



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

CH 666 276 A5

Int. Cl.4: C 07 J 1/00

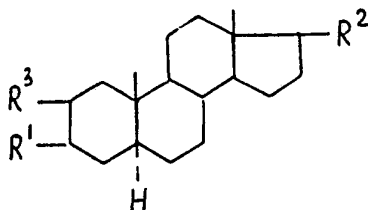
Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

PATENTSCHRIFT A5

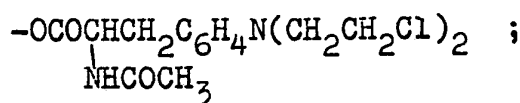
②① Gesuchsnummer:	571/86	Kharkovsky Nauchno-Issledovatel'sky Institut Endokrinologii i Khimii Gormonov, Kharkov (SU)
②② Anmeldungsdatum:	27.06.1984	⑦② Erfinder: Sofiina, Zoya Petrovna, Moskau (SU) Larionov, Leonid Fedorovich, Moskau (SU) Lagova, Nina Dmitrievna, Moskau (SU) Platonova, Galina Nikolaevna, Moskau (SU) Valueva, Irina Mikhailovna, Moskau (SU) Kurdjumova, Kira Nikolaevna, Moskau (SU) Shkodinskaya, Elizaveta Nikolaevna, Moskau (SU) Sushinina, Ljudmila Pavlovna, Moskau (SU) Volovelsky, Lev Natanovich, Kharkov (SU) Kuznetsova, Irina Mikhailovna, Moskau (SU) Degtyar, Vladislav Grigorievich, Moskau (SU)
②④ Patent erteilt:	15.07.1988	⑦④ Vertreter: Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	15.07.1988	⑧⑥ Internationale Anmeldung: PCT/SU 84/00033 (Ru)
⑦③ Inhaber: Vsesojuzny Onkologicheskyy Nauchny Tsentr Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR, Moskau (SU)		⑧⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 86/00311 (Ru) 16.01.1986

⑤④ Steroidderivate der Androstanreihe.

⑤⑦ Steroidderivate der Androstanreihe stellen Verbindungen der allgemeinen Formel



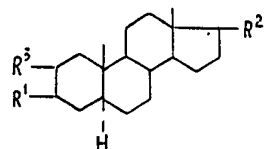
dar, worin R¹ für -OCOCH₂C₆H₄N(CH₂CH₂Cl)₂; -OH; =O; R² für -OCO(CH₂)_nC₆H₄N(CH₂CH₂X)₂, worin n = 1, 3; X = Cl, Br, J; für -OH; =O-;



R³ für -CH₃; -H stehen. Diese Verbindungen besitzen eine hormonale und Antitumor-Aktivität. Sie können zur Krebsbehandlung und als Antikontrazeptiva verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Steroidderivate der Androstanreihe, die Verbindungen der allgemeinen Formel

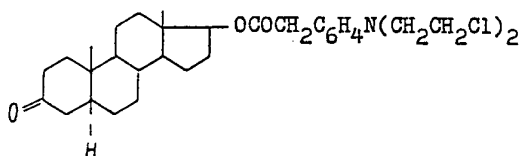


darstellen, worin R^1 für $-\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$; $-\text{OH}$; $=\text{O}$; R^2 für $-\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_2$, worin $n = 1, 3$; $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{J}$; für $-\text{OH}$; $=\text{O}$; $-\text{OCOCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$;



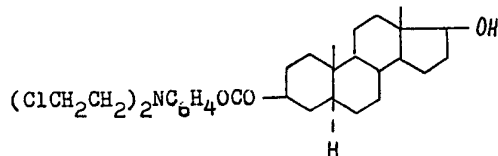
R^3 für $-\text{CH}_3$; $-\text{H}$ stehen.

2. Steroidderivat der Androstanreihe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Verbindung der Formel



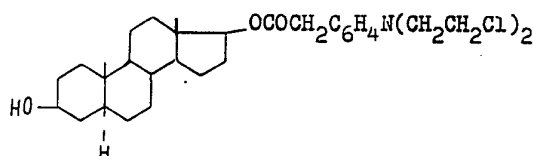
darstellt.

3. Steroidderivat der Androstanreihe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Verbindung der Formel



darstellt.

4. Steroidderivate der Androstanreihe nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Verbindung der Formel



darstellt.

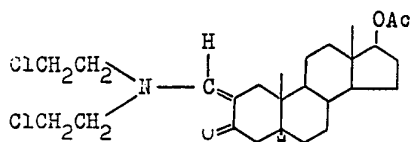
BESCHREIBUNG

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Steroidderivate der Androstanreihe (Hormonzytostatika), die eine Antitumor- und hormonale Aktivität besitzen und in der Medizin zur Krebsbehandlung und als Antikontrazeptiva Verwendung finden können.

Stand der Technik

Bekannt ist ein Steroidderivat der Androstanreihe 2[Bis(2-chloräthyl)aminomethylen]-5 α -androstan-17 β -ol-3-on-17 β -azetat (s. Burstein, H. Ringold. J. Org. Chem., 26, p. 3085, 1961)



bei dem an das Molekül des androgene Eigenschaften aufweisenden Hormons eine alkylierende Gruppe gebunden ist. Es ist festgestellt, dass diese Verbindung im Mäuseversuch nach 6tägiger Einführung in Dosen von 500 mg/kg pro Tag keine Toxizität gezeigt hat. Ihre Antitumoraktivität ist nicht beschrieben.

