



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 160251 B

(21) Patentansøgning nr.: 4302/89

(51) Int.Cl.⁵ C 07 D 231/54

(22) Indleveringsdag: 31 aug 1989

(24) Løbedag: 18 jul 1983

(41) Alm. tilgængelig: 31 aug 1989

(44) Fremlagt: 18 feb 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 3296/83

(30) Prioritet: 23 jul 1982 US 401157 28 jun 1983 US 507961

(71) Ansøger: *Warner-Lambert Company; 201 Tabor Road; Morris Plains; New Jersey 07950, US

(72) Opfinder: Howard Daniel Hollis *Showalter; US, Judith L. *Johnson; US, Leslie M. *Webel; US, Edward F. *Eislager; US

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

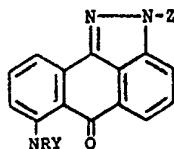
(54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af substituerede anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-oner

(56) Fremdragne publikationer

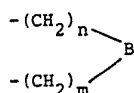
(57) Sammendrag:

4302-89

Substituerede anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-oner med
formlen



hvor R betegner H eller C₁-C₆-alkyl, Y betegner H, C₁-C₆-alkyl, der kan være substitueret med en gruppe OR₁, hvori R₁ betegner H eller C₁-C₆-alkyl, eller ANR₂R₃, hvori A er C₂-C₈-alkylen, og R₂ og R₃ hver især er H, C₁-C₆-alkyl, der kan være substitueret med OH eller en gruppe NRaRa, hvori Ra'erne hver især betegner H eller C₁-C₃-alkyl, der kan være substitueret med OH, eller R₂ og R₃ tilsammen kan være ethylen eller kan danne

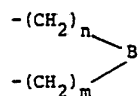


hvor n og m hver især er 1, 2 eller 3, forudsat at n + m er et helt tal fra 3 til 6, og B er en direkte binding, O, S eller N-R₄, hvori R₄ betegner H eller C₁-C₆-alkyl; R og Y tilsammen kan være ethylen eller kan danne

fortsættes

DK 160251 B

4302-89



og Z betegner H, C₁-C₆-alkyl, der kan være substitueret med en gruppe N(R₁)₂, SR₁ eller OR₁, hvori R₁'erne er ens eller forskellige, eller DNR₂R₃, hvori D er C₂-C₈-alkylen, der kan være OH-substitueret, med følgende forbehold, 1) når Z er H, danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring, og 2), når Z er CH₃, danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring eller en morpholinring, eller farmaceutisk acceptable salte heraf, fremstilles på i og for sig kendt måde.

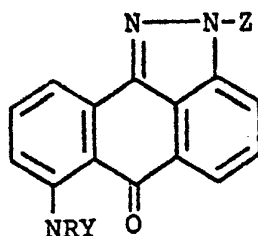
Forbindelserne har antimikrobiel virkning, antileukæmisk virkning og antitumovirkning.

Opfindelsen angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte substituerede anthra-
[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-oner med den i krav 1 anførte almene formel I eller farmaceutisk acceptable salte
5 heraf, hvilke forbindelser udviser antibiotisk og antifungal virkning, antileukæmisk virkning og anti-tumorstyrkning.

Adskillige 2,5- og 2,7-disubstituerede anthra-
[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-oner er beskrevet i den tilgænge-
10 lige litteratur. Se f.eks. J. Chem. Soc., 1630 (1952), og J. Chem. Soc., 1894 (1954). I disse og flere andre referencer er der ikke beskrevet noget nyttig anvendelighed for disse forbindelser, medens der i CH-patentskrift nr. 191.142, GB-patentskrift nr. 470.475 og US-
15 patentskrift nr. 2.518.150 kun er beskrevet anvendelighed som farvestoffer eller udgangsforbindelser herfor.

De omhandlede hidtil ukendte forbindelser har den almene formel I

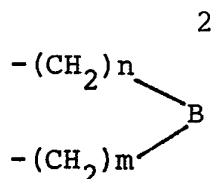
20



I

25

hvor R betegner H eller alkyl med fra 1 til 6 carbon-
atomer; Y betegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbon-
atomer, der kan være substitueret med en gruppe OR_1 ,
30 hvor R_1 betegner H eller alkyl med fra 1 til 6 carbon-
atomer, eller ANR_2R_3 , hvor A er alkyl med fra 2 til
8 carbonatomer, og R_2 og R_3 kan være ens eller forskel-
lige og hver betegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbon-
atomer, der kan være substitueret med OH eller en gruppe
35 $NRaRa$, hvor Ra 'erne kan være ens eller forskellige og
hver betegner H eller alkyl med fra 1 til 3 carbonatomer,
der kan være substitueret med OH, eller R_2 og R_3 tilsam-
men kan være ethylen eller kan danne



hvor n og m kan være ens eller forskellige og er én, to eller tre, forudsat at summen af n og m er et helt tal fra tre til seks, og B er en direkte binding, O, S eller $N-R_4$, hvor R_4 betegner H eller alkyl med fra 1 til 6 carbonatomer; R og Y tilsammen kan være ethylen eller kan danne



hvor n , m og B har de ovennævnte betydninger; Z betegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbonatomer, der kan være substitueret med en gruppe $N(R_1)_2$, SR_1 eller OR_1 , hvor R_1 'erne kan være ens eller forskellige og har den ovennævnte betydning, eller DNR_2R_3 , hvor D er alkylen med fra 2 til 8 carbonatomer, der kan være substitueret med en OH-gruppe, og R_2 og R_3 har de ovennævnte betydninger; med følgende forbehold, 1) når Z er H, danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring, og 2) når Z er CH_3 , danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring eller en morpholinring, eller er farmaceutisk acceptable salte heraf.

