



CH 681 153 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 681 153 A5

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>: C 07 J 9/00  
C 07 F 9/09  
A 61 K 31/575  
A 61 K 31/66

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

⑫ PATENTSCHRIFT A5

<p>⑰ Gesuchsnummer: 257/91</p> <p>⑳ Anmeldungsdatum: 27.01.1992</p> <p>㉔ Patent erteilt: 29.01.1993</p> <p>④⑤ Patentschrift veröffentlicht: 29.01.1993</p>	<p>⑦③ Inhaber: Marigen S.A., Riehen</p> <p>⑦② Erfinder: Eugster, Carl, Dr., Riehen Eugster, Conrad Hans, Prof. Dr., Wallisellen Haldemann, Walter, Dr., Binningen Rivara, Giorgio, Prof. Dr., Torino (IT)</p> <p>⑦④ Vertreter: Dr. Walter Haldemann, Riehen</p>
--	---

⑤④ **Neue Sterolester- und Sterolphosphorverbindungen.**

⑤⑦ Es werden neue Sterolester und Sterolphosphorverbindungen mit antitumorale Wirkung, Verfahren zu ihrer Herstellung und zur Bildung von spontan dispergierbaren Mitteln, sowie Methoden zur Entwicklung von therapeutischen Systempräparaten mit diesen Mitteln beschrieben.



CH 681 153 A5

**Beschreibung**

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Sterolester und Sterolphosphatide mit antitumorale Wirkung, Verfahren zu ihrer Herstellung und spontan dispergierbare Mittel mit diesen Estern und Phosphatiden.

5 In der CH-Patentschrift No. 678 276-0 werden die aus den Extrakten der Samen der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.) und gewisser Kürbisarten (*Cucurbita pepo* L. und *Cucurbita maxima* Duch.) gewonnenen Sterole, deren Glucoside und deren Fettsäureester, wie auch die mit diesen Verbindungen hergestellten, spontan dispergierbaren Mittel und überdies ihre Verwendung zur Bekämpfung von Tu-

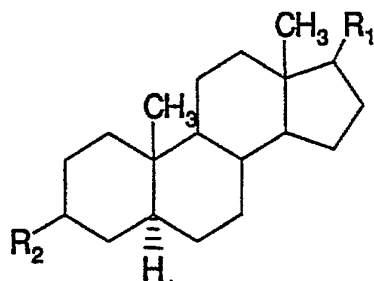
10 moren beschrieben.  
Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass die neu synthetisierten Sterolester und Sterolphosphatide ebenfalls eine ganz ausgeprägte antitumorale Wirkung aufweisen, insbesondere dann, wenn diese Verbindungen in spontan dispergierbare Konzentrate eingearbeitet worden sind.

**BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG**

15

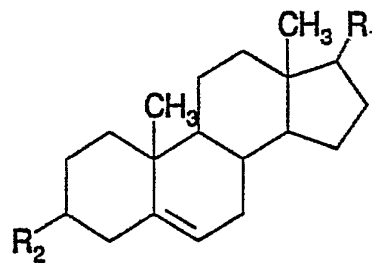
Die neuen Sterolester und Sterolphosphorverbindungen entsprechen den allgemeinen Formeln (I) bis (XV):

20



(I)

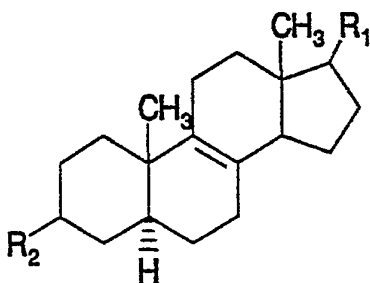
25



(II)

30

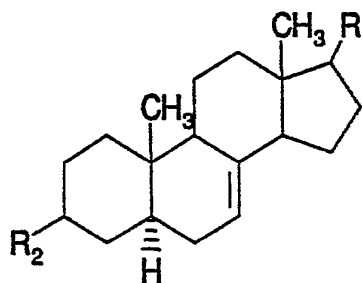
35



(III)

40

45



(IV)

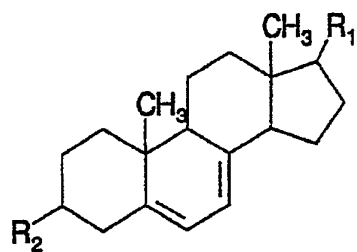
50

55

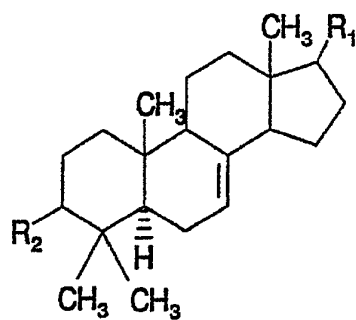
60

65

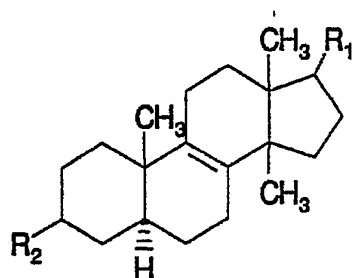
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65



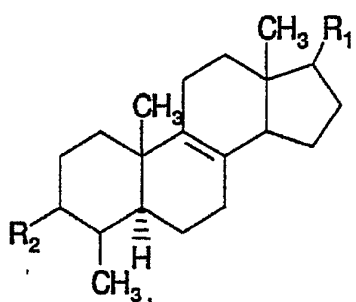
(V)



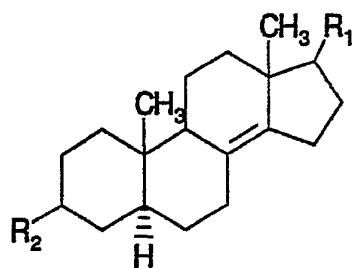
(VI)



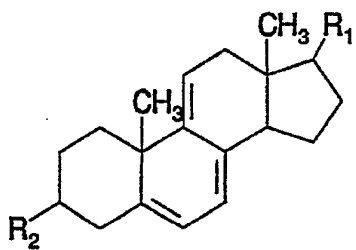
(VII)



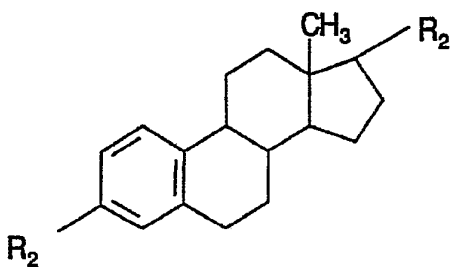
(VIII)



(IX)



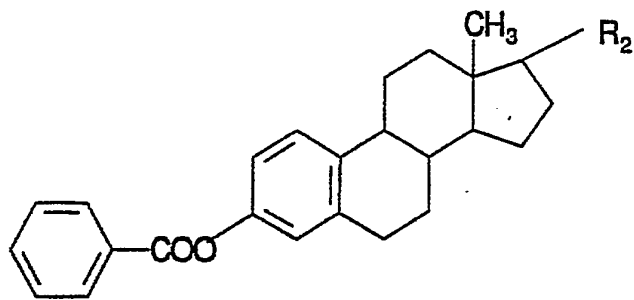
(X)



(XI)

5

10

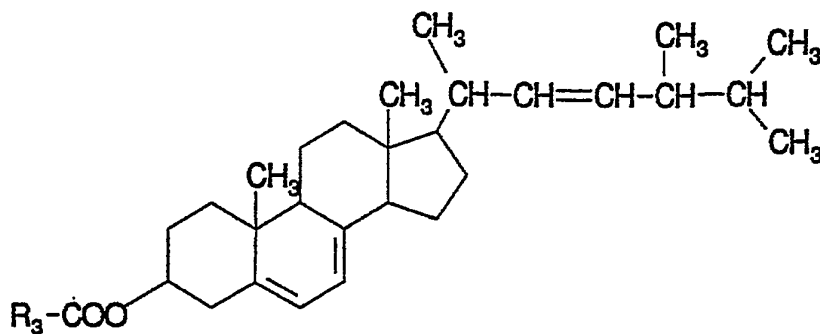


(XII)

15

20

25



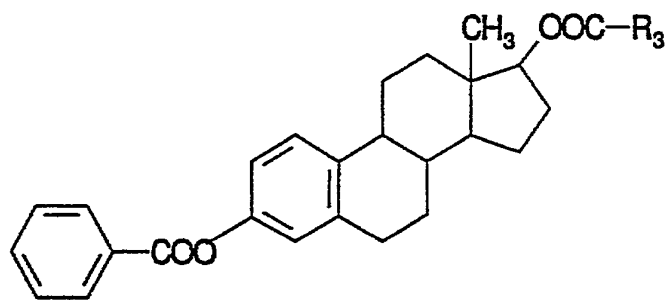
(XIII)

