bei 10 Mäusen (der Wirkstoff wurde verabreicht) und (B) dem durchschnittlichen Gewicht der entnommenen Tumore bei 10 Vergleichsmäusen.

$$\text{Effizienz der Tumoringhibition (\%)} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100.$$

Sowohl bei subkutaner als auch bei oraler Verabreichung von Chlorambucil in einer Dosis von 15 mg/kg beträgt die Inhibierungseffizienz etwa 50 bis 70 %, während bei Verabreichung der erfindungsgemässen Chlorambucilderivate die Inhibierungseffizienz mehr als 90 % beträgt. Bei Verabreichung der erfindungsgemässen Chlorambucilderivate überleben alle Mäuse.

Die Autopsie zeigt, dass bei Verabreichung von Chlorambucil schwerwiegende Änderungen der Galle, des Uterus und des Thymus auftreten, während andererseits bei Verabreichung der erfindungsgemässen Wirkstoffe keine Veränderungen beobachtet werden.

Tabelle 1

	LD <sub>50</sub>			
Probe Nr.	1	2	3	4
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (orale Verabreichung)	80	6000<	3000<	3000<
LD <sub>50</sub> (mg/kg) (subkutane Verabreichung)	26	2000<	2000<	2000<

Tabelle 2  
Antitumoreffekt

Probe Nr.	1		2		3		4		5
Antitumortest									
Orale Verabreichung									
Dosis (mg/kg)	10	15	10	15	10	15	10	15	15
Überlebensverhältnis <sup>+</sup>	8/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Inhibierungseffizienz (%)	55	70	92	98	91	93	93	97	0
Subkutane Verabreichung									
Dosis (mg/kg)	5	10	5	10	5	10	5	10	10
Überlebensverhältnis <sup>+</sup>	9/10	7/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Inhibierungseffizienz (%)	53	71	90	98	93	95	92	94	0

Bemerkungen:

- Wirkstoff Nr. 1: Chlorambucil
- Wirkstoff Nr. 2: 3-Benzoyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat
- Wirkstoff Nr. 3: 3-Acetoxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat
- Wirkstoff Nr. 4: 3-Propionyloxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-}p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl]-butyryloxy]]-acetat

<sup>60</sup> Wirkstoff Nr. 5: Olivenöl (Blindversuch)

Versuch 2

Man arbeitet gemäss dem Versuch 1, wobei man jedoch den jeweiligen Wirkstoff in Form einer Dispersion in Polysolvate 80 (Emulgator) durch intraperitoneale Injektion verabreicht, um den Antitumoreffekt zu testen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

	Chlorambucil	3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat	
Dosis (mg/kg)	5	0,5	5
Inhibierungseffizienz (%)	30	91	97
akute Toxizität LD <sub>50</sub>	20	1000<	

## Versuch 3

Bindung von 3-Hydroxy-1,3,5(10)-östratrien-17β-[[4-{p-[bis-(2-chloräthyl)-amino]-phenyl}-butyryloxy]]-acetat an Östrogenempfindliche Zellen.

Mit Tritium (<sup>3</sup>H) markiertes Östradiol wird mit Kaninchenuterusgewebe inkubiert und dabei gebunden. Sodann wird der Wirkstoff dem System zugesetzt und die Menge an freiem <sup>3</sup>H-Östradiol, welches durch das zugesetzte Östradiol ersetzt wurde, wird bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt. Es wird festgestellt, dass der Gehalt an freiem <sup>3</sup>H-Östradiol steigt, ebenfalls der Gehalt an Östradiol selbst. Diese Tatsache beweist, dass der Östrogen-Rezeptor die erfindungsgemässen Wirkstoffe bindet.

Im folgenden seien einige Mittel mit einem Gehalt der erfindungsgemässen Wirkstoffe angegeben.

## Mittel 1

Wirkstoff (Beispiel 3)  
Mannit  
Sorbit  
Carboxymethylcellulose  
Magnesiumstearat  
Talkum

## Gew.-Teile 30

50 Die Komponenten werden zur Herstellung einer Injektionsflüssigkeit erhitzt, vermischt und sterilisiert.  
35 Der Acylrest R kann eine gegebenenfalls substituierte Alkanoylgruppe mit vorzugsweise 1 bis 18, insbesondere bis zu 12 und  
25 speziell bis zu 7 oder 2 bis 4 C-Atomen oder Aroylgruppe  
5 35 insbesondere Benzoyl sein. Als Substituenten kommen insbesondere Cl, Br, J, F, C<sub>1-4</sub>-Alkyl, C<sub>1-4</sub>-Alkoxy, Hydroxy, Amino oder  
40 Carboxy in Frage (1, 2, 3 oder mehrere Substituenten).

Diese Komponenten werden vermischt und pulverisiert und zu Tabletten mit einem Durchmesser von 10 mm gepresst.

## Mittel 2

## Gew.-Teile

5  
Wirkstoff (Beispiel 2) 100  
Lactose 500  
Zucker-fettsäureester 10  
Stärke 100  
10 Wasser (1% Natriumcarboxy-methylcellulose) 100

Die Verbindungen werden geknetet und durch ein Pelletisiergerät extrudiert, wobei man ein Granulat erhält. Dieses wird getrocknet und gesiebt. Man erhält Teilchen mit einer Teilchengrösse von 10 bis 24 Maschen/2,5 cm. Diese dienen der oralen Verabreichung.

## Mittel 3

20 Das Granulat des Mittels 2 wird in eine handelsübliche Kapsel gefüllt, wobei man eine Kapsel mit einem Inhalt von 0,5 cm<sup>3</sup> erhält.

## Mittel 4

## Gew.-Teile

25  
Wirkstoff (Beispiel 1) 5  
Olivenöl 95

FIG. 1