Som eksempler på de omhandlede forbindelser med formelen I kan der nævnes:

2-[2-(diethylamino)ethyl]-7-[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on,

2-[2-(diethylamino)ethyl]-7-[[2-(diethylamino)ethyl]-

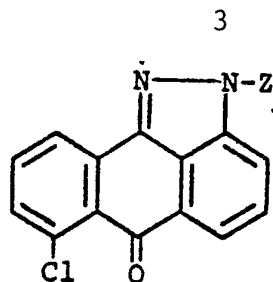
amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on,

2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-7-[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on,

og de farmaceutisk acceptable salte heraf.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendomme- lig ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel II

5



II

med en amin med formlen HNR_Y , i hvilke formler Y, Z og R har de ovennævnte betydninger.

Som eksempler på udgangsforbindelserne med form-
10 len II kan der nævnes:

7-chlor-2-[2-(diethylamino)ethyl]anthra[1,9-cd]pyrazol-
6(2H)-on,

7-chlor-2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]anthra[1,9-cd]-
pyrazol-6(2H)-on

15 og de farmaceutisk acceptable salte heraf.

Udgangsforbindelserne med formlen II kan fremstil-
les ved omsætning af en passende substitueret hydrazin,
 NH_2NHZ , hvori Z har den ovennævnte betydning, med
1,5-dichlor-9,10-anthracendion. Denne omsætning kan ud-
20 føres i et vilkårligt af flere forskellige reaktions-
indifferente opløsningsmidler ved blanding af tilnærmel-
sesvis ækvimolære mængder af 1,5-dichlor-9,10-anthracen-
dion og det ønskede hydrazin i det valgte opløsnings-
middel ved forhøjet temperatur. Ved anvendelse af en kata-
25 lysator, såsom kaliumfluorid, eller et ringe molært overskud af hy-
drazinreaktanten kan man forbedre et bestemt udbytte. Eksempler på
egnede opløsningsmidler er N,N-dimethylformamid, dimethylsulf-
oxid, pyridin, acetonitril, cellosolverne og lignende.
Pyridin er det foretrukne opløsningsmiddel, og passende
30 reaktionstemperaturer ligger fra ca. 30 til 85°C. Almin-
deligvis lader man reaktionen forløbe i ca. 6 til ca. 24
timer, efter hvilket tidsrum reaktionen er i det væsent-
lige fuldendt. Fuldendelsen af en bestemt reaktion kan
måles ved kendte metoder, som f.eks. tyndtlagschroma-
35 tografi. Man vil almindeligvis observere, at stigende
reaktionstemperatur vil formindske den til fuldendelse
af reaktionen nødvendige tid. Det rette valg af reak-
tionsvariablerne er et fagmandsspørgsmål. Reaktions-

- produkterne isoleres og renses ved sædvanlige procedurer. F.eks. kan reaktionsblandingen koncentreret ved afdampning af opløsningsmidlet, og remanensen kan fordeles mellem vand og et passende, med vand ikke blandbart organisk opløsningsmiddel, såsom chloroform, benzen, dichlormethan og lignende. Opløsningsmidlet kan derefter afdampes, og remanensen kan chromatograferes, f.eks. på silicagel. Valget af det rette chromatograferingsopløsningsmiddel er et fagmandsspørgsmål.
- 10 Efter chromatografering kan produktet om ønsket omkrystalliseres. Syreadditionssalte kan også fremstilles ved sædvanlige fremgangsmåder. F.eks. kan et hydrochloridsalt fremstilles ved opløsning af den frie base i et passende opløsningsmiddel, såsom 2-propanol, og behandling af denne opløsning med en opløsning af hydrogenchlorid i 2-propanol. Syreadditionssaltene kan igen om-
- 15 dannes til den pågældende frie base ved behandling med en fortyndet opløsning af f.eks. natriumhydroxid eller kaliumcarbonat.
- 20 Omsætningen ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan udføres i et vilkårligt af flere forskellige reaktionsindifferent opløsningsmidler ved blanding af tilnærmelsesvis ækvimolære mængder af forbindelse II og den ønskede amin i det valgte opløsningsmiddel ved forhøjet temperatur. Ved anvendelse af et ringe molært overskud af aminreaktanten, en in-
- 25 different atmosfære og en katalysator, såsom vandfrit cuprochlorid, kan man forbedre et bestemt udbytte. Anvendelsen af disse variationer til en bestemt reaktion er valgfri og er et fagmandsspørgsmål. Eksempler på
- 30 egnede opløsningsmidler er N,N'-dimethylformamid, dimethylsulfoxid, pyridin, acetonitril, cellosolverne og lignende. Passende reaktionstemperaturer ligger fra ca. 85 til 130°C. Man har observeret, at denne reaktion forløber særlig effektivt i tilbagesvalende pyridin.
- 35 Almindeligvis lader man reaktionen forløbe i ca. 6 til ca. 24 timer, efter hvilket tidsrum den er i det væsentlige fuldendt. Fuldendelsen af en bestemt reaktion kan måles ved kendte metoder, som f.eks. tyndtlags-

chromatografi. Man vil almindeligvis observere, at stigende reaktionstemperatur vil nedsætte den til fuldendelse af reaktionen nødvendige tid. Det rette valg af reaktionsvariablene er et fagmandsspørgsmål.

- 5 Reaktionsprodukterne isoleres og renses ved sædvanlige procedurer, som er i det væsentlige de samme som de for forbindelse II ovenfor beskrevne. Ligeledes kan der fremstilles syreadditionssalte af forbindelse I ved sædvanlige fremgangsmåder, såsom den ovenfor for
10 forbindelse II beskrevne.