30

35

40

45

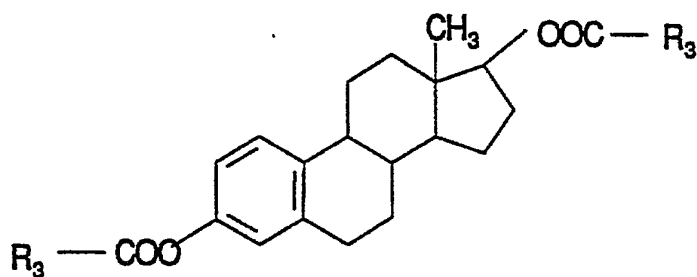


(XIV)

50

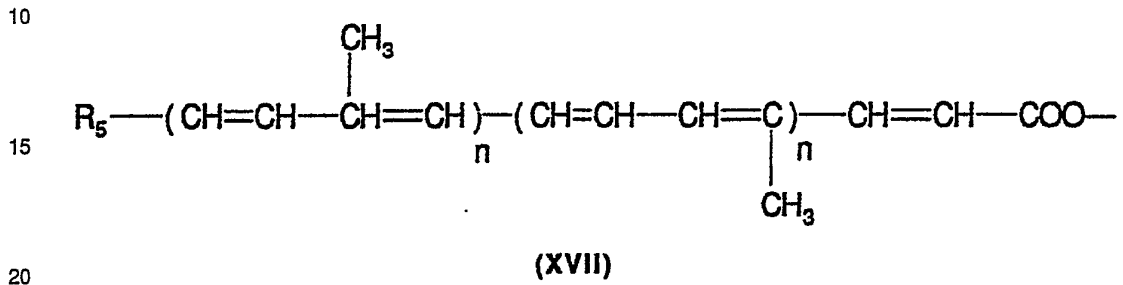
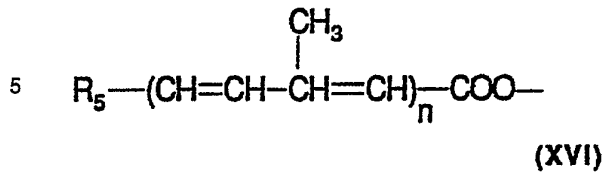
55

60

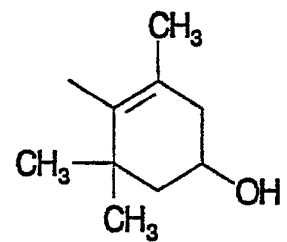
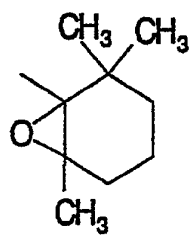
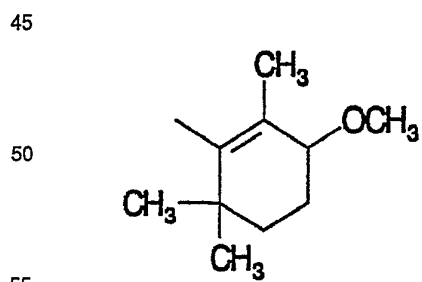
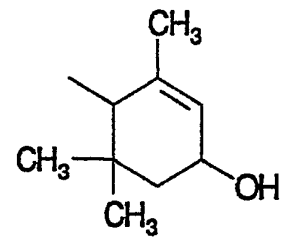
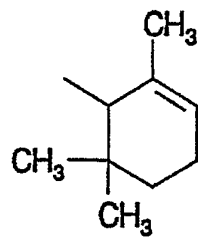
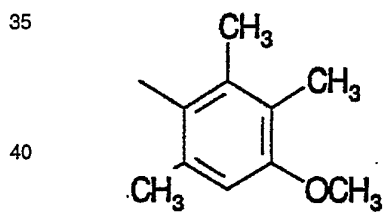
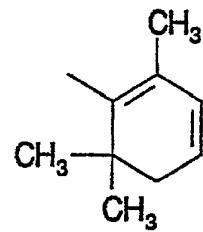
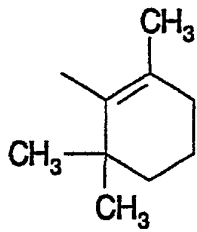
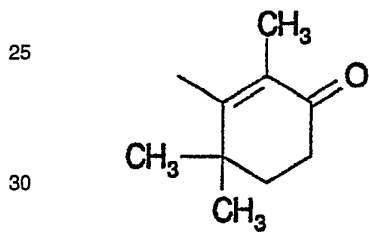


(XV)

wobei in den Formeln (I) bis (X) das Radikal R<sub>1</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkenyl-  
 65 gruppe und das Radikal R<sub>2</sub> in den Formeln (I) bis (XII) eine Gruppe der Formeln (XVI) und (XVII) ist:

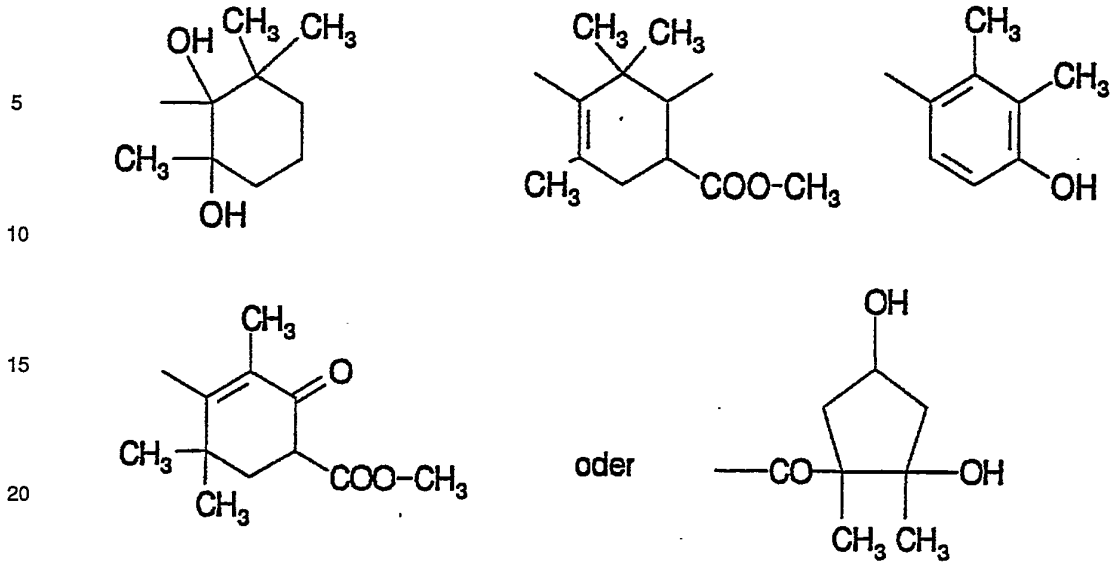


worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bezeichnet und R<sub>5</sub> für die Radikale der Formeln:

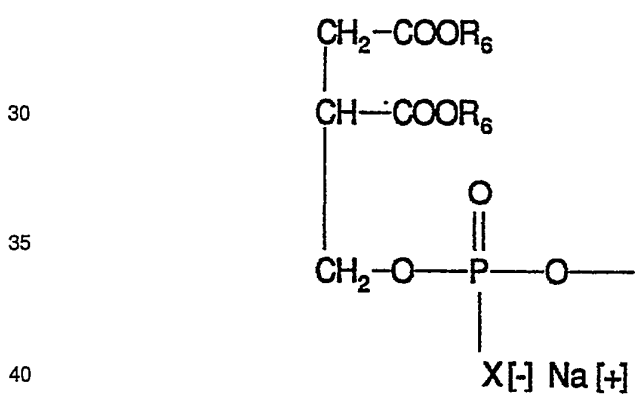


60

65



steht oder aber die Gruppe gemäss Formel (XVIII) meint:



(XVIII)

45 in welcher  $R_6$  eine  $C_1$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe und X Sauerstoff oder Schwefel bedeuten, und wobei  $R_3$  in den Formeln (XIII) bis (XV) für eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkylgruppe oder eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe (d.h. die entsprechenden Alkadiene, Alkatriene, Alkatetraene, Alkapentaene, Alkahexaene oder Alka-heptaene) steht.

50 Die Seitenketten bei  $R_1$ ,  $R_3$  und  $R_6$  können geradkettig oder verzweigt sein. Bei  $R_1$  haben die Alkyl- und die Alkenylgruppen vorzugsweise 8 bis 10 Kohlenstoffatome.