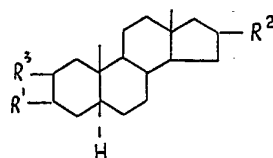
Bekannt ist eine Reihe von Steroidderivaten der Androstanreihe, bei denen die Antitumor- und hormonale Aktivität nachgewiesen wird. Zu solchen Derivaten gehören beispielsweise p-Di(2-chloräthyl)aminophenyllessigsäureester (Chlorphenazyl) und Ester von Steroidalkoholen, Dehydroepiandrosteron und Testosteron. Die angegebenen Verbindungen wirken auf Tumoren, welche gegen alkylierende Agenzien (Walker-Karzinom W-256 von Ratten und Adenokarzinom der Milchdrüse von Mäusen Ca-755) sehr empfindlich sind, und einige Milchdrüsentumoren bei Mäusen und Ratten (HK, R-13762), welche gegen alkylierende Agenzien praktisch unempfindlich sind. Die genannten Verbindungen sind weniger toxisch als darin enthaltenes Chlorphenazyl. Während optimale therapeutische Dosen von Chlorphenazyl bei Mäusen zwischen 1 und 1,5 mg/kg im Laufe 5- bis 10tägiger Einführung schwanken, so betragen sie im Falle von Dehydroepiandrosteronderivate (DEA-mustard) 15 bis 20 mg/kg bei der gleichen Erhaltungsdauer. Die Verbindungen weisen jedoch eine toxische Wirkung auf den Organismus auf, welche sich in Neurotoxizität, Lymphopenie und im Auftreten von Nekrosen in Leber und Nieren äussert (Z.P. Soffina, N.D. Lagova, I.M. Valueva, Z.V. Kuzmina, E.N. Shkodinskaya, A.M. Khaletsky, Trudy I Vsesoyuznoi konferentsii po khimioterapii zlokachestvennykh opukholei, Riga, 1968, S. 441-443; M. Wall, G. Abernethy, F. Carroll, D. Taylor. J. med. chem., 1969, 12, 5, p. 810-818; U. Schaeppi, J. Heyman, R. Fleischman, H. Rosenkrantz, V. Glievski, R. Phelan, D. Cooney, R. Davis. Canc. Chem. rep., 1973, p. 3, 4, 1, p. 85-95; N.D. Lagova in Buch: Aktualnye voprosy eksperimentalnoi khimioterapii opukholei, Chernogolovka, 1980, Bd. 1, S. 222-225).

Darstellung der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Steroidderivate der Androstanreihe zu entwickeln, welche eine Antitumor- und hormonale Aktivität, insbesondere eine Richtwirkung auf die Targetgewebe und darin auftretenden Tumoren, aufweisen.

Die erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe sind neu und in der Fachliteratur nicht beschrieben.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, dass die Steroidderivate der Androstanreihe erfindungsgemäss Verbindungen der allgemeinen Formel



darstellen, worin R^1 für $-\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$; $-\text{OH}$; $=\text{O}$; R^2 für $-\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_2$, worin $n = 1, 3$; $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{J}$; für $-\text{OH}$; $=\text{OH}$; $-\text{OCOCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$;



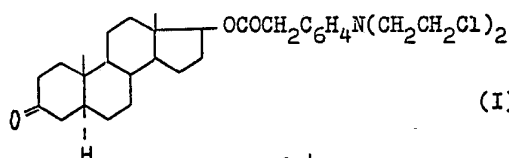
R^3 für $-\text{CH}_3$; $-\text{H}$ stehen.

Die erfindungsgemässen Steroide der Androstanreihe (Hormonzytostatika) enthalten als Steroide Metabolite des Testosterons oder ihre synthetischen Analoga und stellen Ester des in 2, 3 und 17 Stellungen substituierten 5 α -Androstans dar.

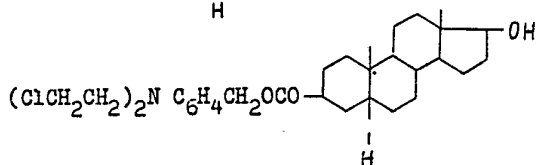
Die erfindungsgemässen Verbindungen stellen amorphe oder feinkristalline pulverförmige Substanzen von weisser oder weissgelblicher Farbe dar, die wasserunlöslich und in organischen Lösungsmitteln löslich sind. Die Verbindungen weisen eine langzeitige Lagerbeständigkeit im Dunkeln bei einer Temperatur von plus 5 bis 0°C auf und bekommen bei Tageslicht eine gelbe Farbe.

Als erfindungsgemässe Verbindungen dienen folgende:
 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (I);
 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylbutyrat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (II);
 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-5α-androstan-17β-ol-3-on (III);
 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-2α-methyl-5α-androstan-17β-ol-3-on (IV);
 3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V);
 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI);
 17β-[p-Di(2-bromäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VII);
 17β-[p-Di(2-jodäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VIII).

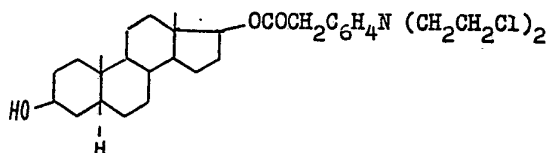
Es ist ratsam, folgende Steroidderivate der Androstanreihe zu verwenden:



(I)



(V)



(VI)

Bester Weg zur Ausführung der Erfindung

Die erfindungsgemässen Verbindungen besitzen eine hohe Antitumoraktivität sowie eine hormonale (androgene und anabole) Aktivität, deren Charakter von der Struktur des hormonalen Molekülanteils dieser Substanzen sowie von der Struktur der alkylierenden Gruppe und dem Bindungsort derselben an das Steroid abhängt.