Som det ved fremstilling af udgangsforbindelserne II benyttede hydrazin NH_2NH_2 kan der bl.a. anvendes det hidtil ukendte hydrazin, 2-[(hydrazinoethyl)amino]ethanol, $\text{NH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$. Dette hidtil ukendte hydrazin
15 kan fremstilles ved flere forskellige fremgangsmåder, der anses for ækvivalente for så vidt angår opfindelsen. En sådan fremgangsmåde indebærer omsætning af hydrazin og N-(2-hydroxyethyl)aziridin i et vandigt medium ved tilbagesvalingstemperatur. Det således fremstillede
20 hidtil ukendte 2-[(hydrazinoethyl)amino]ethanol isoleres ved sædvanlige metoder som en klar væske, der har kp. 120°C ved 0,035 mmHg. Det hidtil ukendte 2-[(hydrazinoethyl)amino]ethanol danner syreadditionssalte med organiske og uorganiske syrer, såsom saltsyre, hydro-
25 genbromidsyre, sulfonsyre, phosphonsyre, methansulfonsyre, eddikesyre, benzoesyre og lignende. For såvidt angår opfindelsen anses sådanne salte for ækvivalente med den frie baseform af det hidtil ukendte hydrazin.

- Forbindelsen 1,5-dichlor-9,10-anthracendion, der
30 anvendes til fremstilling af udgangsforbindelserne II, kan fås i handelen eller kan fremstilles ved kendte fremgangsmåder, se f.eks. Beilstein 7, 787.

De omhandlede forbindelser danner farmaceutisk acceptable salte med både organiske og uorganiske syrer. Eksempler på egnede syrer til saltdannelse er saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre, eddikesyre, 5 citronsyre, oxalsyre, malonsyre, salicylsyre, æblesyre, fumarsyre, ravsyre, ascorbinsyre, maleinsyre, methansulfonsyre, isethionsyre, mælkesyre, gluconsyre, gluconsyre, sulfaminsyre, benzoesyre, vinsyre, pamoesyre og lignende. Saltene fremstilles ved at bringe den 10 frie baseform i kontakt med en ækvivalent mængde af den ønskede syre på konventionel måde. Den frie baseform kan gendannes ved behandling af saltformen med en base. F.eks. kan der benyttes fortyndede vandige baseopløsninger. Fortyndede vandige natriumhydroxid-, kaliumcarbonat-, ammoniak- og natriumhydrogencarbonatopløsninger 15 er egnede til dette formål. De frie baseformer adskiller sig i nogen grad fra deres respektive saltformer med hensyn til visse fysiske egenskaber, såsom opløselighed i polære opløsningsmidler, men saltene er i øvrigt ækvivalente med deres respektive frie baseformer for så- 20 vidt angår opfindelsen.

De omhandlede forbindelser kan eksistere i såvel ikke-solvatiserede som solvatiserede former, herunder hydratiserede former. Almindeligvis er de solvatiserede 25 former med farmaceutisk acceptable opløsningsmidler, såsom vand, ethanol og lignende, ækvivalente med de ikke-solvatiserede former for såvidt angår opfindelsen.

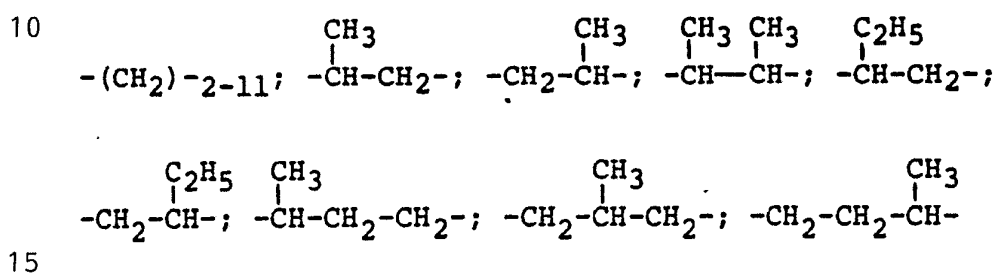
Udtrykket halogen skal omfatte fluor, chlor, brom og iod.

30 De ved opfindelsen i betragtning kommende alkyl- og alkoxygrupper omfatter, med mindre andet er angivet,

både lige og forgrenede carbonkæder med fra 1 til 6 carbonatomer. Typiske eksempler på sådanne grupper 35 er methyl, ethyl, isopropyl, butyl, pentyl, 3-methylpentyl, methoxy, ethoxy, i-propoxy, t-butoxy,

n-hexoxy, 3-methylpentoxy og lignende.

De ved opfindelsen i betragtning kommende alkylen-
grupper omfatter, med mindre andet er angivet, både
lige og forgrenede carbonkæder med fra 2 til 8
5 carbonatomer. Typiske eksempler på sådanne grupper er
ethylen, n-propylen, n-butylen, n-heptalen, i-isopro-
pylen, 3-ethyl-1,5-pentalen, 3-propyl-1,6-hexalen og
lignende. De ifølge opfindelsen foretrukne alkylen-
grupper har følgende strukturformler:



Visse ved opfindelsen i betragtning kommende
substituent, såsom alkyl- eller alkylensubstituent,
er defineret som eventuelt substitueret med yderligere
substituent, f.eks. NH_2 . Det er klart for fagmanden,
20 at visse kombinationer af sådanne substituent mest
sandsynligt er ustabile, og disse skal ikke medregnes
indenfor definitionernes rammer. F.eks. kan en α -amino-
alkyl- eller-alkylengruppe med den almene formel
 $=\text{N}-\text{CH}-\text{NH}_2$ ikke forventes at være stabil, medens den til-
25 svarende dialkylerede substituent $=\text{N}-\text{CH}-\text{N}(\text{Alk})_2$ må
forventes at være stabil og skal betragtes som omfattet
af definitionerne. Det er et fagmandsspørgsmål at er-
kende disse og andre sådanne substituent, der mulig-
vis er ustabile.

30 De omhandlede forbindelser er hidtil ukendte
kemiske stoffer af værdi som farmakologiske midler til
behandling af bakterielle og fungale infektioner hos
varmblodede dyr og mennesker. De kan også anvendes
som antiseptiske midler, såsom til anvendelse ved

sterilisering af laboratorieglassudstyr osv.