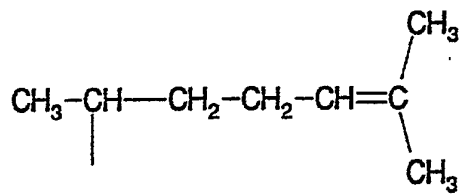
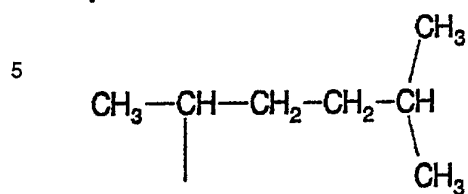
Beispiele solcher Alkyl- oder Alkenyl-Gruppen sind u.a.:

55

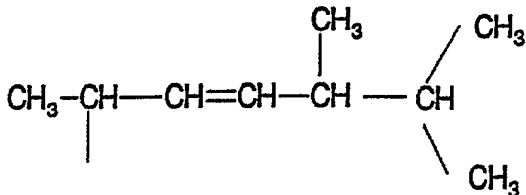
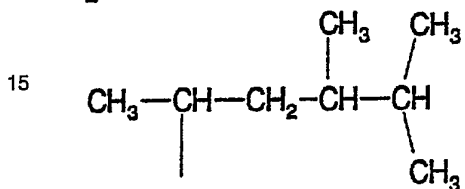
60

65

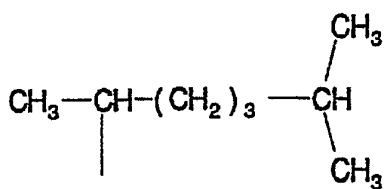
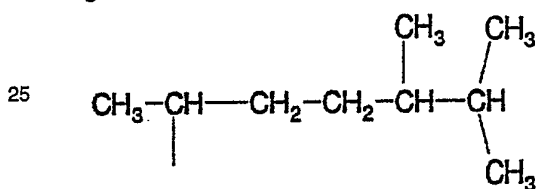
1



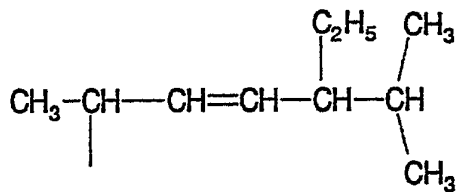
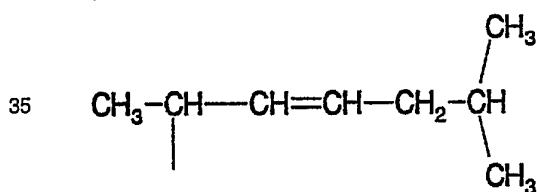
2



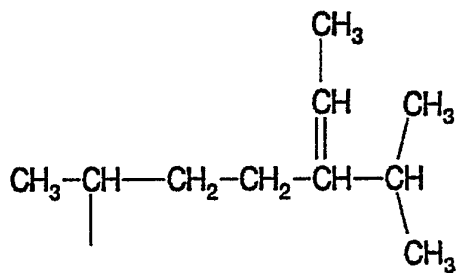
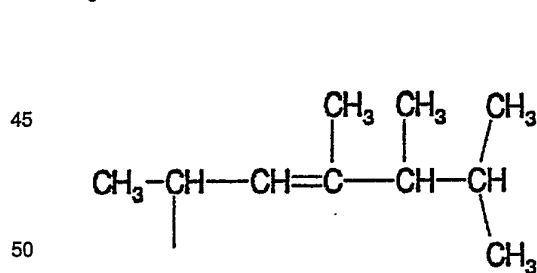
3



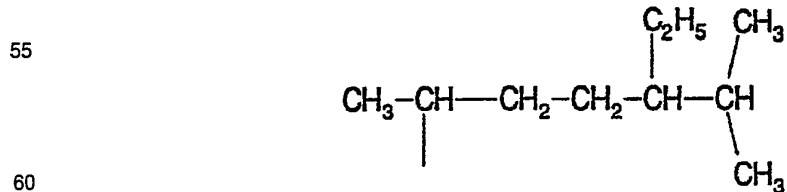
4



5

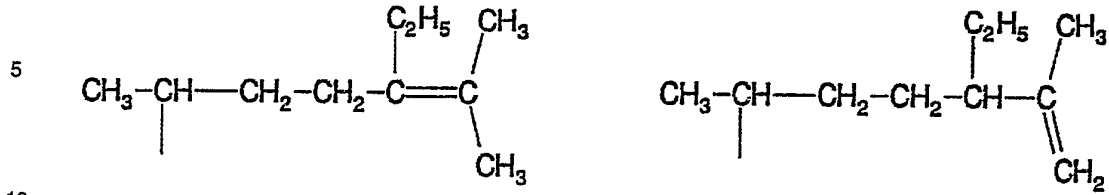


6



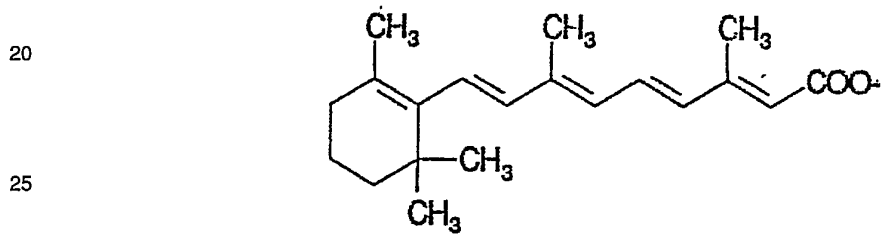
65

7

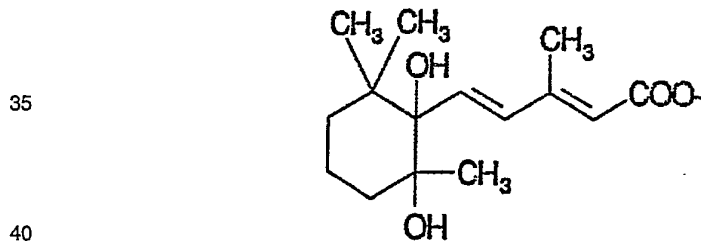


Bei R<sub>3</sub> und R<sub>6</sub> haben die Alkyl- und Alkenyl-/Alkapyengruppen (mit 1-7 Doppelbindungen) vorzugsweise 4 bis 22 Kohlenstoffatome. Besonders bevorzugt sind bei R<sub>3</sub> und R<sub>6</sub> Alkyl- und Alkenyl-, bzw. Alkapyengruppen mit 10 bis 20 Kohlenstoffatomen.

15 Wichtige Gruppen der Formeln (XVI) und (XVII) sind gekennzeichnet durch die Formeln (XX) oder (XXI):

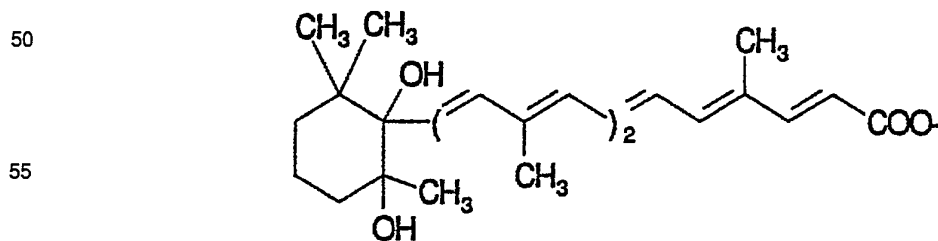


(XX)



(XXI)

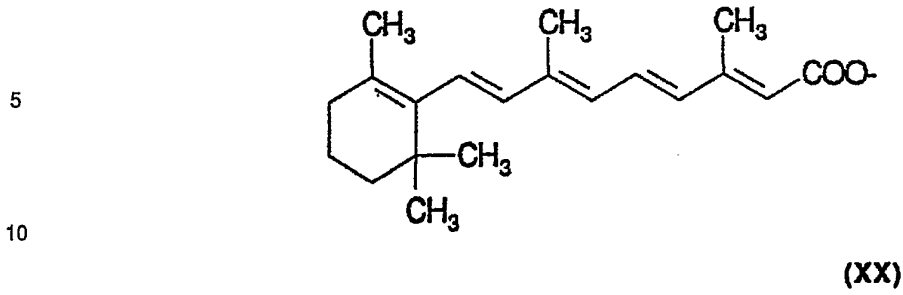
45 Die Gruppe der Formel (XX) liegt in verschiedenen stereoisomeren Formen, so z.B. als all-trans-, als 9-cis- oder als 13-cis-Form vor. Die wichtigste Gruppe der Formel (XVII) ist gekennzeichnet durch die Formel (XXII)



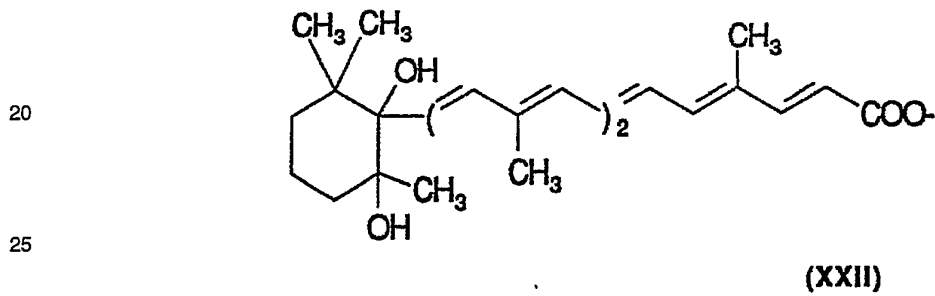
(XXII)