Der Vorteil der erfindungsgemässen Verbindungen besteht in der Selektivität ihrer Wirkung auf die Targetgewebe und von diesen Geweben ausgehenden Tumoren, was die Besonderheiten der Spektren ihrer Antitumorwirkung gegenüber den bekannten Hormonzytostatika sichert. Das vorgeschlagene parenterale (subkutane) Verfahren zur Einführung der erfindungsgemässen Hormonzytostatika bewirkt eine geringere Toxizität und eine höhere Selektivität der biologischen Wirkung der Verbindungen als perorales Verfahren, weil es die Spaltung des Moleküls in ein hormonales und ein hochtoxisches alkylierendes Fragment nicht verursacht.

Die zytostatische Aktivität der erfindungsgemässen Verbindungen wurde an einer Reihe der Stämme solider Transplantationstumoren und Leukosen bei Mäusen und Ratten, und zwar Adenokarzinom der Milchdrüse Ca-755, Lewis-Lungenkarzinom LL, Zervikalkrebs ZK-5, Walker-Karzinom

W-256, Ovarialtumor OT, lymphoide Leukose L-1210 untersucht.

Im Vergleich zu den erfindungsgemässen Verbindungen wurden gleichzeitig Dihydrotestosteron (5α-Androstan-17β-ol-3-on), Dehydroepiandrosteron und Chlorphenazyl oder das Präparat Sarkolysin (β-p-Di(2-chloräthyl)aminoethyl-α-alaninhydrochlorid), die zum Molekülbestand der meisten erfindungsgemässen Verbindungen gehören, sowie die bekannten Hormonzytostatika, d.h. Dehydroepiandrosteron mit Chlorphenazyl (DEA-mustard) und das Präparat Östrazyt (Östra-1,3,5(10)-trien-3,17β-diol, 3N-[bis-(2-chloräthyl)]karbamat-17β-natriumphosphat) untersucht.

Die Verbindungen wurden den Tieren subkutan in Öl in Dosen in mg je 1 kg Körpermasse 5 bis 10 Tage lang innerhalb von für die Untersuchungen an betreffenden Tumoren üblichen Fristen (24 oder 48 Stunden nach der Transplantation des Tumors) eingespritzt. Östrazyt führte man auf gleiche Weise in 0,9%iger NaCl-Lösung ein.

Zwecks Studie der Selektivität benutzte man spontane und/oder durch Kanzerogene induzierte Tumoren von Mäusen und Ratten, die in den Targetgeweben auftreten. In diesen Fällen begann man die Behandlung dann, wenn die Tumoren eine bestimmte Grösse erreichten, welche die Möglichkeit ihrer spontanen Regression ausschliesst.

Als Kriterien für die Antitumoraktivität galten die Verlängerung der Überlebensdauer von Tieren (VÜT %) und die Hemmung des Wachstums solider Tumoren (HWT %).

$$VÜT \% = -\frac{T-C}{C} \cdot 100,$$

worin T die Mittlere Überlebensdauer der behandelten Tiere, C die mittlere Überlebensdauer der Kontrolltiere bedeuten.

$$HWT \% = \frac{K-O}{K} \cdot 100,$$

worin O das mittlere Tumolvolumen (Tumormasse) in der Gruppe der behandelten Tiere, K das mittlere Tumolvolumen (Tumormasse) in der Kontrollgruppe bedeuten.

Als Kriterien des Antitumoreffekts bei der Einwirkung auf spontane und induzierte Tumoren dienten die Ausheilung der Tiere (%) und die Veränderung der Tumorabmessungen gegenüber den Ausgangsdaten (%).

Die Untersuchungen wurden an Linienmäusen und ihren Hybriden der ersten Generation durchgeführt.

Die Ergebnisse, erhalten bei der Untersuchung der Antitumoraktivität der erfindungsgemässen Verbindungen an einigen Transplantationstumoren, sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1
Antitumoraktivität der erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe

lfd. Nr.	Benennung der Verbindung	Dosierung in mg/kg pro Tag	Behandlungsdauer nach Tumortransplantation in Tagen
1	2	3	4
1	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (I)	25...50	2...6
2	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylbutyrat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (II)	30...50	2...6

lfd. Nr.	Benennung der Verbindung	Dosierung in mg/kg pro Tag	Behandlungsdauer nach Tumortransplantation in Tagen
1	2	3	4
3	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-5α-androstan-17β-ol-3-on (III)	10...100	2...6
4	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-2α-methyl-5α-androstan-17β-ol-3-on (IV)	10...100	2...6
5	3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V)	5...30	2...6
6	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI)	5...50	2...6
7	17β-[p-Di(2-bromäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VII)	10...50	2...6
8	17β-[p-Di(2-jodäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VIII)	25...100	2...6
9	Dihydrotestosteron	10...15	2...6
10	Chlorphenazyl	1,5...2	2...6
11	Sarkolysin	2...3	2...6
		7	2...6
12	DEA-mustard	10...15	2...11
		50	2...6
13	Östrozyl	100	2...6

Tabelle 1 (Fortsetzung)

lfd. Nr.	Maximale Hemmung des Tumorwachstums in %			Verlängerung der Überlebensdauer in %		
	Ca-755	LL	W-256	Ca-755	L-1210	W-256
1	5	6	7	8	9	10
1	98	66	99	59	41	160
2			71			
	30% Ausheilung					47
3	98	71		122	82	
4	96	58		79	82	
5	95	66		31	28	
6	95	60		32	25	
7	97			54		
8	65			47		
9	16	+ 77				
10	33		97			
11	83	58		32	90	
12	10	59			57	
13	+ 6	29			4	

Das Zeichen + bedeutet die Stimulation des Tumorwachstums.