Sammenfattende kan det anføres, at de omhandlede forbindelser med formlen I finder anvendelse til behandling af mikrobielle infektioner hos mammalia-individer, 5 til behandling af leukæmi hos mammalia-individer og til behandling af faste tumorer hos mammalia-individer, idet man administrerer en tilstrækkelig mængde af en forbindelse med formlen I eller et farmaceutisk acceptabelt salt heraf i kombination med en farmaceutisk acceptabel 10 bærer til et mammalia-individ, der har behov herfor.

Den antibakterielle og antifungale virkning af repræsentative forbindelser blandt de omhandlede blev fastslået ved den nedenfor beskrevne screeningsprocedure.

15 1. Fremstilling af podematerialer

(A) Bakterier og gær:

Bakterie- og gæsisolater holdes i vækst i agar-skråkulturer eller i flydende medier, herefter betegnet som podestofmedier. Kulturerne overføres 20 med regelmæssige mellemrum til sådanne medier. (Se tabellen hvad angår de tilsvarende podestofmedier for hver kultur). Organismerne overføres almindeligvis til agar-skråkulturer eller flydende podestofmedier og inkuberes natten over (18 til 20 25 timer): 37°C for bakterieisolaterne og 28°C for de fungale kulturer.

Mikrobecellerne fra de natten over inkuberede agar-skråkulturer skrubes derefter af og suspenderes i saltopløsning (0,85% NaCl). Mikrobekoncentrationerne indstilles til en lystransmission på 30 20-35%, Junior Coleman Spectrophotometer (555 M). For organismerne, der holdes i vækst i flydende medier, fortynder man simpelthen en delmængde af kultursuspensionen med saltopløsning til en lys- 35 trasmission på 20-35%.

Den ovennævnte mikrobekonsuspension tjener som podestof for prøvepladerne. Der anvendes således 0,16 til 10 ml (se tabellen hvad angår den nøjagtige

mængde) til podning af 100 ml af smeltet-agar-prøvediet.

(B) Mycelie-fungi:

5 *Penicillium avellaneum* dyrkes i 6 dage ved 28°C på et agarmedium. Dette sker for at muliggøre sporedannelse hos kulturen. Organismen høstes derefter ved, at man skraber cellerne af agaroverfladen (mycelier og sporer) og suspenderer dem i saltopløsning indeholdende 0,05% Tween® 80.

10 Suspensionen indstilles til en lystransmission på 20%. 1 ml af denne suspension anvendes til podning af 100 ml af smeltet-agar-prøvediet.

2. Fremstilling af prøveplader.

15 Rustfri stålrammer, 12,3 x 25,3 cm (indre mål), og glasplader, 15,3 x 31,7 cm, anvendes til at fremstille prøvebakkerne. Rammerne fastgøres til pladerne ved hjælp af klæbebånd ved hver ende, og de indre kanter tætnes med 2% agar. Man fordeler 25 ml podet prøvediet jævnt på hver bakke og lader det størkne. Man tildækker bakkerne, vender bunden i vejret på dem og nedkøler dem, indtil de skal anvendes.

3. Anbringelse af papirskiver med prøvestoffer.

25 De forbindelser eller prøvestoffer, der skal afprøves, opløses i passende opløsningsmidler, f.eks. alkoholer, dimethylsulfoxid eller N,N-dimethylformamid. Prøvestofferne opløses almindeligvis således, at slutkoncentrationen af opløsningsmidlet er <10%.* Forbindelserne afprøves ved forskellige koncentrationer: 3000, 1000, 500, 100 og 10 µg/ml. Papirskiver (12,7 mm i diameter) anbringes på agarbakkerne med en pincet, og derefter afpipetteres der 0,08 ml af den opløste forbindelse på hver skive under anvendelse af en 0,2 ml pipette. (* Hvis forbindelsen ikke forbliver i opløsning ved <10% alkohol, anvendes der alkohol af fuld styrke. Dog lufttørres de imprægnerede skiver, før de lægges på de podede agarplader).

4. Fortolkning af resultaterne.

Agarbakkerne med de derpå anbragte papirskiver inkuberes natten over (18 til 20 timer) ved 37°C for bakteriekulturerne og 28°C for gærsvampene.

- 5 Bakken med *Penicillium avellaneum* inkuberes i mindst 20 til 24 timer, da det er en langsommere voksende organisme. Aktive forbindelser viser en hæmningszone omkring skiven. Diameteren af zonen måles i mm. Zonediameteren for aktive forbindelser ligger i området fra et minimum på 13,5 mm til så meget som 60 mm. Størrelsen af zonediameteren er almindeligvis et udtryk for aktiviteten af forbindelsen: jo større zonen er, desto større er aktiviteten.

15

Tabel

	Kultur	Nummer	Podestofmedium	Podestofmængde ml/100 ml	Prøve- medium
20	<u>Aerobacter aerogenes</u>	0126	Kalveinfusions- broth	1	Mytin-Agar
	<u>Escherichia coli</u>	04863	AM-08 Agar	1	AM-08
25	<u>Bacillus subtilis</u>	04555	AM-08 Broth	0,5	AM-08
	<u>Streptococcus faecalis</u>	05045	Folsyre-prøve- broth	2	AM-09
30	<u>Penicillium avellaneum</u>	M2988	AM-25 Agar	1	AM-25

5. Kulturmedier.

- 35 Sammensætningen af de forskellige kulturmedier, med undtagelse af de i handelen gående medier, er anført nedenfor. Det kommercielle færdiglavede kalveinfusionsmedium fås fra Difco Labora-

tories, Detroit, Michigan, USA. Der tilsættes 1,5% agar til disse medier til anvendelse som agarplader.