60 Von besonderer Bedeutung sind Verbindungen der Formeln (I) bis (XV), wobei in den Formeln (I) bis (XII) das Radikal R<sub>1</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkenylgruppe und das Radikal R<sub>2</sub> in den Formeln (I) bis (XI) eine Verbindung der Formel (XX) ist:

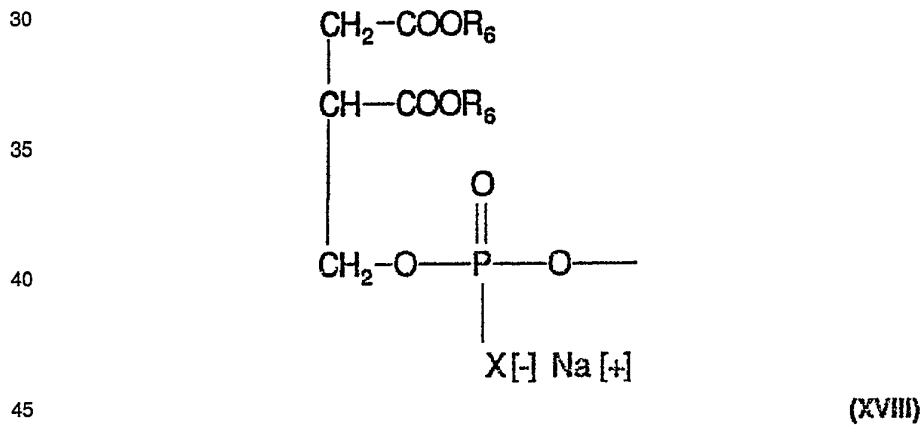
65



oder die Verbindung (XXII) bezeichnet:



oder aber die Gruppe gemäss Formel (XVIII) darstellt:



in welcher  $R_6$  eine  $C_1$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl-, bzw. Alkapolyyengruppe und X Sauerstoff, Schwefel oder Selen bedeuten, und wobei  $R_3$  in den Formeln (XIII) bis (XV) für eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder für eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl- bzw. Alkapolyyengruppe steht.

50 Beispiele von erfindungsgemässen neuen Sterolestern der Formeln (I) bis (XV) und von neuen Sterol-phosphorverbindungen sind u.a.:

- 55 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-all-trans-retinat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-13-cis-retinat  
 Cholest-5-en-3-ol-all-trans-retinat  
 Cholest-5-en-13-cis-retinat  
 Stigmast-5-en-3-ol-all-trans-retinat  
 ( $\beta$ -Sitosterol-all-trans-retinat)  
 Stigmast-5-en-3-ol-13-cis-retinat  
 60 ( $\beta$ -Sitosterol-13-cis-retinat)  
 Stigmast-5-en-3-ol-azafrinat  
 Stigmasta-5,22-dien-3-ol-all-trans-retinat  
 (Stigmasterol-all-trans-retinat)  
 Stigmasta-5,22-dien-3-ol-13-cis-retinat  
 65 (Stigmasterol-13-cis-retinat)

Stigmasta-5,22-dien-3-ol-arachidonat  
 Stigmasta-5,22-dien-3-ol-azafrinat

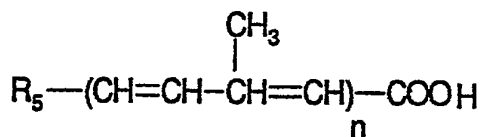
- 5 Stigmasta-5,22-dien-3-ol-1,2-dipalmitoyl-glycero-phosphatid  
 Stigmasta-5,22-dien-3-ol-1,2-dipalmitoyl-glycero-thiophosphatid  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-1,2-diundecenoyl-glycero-phosphatid  
 Cholest-5-en-3-ol-1,2-diundecenoyl-glycero-phosphatid  
 10 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-crotonat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-caproylat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-10-undecenoat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-2-trans-dodecenoat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-palmitat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-oleat  
 15 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-linoleat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-linolenat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-arachidonat  
 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-azafrinat

- 20  $\beta$ -Östradiol-3,17-diundecenoat  
 $\beta$ -Östradiol-3,17-dioleat  
 $\beta$ -Östradiol-3,17-diretinat  
 $\beta$ -Östradiol-3-benzoat-17-undecenoat  
 $\beta$ -Östradiol-3-benzoat-17-retinat

25 Die Sterolester, wie auch die Sterolphosphorverbindungen der Formeln (I) bis (XV) lassen sich allgemein nach folgenden, an sich bekannten Verfahren herstellen:

a) Umsetzung einer Verbindung der Formel (XXIII) und (XXIV):

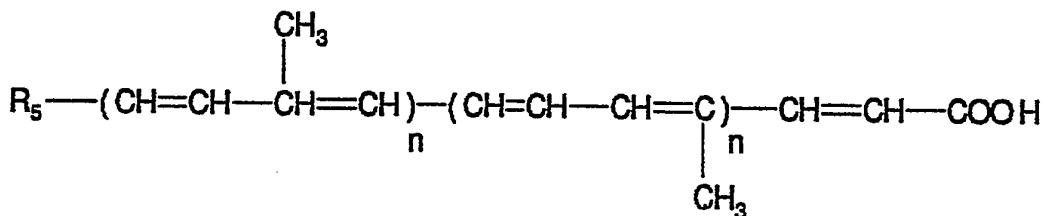
30



35

(XXIII)

40



45

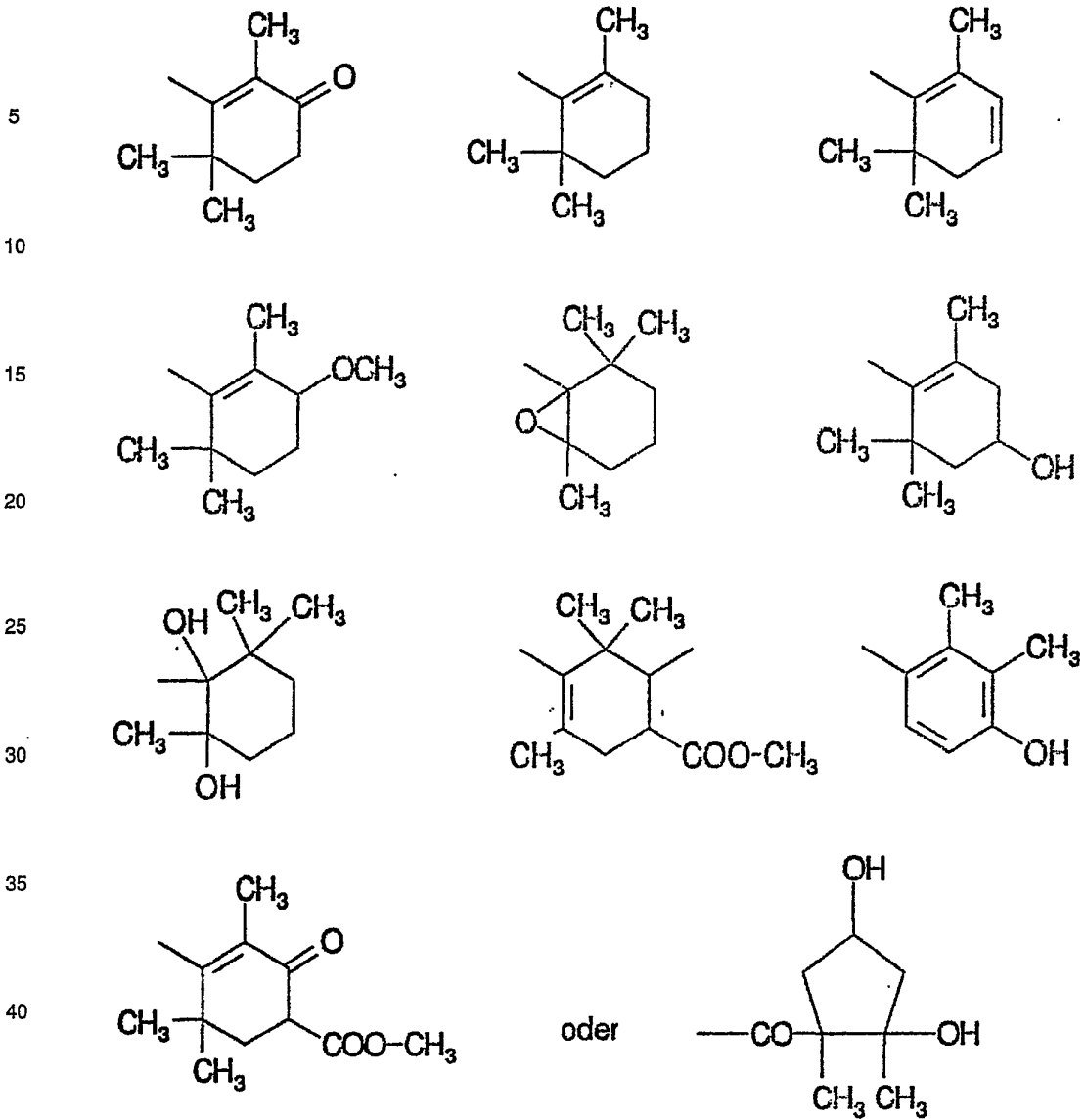
(XXIV)