Wie aus der Tabelle 1 zu ersehen ist, weisen die erfindungsgemässen Verbindungen eine starke Antitumorwirkung in bezug auf eine Reihe von Transplantationstumoren auf, was sich in einer bedeutenden Hemmung des Tumorwachstums, und zwar um 58 bis 99% und/oder Verlängerung der Überlebensdauer von behandelten Tieren um 25 bis 160% äussert. Besonders sichtbar sind die Vorteile der erfindungsgemässen Verbindungen an Ca-755. Die Verbindungen hem-

men nicht nur das Wachstum von Ca-755 um 65 bis 98%, sondern verlängern auch die Überlebensdauer von Tieren um 31 bis 122%. Das bekannte Hormonzytostatikum der Androstanreihe DEA-mustard sowie Östrozyl haben keine Antitumoraktivität gegenüber diesem Tumor gezeigt.

Die Tabelle 1 gibt ebenfalls an, dass sich die erfindungsgemässen Verbindungen von alkylierenden Agenzien, Chlorphenazyl und Sarkolysin, die zu ihrem Molekül gehören, in Kraft und Spektrum der Antitumorwirkung sowie in der Toxizität unterscheiden. So liegen zum Beispiel die therapeutischen Dosen der erfindungsgemässen Verbindungen in einem Bereich von 5 bis 150 mg/kg bei täglicher Injektion innerhalb von 5 Tagen, während die höchstverträglichen Dosen von Chlorphenazyl und Sarkolysin bei diesem Behandlungsregime 1,5 bzw. 3 mg/kg betragen.

Bei den Verbindungen 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (I), 3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V) und 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI) traten in höherem Grad die Selektivität und die Unterschiede in der Wirkung auf in hormonabhängigen Geweben entstehende Tumoren Transplantationszervikalkrebs ZK-5, Ovarialtumoren OT sowie auf induzierten und spontanen Ovarialtumoren und Milchdrüsentumoren von Mäusen und Ratten in Erscheinung. Zugleich waren die aufgezählten Verbindungen weniger aktiv bei der Behandlung von Tieren mit Leukose L-1210 (Tabelle 1), was von ihrer geringeren alkylierenden Wirkung zeugt. Wie die Angaben der Tabelle 2 zeigen, hindert die Verbindung I das Wachstum des Ovarialtumors schwach, während die Verbindung VI und besonders die Verbindung V eine tiefe Wachstumshemmung dieses Tumors bewirken. Aus der gleichen Tabelle ist zu ersehen, dass der Zervikalkrebs und der Ovarialtumor schwach oder gar nicht empfindlich gegen Dihydrotestosteron und Chlorphenazyl sind, während Östrogenzytostatikum Östrozyl das Wachstum von Zervikalkrebs ZK-5 selbst fördert. Aus den in der Tabelle 3 dargestellten Angaben folgen die Vorteile der Verbindung I, V und VI gegenüber dem bekannten Androgen Testosteronpropionat in ihrer Antitumoraktivität gegen induzierte und spontane Ovarial- und Milchdrüsentumoren von Mäusen und Ratten.

Die Untersuchung des allgemeintoxischen Effekts der erfindungsgemässen Verbindungen hat ergeben, dass sie relativ schwachtoxisch sind. Mäuse vertragen fünfmalige Verabreichung der Substanzen in Dosen von 5 bis 100 mg/kg. Die meisten Substanzen haben einen weiten therapeutischen Dosisbereich (Tabelle 4). Sie lösen einen hohen Antitumoreffekt in Dosen aus, welche sich durch die absolute Grösse um das 3- bis 10fache unterscheiden.

Tabelle 2

Antitumoraktivität der Steroidderivate der Androstanreihe auf aus den Targetgeweben ausgehende Tumoren

Benennung der Verbindung	Maximale Hemmung des Tumorwachstums (%)	Verlängerung der Überlebensdauer (%)
	ZK-5	OT
1	2	3
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (I)	82	37
3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V)	80	94
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI)	79	73

Benennung der Verbindung	Maximale Hemmung des Tumorwachstums (%)		Verlängerung der Überlebensdauer (%)
	ZK-5	OT	
1	2	3	4
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-5α-androstan-17β-ol-3-on (III)	87	97	57
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-2α-methyl-5α-androstan-17β-ol-3-on (IV)	99	92	37
Dihydrotestosteron	13	54	0
Chlorphenazyl	35	25	0
Östrazyt	+ 322	29	0

Tabelle 3
Antitumorwirkung der Steroidderivate der Androstanreihe auf induzierte und spontane Tumoren, die aus den Targetgeweben ausgehen

lfd. Nr.	Tumoren	Verminderung der Grösse oder Stimulation (+) des Wachstums von Tumoren gegenüber Abmessungen zu Behandlungsanfang in %
1	2	3
1	Nach Biskinds induzierte Ovarialtumoren von Mäusen	Wachstumsstillstand
2	Nach Biskinds induzierte Ovarialtumoren von Ratten 27	
3	Spontane Milchdrüsentumoren von Mäusen	Wachstumsstillstand
4	Induzierte Milchdrüsentumoren von Ratten	60