<u>AM-08</u>		%
5	Glucose	0,2
	Natriumglutamat	1,04
	KH_2PO_4	0,03
	Na_2HPO_4	0,07
	Salte nr. 1 ^a	1 ml
10	Salte nr. 2 ^b	10 ml
	H_2O (destilleret)	
<u>^aSalte nr. 1</u>		%
	MgSO_4	1,0
15	CaCl_2	5,0
	NaCl	5,0
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
	H_2O (destilleret)	
<u>^bSalte nr. 2</u>		%
	MnSO_4	1,0
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
	H_2O (destilleret)	
20	<u>AM-09</u>	
	K_2HPO_4	3,9 g
	Dextrose	25 g
	Na-citrat $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	34,4 g
	Casein-hydrolysat	6,2 g
25	Asparagin	375 mg
	L-tryptophan	125 mg
	Cystein	312,5 mg
	Glutathion	3,1 mg
	Thiamin-HCl	250 g
30	Riboflavin	625 g
	Ca-pantothenat	500 g
	Nicotinsyre	500 g
	p-aminobenzoesyre	625 g
	Biotin	12,5 g
35	Pyridoxin-HCl	2,5 g
	Folsyre	500 g
	NaCl	12,5 g
	MgSO_4	250 g

12

FeSO ₄	12,5 g
MnSO ₄ · H ₂ O	125 g
Tween ® 80	62,5 mg
H ₂ O (destilleret)	1000 ml
5	
<u>AM-25</u>	%
Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O	0,35
KH ₂ PO ₄	0,05
Gærekstrakt (Difco)	0,5
10 Dextrose	1,0
Destilleret vand	

Foruden deres nyttige anvendelighed som anti-
biotiske og antifungale midler udviser visse af de
15 omhandlede forbindelser antileukæmisk virkning in vivo,
når de afprøves ved følgende procedure.

In-vivo-lymfocytisk-leukæmi P388 prøven udføres
af United States National Cancer Institute. De anvendte
dyr er enten hanlige eller hunlige CD₂F₁ mus. Der an-
20 vendes seks til syv dyr pr. prøvegruppe. Tumortrans-
plantationen sker ved intraperitoneal injektion af
fortyndet ascitesvæske, som indeholder celler af lym-
focytisk leukæmi P388. Prøveforbindelserne administre-
res intraperitonealt i to enkeltdoser med fire dages mellemrum
25 mellem doser ved forskellige dosisniveauer efter tumor-
indpodningen. Dyrene vejes, og antallet af overlevende
dyr registreres på et regelmæssigt basis i 30 dage.
Der beregnes et overlevelsestidsforhold for behandlede
(T)/kontrol (C) dyr. Kriteriet for effektivitet er,
30 at $T/C \times 100 > 125\%$. Den positive kontrolforbindelse
ved denne prøve er 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[2-[(2-hy-
droxyethyl)amino]-ethyl]amino]-9,10-anthracendion,
der indgives i doser i området fra 12,0 til 0,075 mg/kg.
Se Cancer Chemotherapy Reports, Part 3, 3, 1 (1972) med
35 hensyn til en omfattende redegørelse for protokollen.

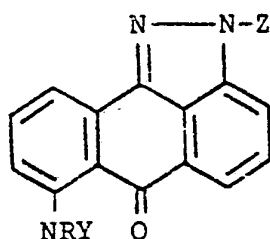
Foruden deres nyttige anvendelighed som anti-
biotiske og antifungale midler og som antileukæmiske
midler udviser visse af de omhandlede forbindelser

in-vitro-virkning mod faste tumorer, når de afprøves ved følgende procedure.

- HCT-8 (human colon-adenocarcinoma) celler trypsiniseres under anvendelse af trypsin-EDTA. En enkeltcellesuspension opnås ved at passere cellerne gennem en 26 gauge nål med en 20 cm³ sprøjte. Der fremstilles en cellesuspension under anvendelse af RPMI 1640 vækstmedium (fås fra Gibco Laboratories) + 10% kalvefoster-serum + 50 µg/ml garamycin med en cellekoncentration på ca. 30000 celler/ml. Cellesuspensionen dispenseres i Linbro-plader med 24 brønde, 1 ml/brønd. Pladerne inkuberes i ca. 48 timer ved 37°C i en 5% CO₂-atmosfære. På dette tidspunkt tilsættes prøveforbindelserne i den rette koncentration. 5 µl af 200 µg/ml stamopløsningen sættes til hver brønd ved en primær prøve. 10 µl af den rette fortynding sættes til hver brønd til en titreringsprøve. Pladerne reinkuberes i yderligere 60 til 65 timer ved 37°C i en 5% CO₂-atmosfære. Prøven aflæses ved lysering af cellerne under anvendelse af en blanding af kationisk overfladeaktivt middel, iseddike og natriumchlorid. 2 ml af den lyserede cellesuspension fra hver brønd sættes til 8 ml fortyndingsmiddel. Hver prøve aflæses med en Coulter-tæller (ZBI model). Aktiviteten af hvert prøvestof måles som en procentdel af kontrolværdierne, og dataene rapporteres som ID₅₀, dvs. den molære mængde medikament, der kræves til dræbning af 50% af tumorcellerne.

- Under anvendelse af denne procedure opnåedes der følgende resultater for repræsentative forbindelser blandt de omhandlede.

14



5

	Z	NRY	ID ₅₀ Molar
10	(CH ₂) ₂ NEt ₂ • 2HCl	NH(CH ₂) ₂ NEt ₂	2,2 x 10 ⁻⁷
	(CH ₂) ₂ NEt ₂ • 2HCl	NH(CH ₂) ₂ NH(CH ₂) ₂ OH	9,3 x 10 ⁻⁸

15 Når de omhandlede forbindelser anvendes som anti-
biotiske og antifungale midler, kan de tilberedes og
administreres i mange forskellige topiske, orale og
parenterale doseringsformer. Det vil være klart for
fagmanden, at de følgende doseringsformer som den ak-
20 tive komponent kan omfatte enten en forbindelse med
formlen I eller et farmaceutisk acceptabelt salt af en
sådan forbindelse eller en blanding af sådanne forbin-
delser og/eller salte.