50 worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeutet und R<sub>5</sub> für die Radikale der folgenden Formeln:

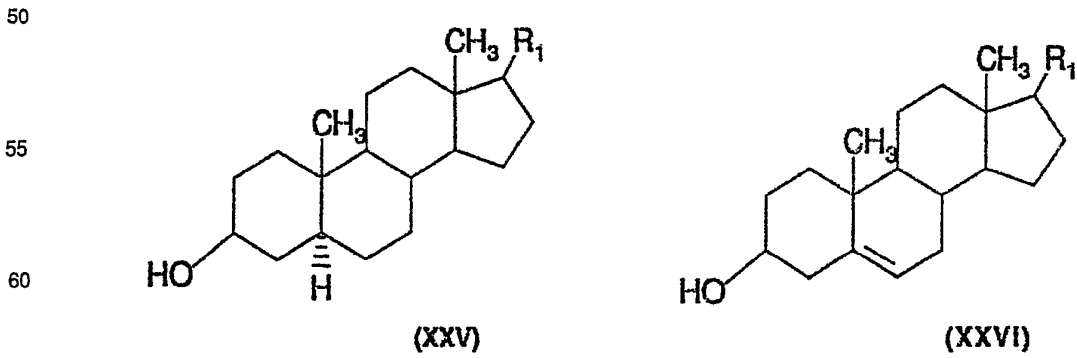
55

60

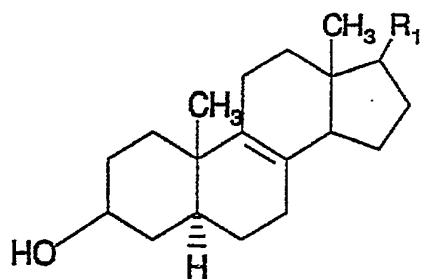
65



45 steht, mit N,N'-Carbonyl-diimidazol bei 25 bis 70°C unter Zusatz einer katalytischen Menge eines Alkoholes in einem indifferenten Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydrofuran, Benzol, Chloroform oder Dimethylformamid und anschließender Alkohololyse der gebildeten Imidazolide mit einem Sterol der Formeln (XXV) bis (XXXVII):

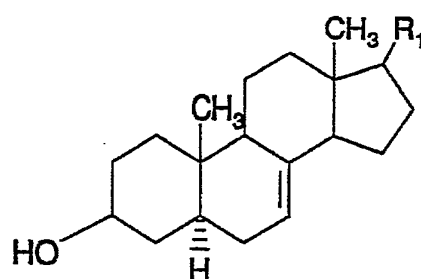


5



(XXVII)

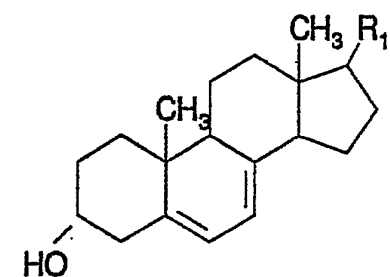
10



(XXVIII)

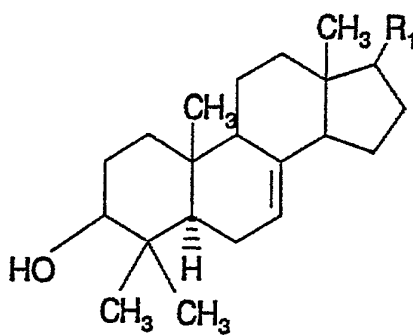
15

20



(XXIX)

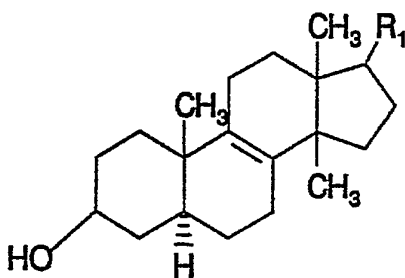
25



(XXX)

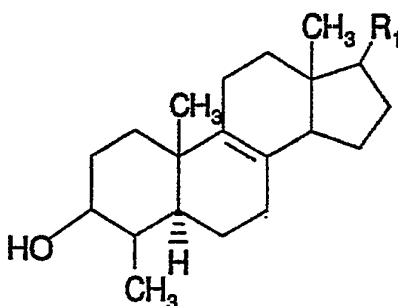
30

35



(XXXI)

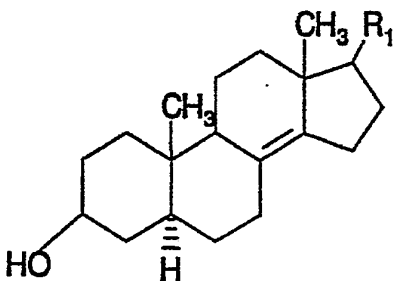
40



(XXXII)

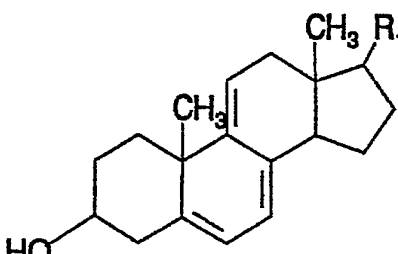
45

50



(XXXIII)

55

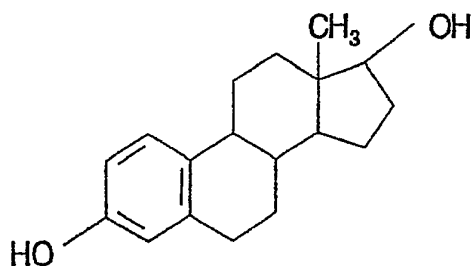


(XXXIV)

60

65

5

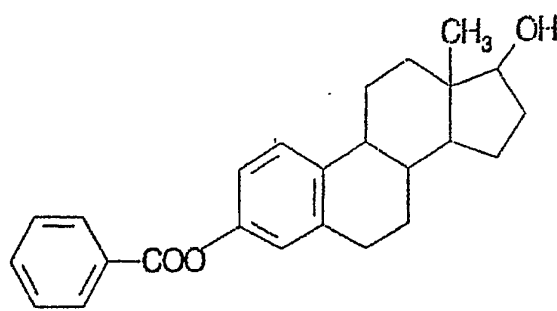


(XXXV)

15

20

25

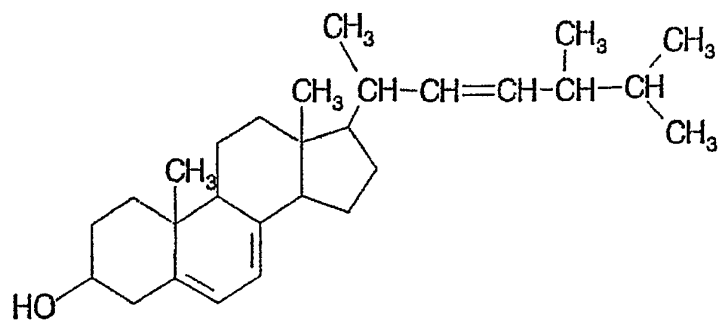


(XXXVI)

30

35

40



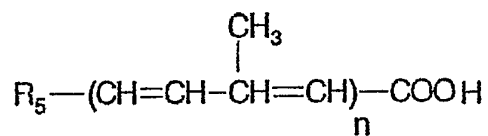
(XXXVII)

worin das Radikal  $R_1$  für eine  $C_1$ - bis  $C_{10}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{10}$ -Alkenylgruppe steht.

b) Bildung des Chlorides, bzw. des Bromides einer Verbindung der Formeln (XXIII) oder (XXIV):

50

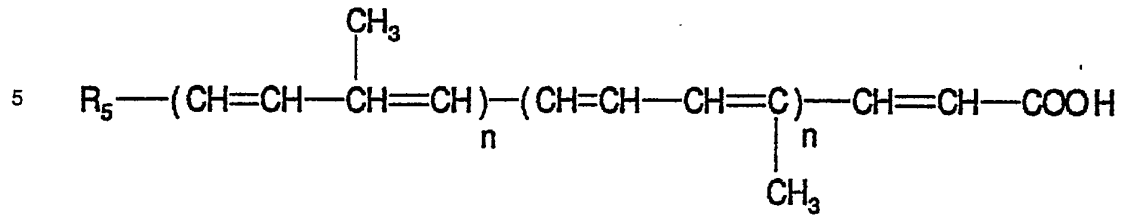
55



(XXIII)