Tabelle 3 (Fortsetzung)

lfd. Nr.	Verminderung der Grösse oder Stimulation des Wachstums (+) von Tumoren gegenüber Abmessungen zu Behandlungsanfang in %	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (V)	17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VI)	Testosteronpro-pionat	Kontrolle
1	4	5	6	7	
1		67		+ 256	+ 21
2				64	+ 32
3	35	24		+ 33	+ 88
4				Wachstumsstillstand	+ 280

Tabelle 4
Höchstverträgliche Dosen (HVD) und der therapeutische Dosisbereich der Steroidderivate der Androstanreihe (Mäusen, fünfmalige Injektion)

Benennung der Verbindung	HVD mg/kg	Therapeutische Dosen mg/kg
1	2	3
10 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-azetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (I)	25	20...25
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylbutyrat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (II)	50	30
15 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-5α-androstan-17β-ol-3-on (III)	100	10...100
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-2α-methyl-5α-androstan-17β-ol-3-on (IV)	100	10...100
20 3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-azetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V)	30	5...30
17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-azetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI)	50	10...30
25 17β-[p-Di(2-bromäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VII)	50	10...50
17β-[p-Di(2-jodäthyl)aminophenyl-azetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VIII)	100	25...100
30 Chlorphenazyl	3	1,5...2
Sarkolysin	5	2...3

Zwecks Untersuchung der Selektivität der Wirkung der erfindungsgemässen Verbindungen auf die Targetgewebe wurden ihre hormonalen Eigenschaften mit Hilfe biologischer (androgene und anabole Wirkung) und biochemischer (spezifische Bindung mit Rezeptoren von Dihydrotestosteron und 17β-Östradiol) Tests bestimmt. Die androgene und anabole Aktivität wurde nach Veränderung der Masse der Prostata bzw. m. levator ani bei kastrierten Ratten nachgewiesen und als Index (Verhältnis der relativen Masse betreffender Organe nach der Einwirkung zu derselben in der Kontrolle, die für 1 gehalten wurde) ausgedrückt. Die spezifische Bindung mit Rezeptoren von Dihydrotestosteron und 17β-Östradiol (freie Bindungsorte) wurde bei ventraler Prostata von Normal- und im voraus kastrierten Ratten (vor 2 Wochen) untersucht, welche eine therapeutische Kur von Präparaten erhielten. Die Bestimmung der spezifischen Bindung von Dihydrotestosteron und 17β-Östradiol führte man in Zytosolfractionen des Gewebes durch, indem man die Eiweisse durch Protaminsulfat nach der Inkubation von Zytosolen mit Sättigungskonzentrationen von [³H]-Dihydrotestosteron und [³H]-17β-Östradiol bei 0°C ausschied. Kernrezeptoren wurden aus der Fraktion gereinigter im voraus mit 0,4-n-KCl-Lösung extrahierter Kerne durch Ausfällen des Hormon-Rezeptor-Komplexes durch Protaminsulfat nachgewiesen. Die Tabelle 5 enthält die Angaben über die androgene und anabole Wirkung der erfindungsgemässen Verbindungen.

Die Tabelle 5 gibt an, dass die meisten erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe eine schwache anabole Aktivität zeigen. Ihre androgene Aktivität hängt in grossem Masse von der Struktur des Hormonteils der Verbindung ab. Als Androgene wirken die Verbindungen I und III stärker als die anderen. Die Dauer der androgenen Wirkung ist auch bei der Verbindungen I und III die grösste. Die androgene

Aktivität der Verbindung I ist jedoch bedeutend schwächer als bei Testosteronpropionat (beim bekannten Androgen).

Es ist festgestellt, dass die erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe spezifisch mit den Rezeptoren der entsprechenden Hormone gebunden werden. So bindet sich die Verbindung I an zytoplasmatische Rezeptoren von Dihydrotestosteron unter anschliessender Zusammenwirkung mit den entsprechenden Akzeptorzonon des Chromatins sowohl in Normalgeweben (ventrale Prostata und Gebärmutter bei Ratten) als auch in Tumoren von Tieren und Menschen, welche aus den androgenspezifischen Targetgeweben (Milchdrüse) ausgehen.

Die hormonalen Eigenschaften der erfindungsgemässen Verbindungen I, V und VI traten ebenfalls im Einfluss auf die Rezeption von 17β -Östradiol im Gewebe der ventralen Prostata zutage. Zwischen den Verbindungen fanden sich dabei die Unterschiede. Bei intakten Ratten stieg beispielsweise die spezifische Bindung von [^{3} H]- 17β -Östradiol im Zytosol um das 5fache nach der Einführung der Verbindung V und um das 10fache nach der Einführung der Verbindung I an. Nach der Einführung der Verbindung VI wurde die spezifische Bindung von [^{3} H]- 17β -Östradiol im Zytosol nicht nachgewiesen (sie wurde völlig gehemmt). Die erfindungsgemässen Substanzen änderten also wesentlich die Empfindlichkeit der Tiere gegen Östrogene.

Die beschriebenen Substanzen I, V und VI weisen ebenfalls einen verschiedenen Metabolismus in den androgenspezifischen Targetgeweben auf. Die Unterschiede äussern sich schon auf dem Niveau des Hauptenzym des Metabolismus von Androgenen, der 5α -Reduktase sowie auf dem Niveau von 3β -, 3α -, 6α - und 7α -Hydroxylasen.

Im Spektrum der Antitumorwirkung, in allgemeintoxischer, hormonaler Wirkung sowie im Metabolismus in den Targetgeweben unterscheiden sich also die erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe. Jede der Verbindungen kennzeichnet sich nur durch ihr eigene Besonderheiten der biologischen Wirkung und ist deshalb an und für sich von Interesse.