Til fremstilling af farmaceutiske præparater
25 ud fra de omhandlede forbindelser kan indifferente,
farmaceutisk acceptable bærere være enten faste eller
flydende. Af præparater i fast form kan der nævnes
pulvere, tabletter, dispergerbare granulater, kapsler,
cachetter og suppositorier. En fast bærer kan være
30 ét eller flere stoffer, der også kan virke som for-
tyndingsmidler, smagsstoffer, opløseliggørende midler,
smøremidler, suspensionsmidler, bindemidler eller tab-
letdesintegreringsmidler, og det kan også være et
indkapslende materiale. I pulvere er bæreren et fin-
35 delt fast stof, som foreligger i blanding med den
findelte aktive forbindelse. I tabletten er den aktive
forbindelse blandet med en bærer med de nødvendige
bindende egenskaber i passende mængdeforhold og kompri-

meret til den ønskede form og størrelse. Pulverne og tabletterne indeholder fortrinsvis fra 5 eller 10 til ca. 70% af den aktive bestanddel. Egnede faste bærere er magnesiumcarbonat, magnesiumstearat, talkum, sukker, 5 lactose, pectin, dextrin, stivelse, gelatine, tragacanth, methylcellulose, natriumcarboxymethylcellulose, en lavtsmeltende voks, kakaosmør og lignende. Udtrykket "præparat" skal indbefatte formuleringen af den aktive forbindelse med indkapslende materiale som bærer til 10 opnåelse af en kapsel, hvori den aktive komponent (med eller uden andre bærere) er omgivet af bæreren, som således optræder i tilknytning til den. På tilsvarende måde er cachetter indbefattet. Tabletter, pulvere, cachetter og kapsler kan anvendes som faste doserings- 15 former, der er egnede til oral administrering.

Præparater i flydende form indbefatter opløsninger, suspensioner og emulsioner. Som eksempel kan der nævnes vandige eller vand-propylenglycol-opløsninger til parenteral injektion. Flydende præparater kan også 20 formuleres i opløsning i vandig polyethylenglycolopløsning. Vandige opløsninger, der er egnede til oral anvendelse, kan fremstilles ved opløsning af den aktive komponent i vand og tilsætning af passende farvestoffer, smagsstoffer, stabiliseringsmidler og fortykkelses- 25 midler, som det nu ønskes. Vandige suspensioner, der er egnede til oral anvendelse, kan fremstilles ved at dispergere den findelte aktive komponent i vand med et viskøst materiale, dvs. naturlige eller syntetiske gummier, harpikser, methylcellulose, natriumcarboxy- 30 methylcellulose og andre velkendte suspensionsmidler.

Af topiske præparater kan der nævnes pudringspulvere, cremer, lotioner, geler og sprays. Disse forskellige topiske præparater kan formuleres ved hjælp af velkendte metoder. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences, kapitel 43, 14. udgave 1970, Mack 35 Publishing Co., Easton Pennsylvania 18042, USA.

Det farmaceutiske præparat er fortrinsvis i enhedsdosisform. I denne form underopdeles præparatet

i enhedsdoser, der indeholder passende mængder af den aktive komponent. Enhedsdosisformen kan være et emballeret præparat, idet emballagen indeholder adskilte mængder præparat, f.eks. emballerede tabletter, kapsler og pulvere i medicinglas eller ampuller. Enhedsdosisformen kan også være en kapsel, cachet eller tablet i sig selv, eller det kan være et passende antal af enhver af disse i emballeret form.

Mængden af aktiv forbindelse i en præparat-
10 enhedsdosis kan varieres eller reguleres fra 50 mg til 500 mg alt efter den bestemte anvendelse og styrken af den aktive bestanddel.

Til terapeutisk anvendelse som antibiotiske og antifungale midler administreres de omhandlede forbindelser med formlen I i en begyndelsesdosis på ca. 0,1 mg til ca. 50 mg pr. kg. Et dosisområde fra ca. 0,5 mg til ca. 10 mg pr. kg foretrækkes. Doserne kan imidlertid varieres afhængigt af patientens behov, alvorligheden af den tilstand, der behandles, og den forbindelse, der anvendes. Bestemmelsen af den rette dosis til en bestemt situation er et fagmandsspørgsmål. Almindeligvis startes behandlingen med lavere doser, som er mindre end den optimale dosis af forbindelsen. Derefter forøges dosen i små spring, indtil man når den optimale virkning under de pågældende omstændigheder. Af bekvemmelighedsgrunde kan den totale daglige dosis om ønsket opdeles og administreres i portioner i løbet af dagen.

De aktive forbindelser kan også administreres parenteralt eller intraperitonealt. Opløsninger af den aktive forbindelse som en fri base eller et farmaceutisk acceptabelt salt kan tilberedes i vand, der hensigtsmæssigt er blandet med et overfladeaktivt stof, såsom hydroxypropylcellulose. Dispersioner kan også fremstilles i glycerol, flydende polyethylenglycoler og blandinger heraf og i olier. Under sædvanlige op-
35 lagrings- og anvendelsesbetingelser indeholder disse præparater et konserveringsmiddel til forhindring af væksten af mikroorganismer.