60

65



5

(XXIV)

worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeutet und R<sub>5</sub> für die Radikale mit folgenden Formeln steht:

10

15

20

25

30

35

40

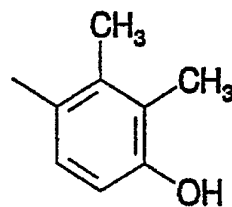
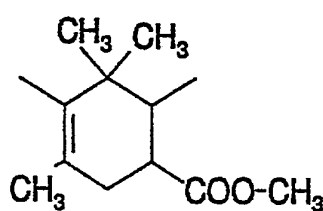
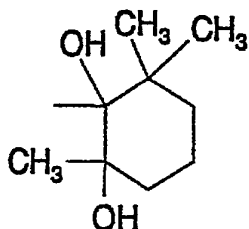
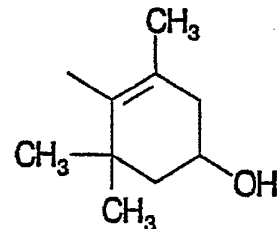
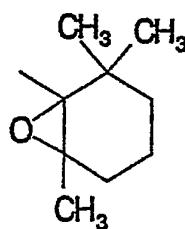
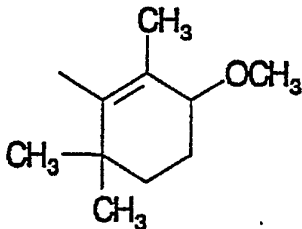
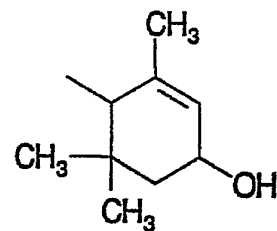
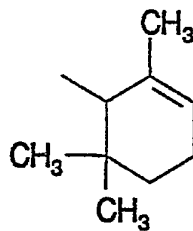
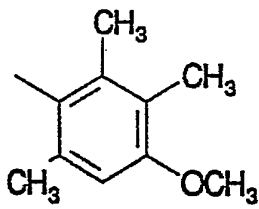
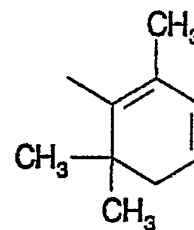
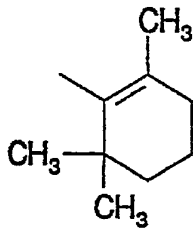
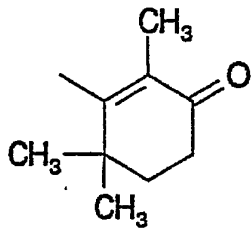
45

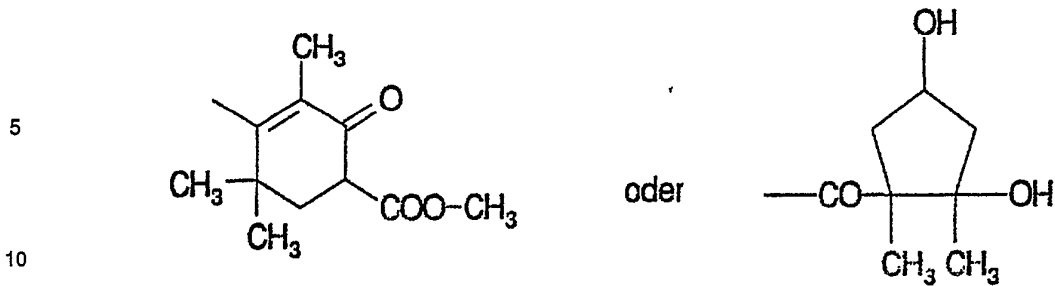
50

55

60

65



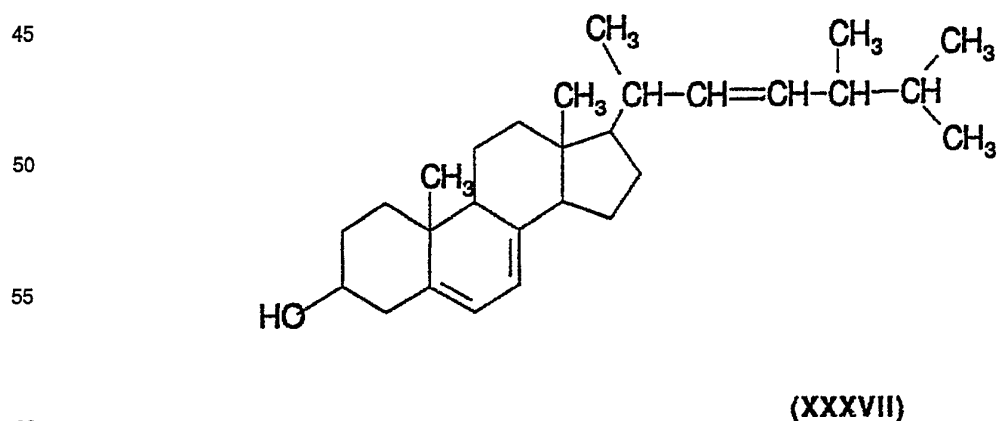
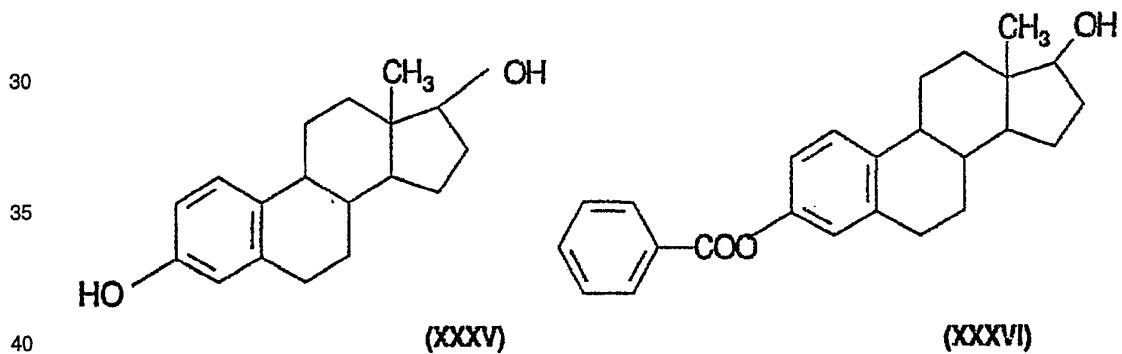


15 mit einem Chlorierungs- oder Bromierungsmittel, wie z.B. Thionylchlorid, Oxalylchlorid oder Oxalylbromid, und anschließender Umsetzung mit einem Sterol der Formeln (XXVI) bis (XXXVII) [vgl. Verfahren a)] bei einer Temperatur von 40 bis 120°C in einem indifferenten Lösungsmittel wie z.B. Toluol oder Xylol und in Gegenwart eines Katalysatoren wie z.B. Dimethylformamid oder p-Dimethylaminopyridin.

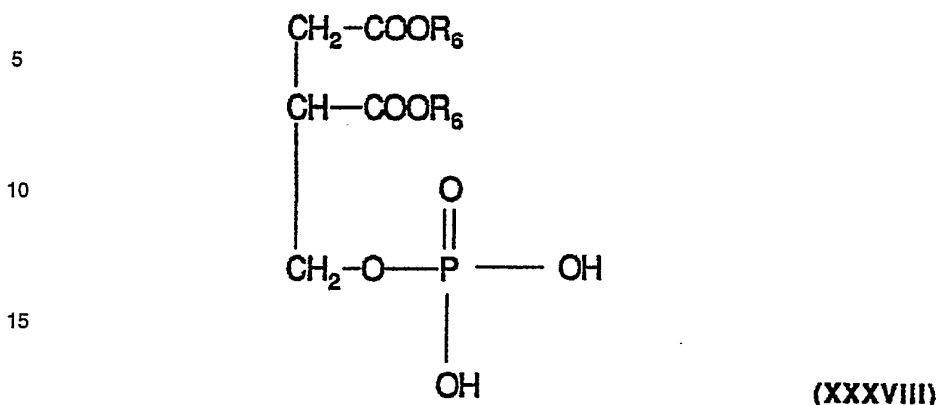
c) Chlorierung oder Bromierung einer Verbindung der Formel (XXXVIII):

20  $R_7\text{-COOH}$  (XXXVIII)

25 worin  $R_7$  eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl-, bzw. Alkapolengruppe darstellt, mit einem Bromierungsmittel wie z.B. Thionylchlorid, Oxalylchlorid oder Oxalylbromid und anschließender Reaktion der entstandenen Chloride, bzw. Bromide mit einem Sterol der Formeln (XXXV), (XXXVI) oder (XXXVII):



d) Veresterung einer Verbindung der Formel (XXXVIII)



20 worin R<sub>6</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkenyl-, bzw. Alkapolyengruppe darstellt, in einem inerten Lösungsmittel wie z.B. Pyridin, Tetrahydrofuran oder Chloroform bei einer Temperatur von 20°C mit Pivaloylchlorid und anschließender Umsetzung des Reaktionsproduktes in der gleichen Lösung mit einem Sterol der Formeln (XXV) bis (XXXVII).