Tabelle 5
Androgene und anabole Eigenschaften der
Hormonzytostatika, Steroidderivate der Androstanreihe

lfd Nr.	Verbindung	Dosis mg/kg) Intervall (St.) Injektionszahl
1	2	3
1	17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl]-azetat]- 5α -androstan- 17β -ol-3-on (I)	$25/24 \times 10$
2	3β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl]-azetat]- 5α -androstandiol- 3β , 17β (V)	$20/24 \times 10$
3	17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl]-azetat]- 5α -androstandiol- 3β , 17β (VI)	$20/24 \times 10$
4	17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl]-N-azetylalanyl]- 5α -androstan- 17β -ol-25/24 $\times$ 10 3-on (III)	$50/24 \times 10$
5	17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl]-N-azetylalanyl]- 2α -methyl- 5α -androstan- 17β -ol-3-on (IV)	$50/24 \times 10$
6	DEA-mustard	$5/24 \times 10$ $10/24 \times 10$
7	Dihydrotestosteron	$15/24 \times 10$
8	Dehydroepiandrosteron	$0,5/24 \times 10$ $1/24 \times 10$
9	Testosteronpropionat	$15/24 \times 10$
10	Sarkolysin	$2/24 \times 10$
11	Chlorphenazyl	$1/24 \times 10$

Tabelle 5 (Fortsetzung)

lfd Nr.	Tage nach der Behandlungskur	Anaboler Index	Androgener Index
1	4	5	6
5			
1	1	2,4	8,5
	10	1,3	5,2
2	1	0,9	2,5
	10	1,3	2,4
10	3	1,2	2,6
	10	1,4	1,3
	4	1,7	2,0
	10	1,2	1,1
	1	2,1	6,2
15	10	1,3	4,5
5	1	1,7	1,6
	10	1,2	0,8
	1	2,3	1,5
	10	1,6	1,8
20	6	1,3	1,4
	1	1,2	2,2
	1	1,6	1,1
	10	1,1	0,9
8	1	1,5	1,2
25	1	1,1	1,4
9	1	2,7	23,9
	10	2,1	8,2
10	1	0,8	1,6
11	1	1,0	0,9
30			

Bei der Untersuchung der Kinetik der Hormonwirkung von 17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]- 5α -androstan- 17β -ol-3-on (I) wurde eine interessante Gesetzmässigkeit entdeckt.

Die Stimulationsperiode von Targetorganen (Prostata, Hoden, Samenbläschen) wechselt sich nach 1,5 Monaten mit der Periode ihrer tiefen Hemmung, während bei Tieren, welche nur Dihydrotestosteron erhielten, die Masse der aufgezählten Organe zu dieser Zeit auf die Norm zurückkam.

Bemerkenswert ist ebenfalls die dauernde Hemmwirkung der Verbindung I auf die Schilddrüse bei männlichen und weiblichen Ratten (analog zur Wirkung von Dihydrotestosteron) sowie auf die Gebärmutter und Eierstöcke, wobei die Masse dieser Organe auch 3 Monate nach dem Aufhören mit der Einführung des Präparats auf ihre Norm nicht zurückkam.

An weiblichen Ratten mit östrogenaktiven follikulären Ovarialzysten ist der Effekt der temporalen «chemischen Kastration» der Verbindung I festgestellt. Nach der Behandlungskur mit der Verbindung I hört bei Ratten die für sie charakteristische ständige Brunst auf. Bei Laparotomien und histologischen Untersuchungen von Eierstöcken stellte sich heraus, dass das Aufhören mit der Brunst wegen Atresie von Follikeln und Atrophie des interstitiellen Gewebes von Eierstöcken erfolgt, das bei Ratten östrogenaktiv ist. Der Effekt der «chemischen Kastration» ist auch an Ratten in der Laktationsperiode nachgewiesen, welche nach der Behandlungskur mit 17β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]- 5α -androstan- 17β -ol-3-on (I) für 5 bis 7 Monate ihre Fortpflanzungsfähigkeit verloren. Diese Angaben zeugen von den antikonzeptionellen Eigenschaften dieser Substanz.

Es ist gezeigt, dass die Verbindung I ebenfalls alkylierende Eigenschaften besitzt. Sie stört den RNS-Transkriptions- und Transportprozess, bewirkt die Strukturfehler der DNS, die aber in den Normalzellen (Milz) schneller als in den Tumorzellen (Sarkom S-37) regeneriert werden. Das letztgenannte spricht für die Selektivität der Antitumorwirkung.

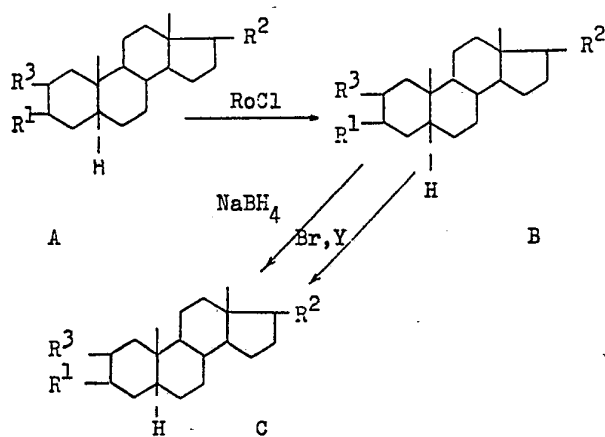
Am Beispiel der Verbindung I ist somit gezeigt, dass die Hormonzytostatika, Steroidderivate der Androstanreihe einen

Doppelmechanismus der biologischen Wirkung aufweisen. Sie haben eine alkylierende und Hormonwirkung.