De farmaceutiske former, der er egnede til injektionsanvendelse, indbefatter sterile vandige opløsninger eller dispersioner og sterile pulvere til fremstilling af sterile injektionsopløsninger eller
5 -dispersioner på bestilling. I alle tilfælde må formen være steril og må være flydende i en sådan grad, at den let kan administreres gennem en sprøjte. Den må være stabil under fremstillings- og oplagringsbetingelserne og må beskyttes mod den kontaminerende virkning
10 af mikroorganismer, såsom bakterier og fungi. Bæreren kan være et opløsningsmiddel eller dispersionsmedium, der f.eks. indeholder vand, ethanol, polyol (f.eks. glycerol, propylenglycol og flydende polyethylenglycol og lignende), passende blandinger heraf og vegetabil-
15 ske olier. Den rette fluiditet kan f.eks. opretholdes ved anvendelse af et overtræk, såsom lecithin, ved opretholdelse af den krævede partikelstørrelse i tilfælde af en dispersion og ved anvendelse af overfladeaktive stoffer. Forhindringen af virkningen af mikro-
20 organismer kan opnås ved hjælp af forskellige antibakterielle og antifungale midler, f.eks. parabener, chlorbutanol, phenol, sorbinsyre, thimerosal og lignende. I mange tilfælde vil det være hensigtsmæssigt at inkorporere isotoniske midler, f.eks. sukkerarter eller
25 natriumchlorid. Protraheret absorption af injektionspræparaterne kan opnås ved i præparaterne at anvende absorptionsforsinkende midler, f.eks. aluminiummonostearat og gelatine.

Sterile injektionsopløsninger fremstilles ved at
30 inkorporere den aktive forbindelse i den nødvendige mængde i det pågældende opløsningsmiddel med forskellige af de øvrige ovenfor opremsede bestanddele efter behov, efterfulgt af sterilisering ved filtrering. Almindeligvis fremstilles dispersioner ved at inkor-
35 porere de forskellige steriliserede aktive bestanddele i en steril bærer, der indeholder det grundlæggende dispersionsmedium og de øvrige krævede bestanddele blandt de ovenfor opremsede. I tilfælde af sterile

pulvere til fremstilling af sterile injektionsopløsninger er de foretrukne fremstillingsmetoder vakuumtørring og frysetørringsmetoden, hvorved der opnås et pulver af den aktive bestanddel plus enhver yderligere 5 ønsket bestanddel ud fra en i forvejen sterilfiltreret opløsning deraf.

Som anvendt heri omfatter "farmaceutisk acceptabel bærer" ethvert og alle opløsningsmidler, dispersionsmedier, overtræksmidler, antibakterielle og 10 antifungale midler, isotoniske og absorptionsforsinkende midler og lignende. Anvendelsen af sådanne medier og midler til farmaceutisk aktive stoffer er velkendt på området. Bortset fra de tilfælde, hvor konventionelle medier eller midler er uforligelige med den 15 aktive bestanddel, skal deres anvendelse i de terapeutiske præparater tages i betragtning. Supplerende aktive bestanddele kan også inkorporeres i præparaterne.

Det er særlig fordelagtigt at formulere parenterale 20 præparater i enhedsdosisform for at lette administreringen og opnå ensartede doser. Enhedsdosisform som anvendt heri refererer til fysisk adskilte enheder, der er egnede som enhedsdoser til de mammalia-individer, der skal behandles, idet hver enhed indeholder 25 en forudbestemt mængde aktivt materiale, beregnet til at frembringe den ønskede terapeutiske virkning sammen med den nødvendige farmaceutiske bærer. Specifikationen for de på opfindelsen baserede enhedsdosisformer dikteres af og afhænger direkte af (a) det 30 aktive materiales unikke egenskaber og den særlige terapeutiske virkning, der skal opnås, og (b) den naturlige begrænsning med hensyn til at sammensætte et sådant aktivt materiale til sygdomsbehandling af levende individer med en sygdomstilstand, ved hvilken 35 sundhedstilstanden svækkes, som nærmere beskrevet heri.

Den væsentlige aktive bestanddel sammensættes med henblik på bekvem og effektiv administrering i

effektive mængder med en egnet farmaceutisk acceptabel bærer til en enhedsdosisform som beskrevet ovenfor. En enhedsdosisform kan f.eks. indeholde den væsentlige aktive forbindelse i mængder i området fra ca. 0,1 til 5 ca. 500 mg, idet fra ca. 0,5 til ca. 250 mg foretrækkes. Udtrykt i mængdeforhold er den aktive forbindelse almindeligvis til stede i fra ca. 0,1 til ca. 500 mg/ml af bærer. I tilfælde af præparater, der indeholder supplerende aktive bestanddele, bestemmes doserne under 10 hensyn til den sædvanlige dose og administreringsmåden for de nævnte bestanddele. De daglige parenterale doser for mammalia-individer, der skal behandles, ligger i området fra 0,1 mg/kg til 100 mg/kg. Den foretrukne daglige dosis ligger i området fra 0,3 mg/kg til 10 15 mg/kg.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

20 2-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-[[2[(2-hydroxyethyl)amino]-ethyl]amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on.

Ved omsætning af 2,5 g (7 mmol) 7-chlor-2-[2-(diethylamino)ethyl]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on, 7 ml (70 mmol) 2-(2-aminoethylamino)ethanol og 20 ml 25 pyridin i 20 timer under tilbagesvaling og derefter afkøling og koncentreret og derpå tritureret af den faste remanens med koldt 2-propanol opnås 1,6 g af et fast stof, smp. 104-107°C efter omkrystallisation af toluen. Ved opløsning i varmt 2-propanol og derefter 30 behandling med overskud af hydrogenchlorid i 2-propanol opnås 1,6 g af det tørrede produkt som et salt med 2,0 ækvivalenter hydrogenchlorid og solvatiseret med 1,1 ækvivalent vand, smp. 212-216°C (dekomponering).

7-Chlor-2-[2-(diethylamino)ethyl]anthra[1,9-cd]- 35 pyrazol-6(2H)-on fremstilles som følger:

En blanding af 13,85 g (50 mmol) 1,5-dichlor-9,10-anthracendion, 13,1 g (100 mmol) (2-diethylamino-ethyl)hydrazin og 100 ml pyridin omrøres ved 50°C i

5 timer, behandles med yderligere 10 ml af udgangs-
hydrazinen, omrøres ved 35°C i 48 timer, afkøles, fil-
treres og koncentrerres. Ved triturering af remanensen
med 2-propanol:ethanol opnås 8 g af et fast pulver,
5 smp. 129-132°C. Ved opløsning af en 0,9 g prøve i
varmt methanol og derefter saltdannelse som beskrevet
i det foregående afsnit opnås 0,8 g af det tørrede pro-
dukt som et salt med 1,0 ækvivalent hydrogenchlorid,
smp. 272-275°C (dekomponering).