25 Die neuen Sterolester und Sterolphosphatide haben überraschenderweise eine ausgezeichnete anti-tumorale Wirkung, vor allem dann, wenn sie in spontan dispergierbare Konzentrate eingearbeitet worden sind.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb auch spontan dispergierbare Konzentrate mit diesen Verbindungen. Solche Konzentrate ergeben, mit Wasser versetzt, Mikroemulsionen von hervorragender Phasenstabilität und von überaus deutlich erhöhtem Permeations- und Spreitungsvermögen.

30 Die erfindungsgemäss spontan dispergierbaren Konzentrate enthalten:

0,001 bis 25 Gewichts-% einzelner Sterolester oder Sterolphosphorverbindungen der Formeln (I) bis (XV), bzw. Kombinationen dieser Komponenten, sowie

0 bis 40 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches

35 0,001 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins

0 bis 10 Gewichts-% einer freien Fettsäure und gegebenenfalls übliche Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel.

40 Die erfindungsgemäss einzusetzenden Tenside oder Tensidgemische können anionaktiv, kationaktiv, amphoter oder nicht-ionogen sein. Am besten sind sie nicht-ionogen und haben einen HLB-Wert (d.h. eine «hydrophilic-lipophilic-balance») zwischen 2 und 18; bevorzugt liegt er zwischen 2 bis 6 einerseits und 10 bis 15 andererseits. HLB-Werte geben Auskunft über die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften eines Emulgators. Vgl. dazu «Hydrophile – Lipophile Balance: History and recent Developments» von Paul Becher im Journal of Dispersion Science and Technology. 5 (1), 81–96 (1984). Geeignete anionische Tenside können sowohl sog. wasserlösliche Seifen als auch wasserlösliche synthetische Verbindungen sein.

45 Als Seifen eignen sich die Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls substituierten Ammoniumsalze von höheren Fettsäuren (C<sub>10</sub> bis C<sub>22</sub>), wie z.B. die natürlichen Na- oder K-Salze der Öl- oder Stearinsäure, oder von natürlichen Fettsäuregemischen, welche sich u.a. aus Kokosnuss- oder Talgöl gewinnen lassen. Ferner sind als Tenside auch die Fettsäure-Methyltaurinsalze, sowie modifizierte und nicht-modifizierte Phospholipide zu erwähnen.

Häufiger werden jedoch sogenannte synthetische Tenside verwendet, insbesondere Fettsulfonate, Fettsulfate, sulfonierte Benzimidazol-Derivate oder Alkylarylsulfonate.

50 Die Fettsulfonate und -sulfate liegen in der Regel als Alkali-, Erdalkali- oder gegebenenfalls substituierte Ammoniumsalze vor und weisen im allgemeinen einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen auf, wobei Alkyl auch den Alkylteil von Acylresten einschliesst. Beispiele hierfür sind das Na- oder Ca-Salz der Ligninsulfosäure, des Dodecylschwefelsäureesters und Sulfonsäuren von Fettalkohol Äthylendioxyd-Addukten. Die sulfonierten Benzimidazol-Derivate enthalten vorzugsweise zwei Sulfonsäuregruppen und einen Fettsäurerest mit etwa 8 bis 22 C-Atomen. Alkylaryl-Sulfonate sind z.B. die Na-, Ca- oder Triäthanolaminsalze der Dodecylbenzolsulfonsäure, der Dibutyl-naphthalinsulfonsäure oder eines Naphthalinsulfonsäure-Formaldehyd-Kondensationsproduktes.

60 Als nicht-ionische Tenside stehen in erster Linie zur Wahl die Polyglykolätherderivate von aliphatischen oder cycloaliphatischen Alkoholen, gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren und Alkylphenolen, welche 3 bis 30 Glykoläthergruppen und 8 bis 20 C-Atome im (aliphatischen) Kohlenwasserstoffrest und 6 bis 18 C-Atome im Alkylrest enthalten können. Weiterhin kommen als nichtionische Tenside in Fra-

ge die wasserlöslichen, 20 bis 250 Äthylenglykoläthergruppen und 10 bis 100 Propylenäthergruppen enthaltenden Polyäthylendioxyaddukte an Polypropylenglykol und Alkylpolypropylenglykol mit 1 bis 10 C-Atomen in der Alkylkette. Die genannten Verbindungen enthalten üblicherweise pro Propylenglykoleinheit 1 bis 5 Äthylenglykoleinheiten.

5 Als Beispiele nicht-ionischer Tenside seien erwähnt:

Nonylphenolpolyäthoxyäthanol, Ricinusölpolyglykoläther, Polypropylen-Polyäthylendioxy-Addukte, Tributylphenoxypolyäthoxyäthanol, Polyäthylenglykol und Octylphenoxypolyäthoxyäthanol. Überdies kommen auch Fettsäureester von Polyoxyäthylensorbitan, wie das Polyoxyäthylensorbitan-Trioleat, in Betracht.

10 Bei den kationischen Tensiden handelt es sich vor allem um quaternäre Ammoniumsalze, welche als N-Substituenten mindestens einen Alkylrest mit 8 bis 22 C-Atomen enthalten und als weitere Substituenten niedrige, gegebenenfalls halogenierte Alkyl-, Benzyl- oder niedrige Hydroxyalkylreste aufweisen. Die Salze liegen vorab als Halogenide, Methylsulfate oder Äthylsulfate vor, z.B. das Stearyltrimethylammoniumchlorid oder das Benzyl-di(2-chloräthyl)äthylammoniumbromid.

15 In hohem Masse bevorzugt zur Herstellung von erfindungsgemäßen, spontan dispergierbaren Konzentraten sind Phosphorsäureestertenside, wie z.B. Tristyrylphenolpolyoxyäthyl-18-monodimethylphosphorsäureester (Soprophor® FL, Rhône-Poulenc);

Nonylphenol-10-polyoxyäthyl-mono/dimethylphosphorsäureester (Diphazol® 3873, CIBA-GEIGY);

20

25

30



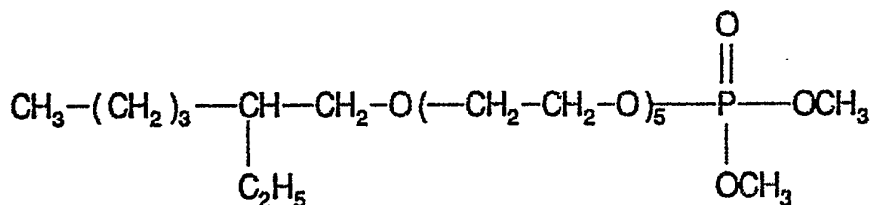
(Tensid 508, CIBA-GEIGY);

35

Tinovetin® JU (CIBA-GEIGY), ein Hydroxybiphenyl-10-Äthoxy-Phosphorsäureester;  
Butyl-mono-4-Äthoxy-Phosphorsäureester (Zerostat® AT, CIBA-GEIGY), bzw.

40

45



(Zerostat® AN, CIBA-GEIGY)

50

Als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienende, pharmaverträgliche Lösungsmittel lassen sich einsetzen, z.B.:

55 Ester eines aliphatischen Alkohols (C<sub>3</sub>-C<sub>18</sub>) mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>), wie etwa Isopropylaurat, Hexyllaurat, Decyllaurat, Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat und Laurylmyristat; Kohlenwasserstoffe mit einer geraden Kohlenstoffkette (C<sub>12</sub>-C<sub>32</sub>), welche mit 6 bis 18 Methylgruppen substituiert ist und 1 bis 6 Doppelbindungen aufweisen kann, wofür Terpene wie Polymethylbutane und Polymethylbutene als Beispiele dienen mögen.

Mono-Ester aus Äthylenglykol oder Propylenglykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6</sub> bis C<sub>22</sub>), wie etwa Propylenglykolmonolaurat und Propylenglykolmonomyristat.

60 Ester aus einem aliphatischen Alkohol (C<sub>12</sub> bis C<sub>22</sub>) mit Milchsäure, wie z.B. Myristyl- oder vorzugsweise Lauryl-Lactat; Mono-, Di- oder Triester des Glycerins mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6</sub> bis C<sub>22</sub>), wie z.B. Glyceryl-Caprylat, oder Miglyol® 812 Neutralöl (Oleum neutrale).