Die technologische Gestaltung des Verfahrens zur Herstellung von Steroidderivaten der Androstanreihe ist einfach.

Die Synthese der erfindungsgemässen Verbindungen erfolgt nach der bekannten Technologie durch Umsetzung von substituiertem 3 β -17 β -2 α -Androstan mit zytotoxischem Phenylalkansäurechlorid oder α -Amino- β -phenylpropionsäurechlorid in einem aprotischen Lösungsmittel in Gegenwart einer organischen Base beim Siedepunkt des Lösungsmittels innerhalb von 8 bis 24 Stunden und Isolieren des Endprodukts nach der Methode der präparativen Säulenchromatografie oder durch anschliessende Substitution von Galogenen im Reaktionsprodukt durch Brom oder Jod oder durch anschliessende Reduktion der Ketogruppe im Reaktionsprodukt.

Die Synthese der Verbindungen lässt sich als folgendes Schema darstellen:



A. $\text{R}^1 = -\text{OH}; -\text{O}-; \text{R}^2 = -\text{OH}, -\text{O}-; \text{R}^3 = -\text{CH}_3, -\text{H};$
 $\text{R}^1 = \text{R}^2 = -\text{OH}.$
 B. $\text{R}^1 = -\text{OH}; -\text{O}-; -\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2; \text{R}^2 =$
 $-\text{OH}, -\text{O}-, -\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_2$, worin $n = 1, 3$
 $-\text{OCOCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2;$

NHCOCH_3
 $\text{R}^3 = -\text{CH}_3, -\text{H}.$

C. $\text{R}^1 = -\text{OH}, -\text{O}-, -\text{OCOCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2; \text{R}^2 = -\text{OH},$
 $-\text{O}-, -\text{OCO}(\text{CH}_2)_n\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X})_2$, worin $n = 1, 3;$
 $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{J};$
 $-\text{OCOCHCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2;$

NHCOCH_3
 $\text{R}^3 = -\text{CH}_3, -\text{H}.$

Die Synthese der erfindungsgemässen Verbindungen wird durch Umsetzung des p-Di(2-chloräthyl)aminophenyllessigsäurechlorids mit in 3 β - oder 17 β - oder 2 α -Stellung substituiertem 5 α -Androstan, anschliessende Reduktion von Veresterungsprodukten mit Natriumborhydrid oder Ersetzen von Chlor durch Brom oder Jod durchgeführt.

Zum besseren Verstehen der vorliegenden Erfindung werden folgende konkrete Beispiele angeführt.

Beispiel 1

Herstellung von 17 β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5 α -androstan-17 β -ol-3-on (I)

Einer Aufschwemmung von 30,0 g (0,10 mmol) 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on in 500 ml Trockenbenzol gibt man die berechnete Menge von Triäthylamin und 38,0 (0,11 mmol) p-Di(2-chloräthyl)aminophenyllessigsäurechlorid zu. Das erhaltene Gemisch rührt man bei 80 °C innerhalb von 24 Stunden

um und trennt Triäthylaminhydrochlorid ab. Die Benzollösung wird mit wässriger KHCO_3 -Lösung, H_2O gewaschen und eingedampft. Der Rückstand wird in Benzol aufgelöst, auf die mit Al_2O_3 gefüllte Säule aufgetragen und mit Benzol eluiert.

Das Benzoleluat wird eingedampft, der Rückstand als Öl wird aus Äther kristallisiert. Die Ausbeute an Produkt beträgt 27,8 g (49,2%, bezogen auf das Ausgangshormon), die Schmelztemperatur liegt zwischen 99 und 101 °C (Äther).

Gefunden in %: C 67,85 H 7,89 Cl 12,96

$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_3\text{Cl}_2.$

Berechnet in %: C 67,89 H 7,84 Cl 12,95

Beispiel 2

Herstellung von 17 β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylbutyrat]-5 α -androstan-17 β -ol-3-on (II)

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt analog zu der in Beispiel 1 beschriebenen Synthese der Verbindung.

In die Veresterungsreaktion führt man 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on und p-Di(2-chloräthyl)aminophenylbuttersäurechlorid ein. Das Reaktionsgut wird bei 80 °C innerhalb von 17 Stunden umgerührt. Die anschliessenden Arbeitsgänge werden wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Die Ausbeute an Produkt beträgt 45,5%, bezogen auf das Ausgangshormon, die Schmelztemperatur 100 bis 102 °C.

Gefunden in %: C 68,65 H 8,15 Cl 11,98

$\text{C}_{33}\text{H}_{47}\text{Cl}_2\text{NO}_3$

Berechnet in %: C 68,77 H 8,16 Cl 12,32

Beispiel 3

Herstellung von 17 β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-n-azetylalanyl]-5 α -androstan-17 β -ol-3-on (III)

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt analog zu der in Beispiel 1 beschriebenen Synthese der Verbindung. In die

Veresterungsreaktion führt man 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on und α -N-Azetyl-amino- β [p-Di(2-chloräthyl)amino]phenylalaninsäurechlorid in Dichlormethan ein.

Das Reaktionsgut wird bei 40 °C innerhalb von 9 Stunden umgerührt.

Die anschliessenden Arbeitsgänge werden wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Das Veresterungsprodukt wird auf der mit Silikagel gefüllten Säule unter Verwendung von Benzol-Äthylazetat-Mischung (1:1) als Eluent chromatografiert. Die Ausbeute an Produkt beträgt 14,5%, bezogen auf das Ausgangshormon.