10

Eksempel 2

2-[2-(Diethylamino)ethyl]-7-[[2-(diethylamino)ethyl]-
amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on.

Ved omsætning af en blanding af 2,1 g (6 mmol)
15 7-chlor-2-[2-(diethylamino)ethyl]anthra[1,9-cd]pyrazol-
6(2H)-on, 5 ml (36 mmol N,N-diethylethylendiamin og
20 ml pyridin i 28 timer under tilbagesvaling og der-
efter oparbejdning og saltdannelse som beskrevet i
eksempel 1 opnås 1,9 g af det tørrede produkt som et
20 salt med 2,0 ækvivalenter hydrogenchlorid og solvatiseret
med 0,2 ækvivalenter vand, smp. 292-294°C (dekomponere-
ring).

Eksempel 3

25 2-[2-[(2-Hydroxyethyl)amino]ethyl]-7-[[2-[(2-hydroxy-
ethyl)amino]ethyl]amino]anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on.

En blanding af 1,9 g (5 mmol) 7-chlor-2-[2-
[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]anthra[1,9-cd]pyrazol-
6(2H)-on, 2,0 ml (20 mmol) 2-(2-aminoethylamino)etha-
30 nol og 20 ml pyridin opvarmes under tilbagesvaling i
72 timer. Blandingen afkøles, koncentrerres og chroma-
tograferes på silicagel med 0,5% triethylamin i di-
chlormethan, idet der anvendes gradienteluering med
2 til 10% methanol, til opnåelse af produktet. Ved
35 saltdannelse som beskrevet i eksempel 1 opnås 500 mg
af produktet som et salt med 2,0 ækvivalenter hydrogen-
chlorid og solvatiseret med 0,4 ækvivalenter vand,
smp. 285-287°C (dekomponering).

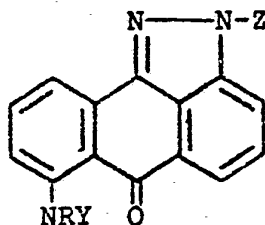
7-Chlor-2-[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]-anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-on fremstilles som følger:

En blanding af 11,1 g (40 mmol) 1,5-dichlor-9,10-anthracendion, 13,1 g (110 mmol) 2-[(hydrazino-
5 ethyl)amino]ethanol, 4 g vandfrit kaliumhydrogencarbonat, 1 g vandfrit kaliumfluorid og 110 ml dimethylsulfoxid omrøres ved 70°C natten over. Blandingen afkøles, og det faste stof opsamles ved filtrering og vaskes med vand og derefter grundigt med acetonitril
10 til opnåelse af en remanens, som krystalliseres af 2-propanol til opnåelse af 2,6 g produkt. Hydrochloridsaltet fremstilles som beskrevet i eksempel 1, smp. 272-273°C (dekomponering).

P A T E N T K R A V

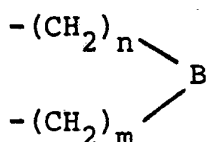
Analogifremgangsmåde til fremstilling af substituerede anthra[1,9-cd]pyrazol-6(2H)-oner med den almene formel I

5

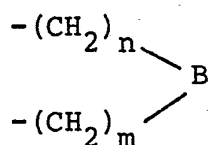


I

- 10 hvori R betegner H eller alkyl med fra 1 til 6 carbon-
 atomer; Y betegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbon-
 atomer, der kan være substitueret med en gruppe OR_1 ,
 hvori R_1 betegner H eller alkyl med fra 1 til 6 carbon-
 atomer, eller ANR_2R_3 , hvori A er alkylen med fra 2 til
 15 8 carbonatomer, og R_2 og R_3 kan være ens eller forskel-
 lige og hver betegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbon-
 atomer, der kan være substitueret med OH eller en gruppe
 $NRaRa$, hvori Ra 'erne kan være ens eller forskellige og
 hver betegner H eller alkyl med fra 1 til 3 carbonatomer,
 20 der kan være substitueret med OH, eller R_2 og R_3 tilsam-
 men kan være ethylen eller kan danne

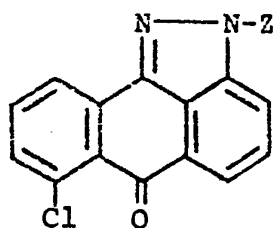


- 25 hvori n og m kan være ens eller forskellige og er én,
 to eller tre, forudsat at summen af n og m er et helt
 tal på fra tre til seks, og B er en direkte binding,
 O, S eller $N-R_4$, hvori R_4 betegner H eller alkyl med
 fra 1 til 6 carbonatomer; R og Y tilsammen kan være
 30 ethylen eller kan danne



- hvori n og m og B har de ovennævnte betydninger; Z be-
 35 tegner H, alkyl med fra 1 til 6 carbonatomer, der kan
 være substitueret med en gruppe $N(R_1)_2$, SR_1 eller OR_1 ,

hvor R_1 'erne er ens eller forskellige og har den ovennævnte betydning, eller DNR_2R_3 , hvor D er alkylen med 2 til 8 carbonatomer, der kan være substitueret med en OH-gruppe, og R_2 og R_3 har de ovennævnte betydninger, med følgende forbehold, 1) når Z er H, danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring, og 2) når Z er CH_3 , danner R og Y tilsammen ikke en piperidinring eller en morpholinring, eller farmaceutisk acceptable salte heraf, kendetegnet ved, at man omsætter en forbindelse med den almene formel II



II

15

med en amin med formelen HNR_Y , i hvilke formler Y , Z og R har de ovennævnte betydninger.