Gefunden in %: C 65,87 H 7,72 Cl 11,11

$\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$

Berechnet in %: C 65,94 H 7,75 Cl 11,47

Beispiel 4

Herstellung von 17 β -[p-Di(2-chloräthyl)aminophenyl-N-azetylalanyl]-2 α -methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-on (IV)

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt analog zu der in Beispiel 1 beschriebenen Synthese der Verbindung.

In die Veresterungsreaktion führt man 2 α -Methyl-5 α -androstan-17 β -ol-3-on und α -N-Azetyl-amino- β [p-Di(2-chloräthyl)amino]phenylalaninsäurechlorid in Dichlormethan ein. Das Reaktionsgut wird bei 40 °C innerhalb von 9 Stunden umgerührt. Die anschliessenden Arbeitsgänge werden wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Das Veresterungsprodukt wird auf der mit Silikagel gefüllten Säule unter Verwendung von Benzol-Äthylazetat-Mischung (1:1) als Eluent chromatografiert. Die Ausbeute an Produkt beträgt 30%, bezogen auf das Ausgangshormon.

Gefunden in %: C 66,41 H 7,96 Cl 10,91

$\text{C}_{35}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_4$

Berechnet in %: C 66,34 H 7,96 Cl 11,2

Beispiel 5

Herstellung von 3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (V)

4,2 g 3β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-on vermischt man mit 90 ml Trockenmethanol und gibt bei plus 5 °C 0,4 g Natriumborhydrid zu, rührt innerhalb von 1 Stunde um, säuert mittels Essigsäure bis zum Erzielen eines pH-Wertes von 6 an, dampft die Lösung ein, wäscht den Rückstand mit Wasser und trocknet über Natriumsulfat. Aus der Benzollösung erhält man 4,0 g amorphes Pulver. Die Ausbeute an Produkt beträgt 95% (bezogen auf die Ausgangsketo-verbindung).

Gefunden in %: C 67,59 H 8,25 Cl 12,88
C₃₁H₄₅Cl₂NO₃

Berechnet in %: C 67,90 H 8,16 Cl 12,95

Beispiel 6

Herstellung von 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstandiol-3β,17β (VI)

Die Herstellung dieser Verbindung erfolgt analog zu der in Beispiel 5 beschriebenen Synthese der Verbindung.

In die Reduktionsreaktion führt man 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-3-on ein. Die anschließenden Arbeitsgänge werden wie in Beispiel 5 durchgeführt.

Das Reduktionsprodukt wird auf der mit Silikagel gefüllten Säule (Benzol-Äthylazetat-Verhältnis wie 4:1) chromatografiert, wobei 3α-OH-Isomer (R_f 0,41) und 3β-OH-Isomer (R_f 0,33) enthaltende Fraktionen gesammelt werden. Die Ausbeute an β-Endisomer beträgt 67%, bezogen auf die rohe 3-Ketoverbindung.

Gefunden in %: C 67,54 H 8,26 Cl 13,03
C₃₁H₄₅Cl₂NO₃

Berechnet in %: C 67,59 H 8,25 Cl 12,88

Beispiel 7

Herstellung von 17β-[p-Di(2-bromäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VII)

Einer Lösung von 3,0 g 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophe-

nylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on in 40 ml Methyläthylketon gibt man 5,7 g Lithiumbromid (etwa 7fachen Überschuss) zu und erhitzt das Reaktionsgut bei 80 °C innerhalb von 35 Stunden. Das Lösungsmittel wird eingedampft und der Rückstand in Benzol aufgelöst. Man chromatografiert die Benzol-lösung auf der mit Aluminiumoxid gefüllten Säule und isoliert das Endprodukt als leicht aus dem Äther kristallisierbares Öl. Die Schmelztemperatur liegt zwischen 106 und 108 °C.

Die Ausbeute an Produkt beträgt 54%, bezogen auf die

10 Ausgangsverbindung.

Gefunden in %: C 58,28 H 6,79 Br 25,09
C₃₁H₄₃Br₂NO₃

Berechnet in %: C 58,38 H 6,80 Br 25,08

15 Beispiel 8

Herstellung von 17β-[p-Di(2-jodäthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on (VIII)

Einer Lösung von 5 g 17β-[p-Di(2-chloräthyl)aminophenylazetat]-5α-androstan-17β-ol-3-on in 50 ml Methyläthylketon gibt man 7,5 g Natriumjodid (etwa 6fachen Überschuss) zu und erhitzt beim Siedepunkt des Lösungsmittels (79,5 bis 80 °C) innerhalb von 72 Stunden. Nach dem Eindampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit Benzol extrahiert und auf der mit Aluminiumoxid gefüllten Säule unter Verwendung von Benzol als Eluent chromatografiert. Aus dem Benzoleluat wird eine feste Substanz isoliert, die aus dem Äther kristallisiert wird. Die Ausbeute an Produkt beträgt 3,29 g (48,5%, bezogen auf das Ausgangshormon), die Schmelztemperatur 110 bis 112 °C.

30 Gefunden in %: C 50,70 H 5,87 J 34,07
C₃₁H₄₃J₂NO₃

Berechnet in %: C 50,90 H 5,88 J 34,74

Gewerbliche Verwertbarkeit

35 Die erfindungsgemässen Steroidderivate der Androstanreihe lassen sich auf verschiedenen Gebieten der Medizin, insbesondere in der Gynäkologie und Onkologie, als Zytostatika und Antikontrazeptiva verwenden.