65 Ester aus einem Poly(2-7)äthylenglykolyzerinäther mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6</sub> bis C<sub>22</sub>), wie z.B. aliphatische Alkohole (C<sub>12</sub> bis C<sub>22</sub>), somit u.a. Dodecanol, Tetradecanol, Oleylalkohol, 2-Hexyldecanol und 2-Octyldecanol.

Ester mit mindestens einer freien Hydroxylgruppe, aus Poly-(2–10)glykol mit einer aliphatischen Carbonsäure (C<sub>6</sub> bis C<sub>22</sub>), Monoäther aus einem Polyäthylenglykol mit einem aliphatischen Alkohol (C<sub>12</sub> bis C<sub>18</sub>), wie z.B. Polyoxyäthyl (C<sub>10</sub>)-octyläther.

Heterocyclische Verbindungen, wie z.B. 1-Methyl-2-Pyrrolidon.

Alle technischen Tenside wurden vor dem Eintrag in die spontan dispergierbaren Konzentrate mittels Filtration, bzw. Chromatographie über neutralem Aluminiumoxyd mit einem inerten Lösungsmittel wie z.B. Tetrahydrofuran, Äthylalkohol oder Methylenchlorid gereinigt.

Als Zusätze in die erfindungsgemässen spontan dispergierbaren Konzentrate eignen sich Vitamine und Provitamine (wie z.B. Vitamin A, Retinol, Carotine, Tocopherole), sowie auch freie Fettsäuren wie etwa:

Valeriansäure, Isovaleriansäure, Sorbinsäure, Isocaprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Arachidsäure, Behensäure, Hexacosansäure, Octacosansäure, Pentadecansäure, Decenylsäure, Undecenylsäure, Dodecenylsäure, Oleinsäure, Linolsäure, Linolensäure, Arachidonsäure, Erucasäure, etc.

Die zur pharmazeutischen Anwendung erforderliche Tagesdosis beträgt 0,001 bis 25 mg/kg Körpergewicht, wenn möglich verteilt auf 2 bis 3 Einzeldosen. Hiefür lassen sich die neuen Sterolester, bzw. Sterolphosphatide oder die spontan dispergierbaren Konzentrate mit diesen Verbindungen in die gängigen pharmazeutischen Zubereitungen und Darreichungsformen wie Dragées, Tabletten, Kapseln, Pulver, Granulat, Pellets, Lösungen, Ampullen, Emulsionen, Crèmes oder Zäpfchen zusammen mit den üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungs- und Stabilisierungsmitteln einarbeiten.

Die Gegenstand der Erfindung bildenden Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen, sowie die spontan dispergierbaren Konzentrate, welche diese Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen enthalten, können dem Menschen oral, durch Injektion (intravenös, subkutan oder intramuskulär) oder in anderer Weise verabreicht werden. Wenn sie als feste Darreichungsformen für die orale Verwendung aufbereitet werden, kann dies in Form von Tabletten, Granulaten, Pellets, Pulvern oder Kapseln, usw. geschehen. Die Aufbereitungen können Zusatzstoffe enthalten, z.B. einen Arzneimittelträger wie eine Saccharid- oder Cellulose-Grundlage, ein Bindemittel wie Stärkepaste oder Methylcellulose, ein Füllmittel oder ein Desintegriermittel, usw. – wobei Zusatzstoffe eingesetzt werden, wie sie üblicherweise bei der Herstellung medizinischer oder paramedizinischer Formulierungen verwendet werden. Wenn die erfindungsgetreuen Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen als flüssige Darreichungsformen zu oraler Verabreichung gelangen, so können sie irgend eine aus wässrigen Zubereitungen für innere Verwendung, aus Suspensionen, Emulsionen und Sirups usw. ausgewählte Form haben, und sie können ausserdem in der Form getrockneter Präparate vorliegen, welche vor ihrer Verwendung in Lösung oder Emulsion gebracht werden.

Wenn die erfindungsgemässen Wirkstoffe oder Wirkstoffmischungen in der Form wässriger Lösungen, Suspensionen oder öligler, bzw. wässriger Emulsionen, vorzugsweise als Mikroemulsionen aus den erfindungskonformen, spontan dispergierbaren Konzentraten aufbereitet sind, können sie auch injiziert werden. Die Injektionslösungen werden jedoch üblicherweise kurz vor der Anwendung hergestellt, indem man die Extrakte oder Konzentrate in wässrigen, flüssigen Medien wie sterilem Wasser, Glucoselösung oder physiologischer Kochsalzlösung auflöst oder suspendiert.

Falls erforderlich, können zu einem Injektionspräparat üblicherweise verwendete Lösungsmittel, Stabilisierungsmittel, Konservierungsmittel und Zusätze für die Herstellung isotonischer Lösungen hinzugegeben werden. Die auf diese Weise erhaltenen Injektions-Präparate werden intravenös, intramuskulär, subkutan oder in einer anderen geeigneten Weise verabreicht.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Präparate, welche die Wirkstoffe, bzw. Wirkstoffgemische, und/oder die beschriebenen, spontan dispergierbaren Konzentrate zur Bekämpfung des Wachstums von Tumorzellen enthalten. Bei den der Erfindung entsprechenden pharmazeutischen Präparaten handelt es sich um solche zur enteralen (wie oralen oder rektalen), sowie zur parenteralen oder topischen Verabreichung an Warmblüter, welche das spontan dispergierbare Konzentrat allein oder zusammen mit einem pharmazeutisch anwendbaren Trägermaterial enthalten.

Die Dosierung der erfindungsgemässen Konzentrate hängt von der Warmblüterspezies, dem Alter und dem individuellen Zustand, sowie von der Verabreichungsart ab. So werden z.B. zur Erzielung eines Abtötungseffektes von Tumorzellen an Warmblütern mit geringem Körpergewicht, wie z.B. Mäusen, Ratten und Hamstern, bei subkutaner Verabreichung Dosen im Bereich von ca. 0,1 bis 50 mg/kg Körpergewicht, und bei intraperitonealer Verabreichung Dosen im Bereich von 0,05 bis 5 mg/kg Körpergewicht angewandt.

Die oralen und rektalen Formen der neuen pharmazeutischen Präparate enthalten zwischen 1–95%, vorzugsweise zwischen 10–95%, insbesondere zwischen 20–95% des erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrates. Sie können z.B. in Dosis-Einheitsform vorliegen, also als Dragées, Micropellets, Tabletten, Suppositorien oder Ampullen und vor allem als Kapseln.

Geeignete pharmazeutisch anwendbare Trägerstoffe für die oralen Formen sind hauptsächlich Füllstoffe, wie Zucker (z.B. Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit), Cellulosepräparate und/oder Calciumphosphate (z.B. Tricalcium- oder Calciumhydrogenphosphat), ferner Bindemittel wie Stärkekleister unter Verwendung von u.a. Mais-, Weizen-, Reis- oder Kartoffelstärke, Gelatine, Traganth, Methylcellulose, Hydroxyl-Methylcellulose, Hydroxypropyl-Methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose

und/oder Polyvinylpyrrolidon und/oder Sprengmittel (wenn erwünscht), wie die obgenannten Stärken, ferner Carboxymethylstärke, quervernetztes Polyvinylpyrrolidon, Agar, Alginsäure oder ein Salz davon, wie z.B. Natriumalginat.

Als Fließregulierungsmittel sind z.B. die Polyäthylenglykole Nr. 200 bis 600 und höher geeignet.

5 Die beim Menschen als Darreichungsform bevorzugten Gelatinekapseln werden mit geeigneten Überzügen versehen, wobei man u.a. konzentrierte Zuckerlösungen – welche gegebenenfalls arabischen Gummi, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Polyäthylenglykol und/oder Titandioxid enthalten – Lacklösungen (wässrige oder solche, die unter Verwendung organischer Lösungsmittel aufbereitet worden sind), oder magensaftresistente Überzüge aus Lösungen von geeigneten Cellulosepräparaten, wie mikrokristalliner Cellulose (Avicel), Acetylcellulosephthalat, Hydroxymethyl-Cellulosephthalat, bzw. -acetatsuccinat oder einem Copolymerisat wie Eudragit® L 30 D verwendet.

15 Als erfindungsgemäss besonders geeignete, oral anwendbare pharmazeutische Darreichungsform eignen sich Steckkapseln aus Gelatine und einem Weichmacher, wie Glycerin oder Sorbitol. Die Weich- bzw. Hartgelatine-Kapseln können das der Erfindung entsprechende, spontan dispergierbare Konzentrat im Gemisch mit Füllstoffen, wie Laktose, Bindemitteln wie Stärke und/oder Gleitmitteln wie Talk oder Magnesium-Stearat und gegebenenfalls mit Stabilisatoren und Antioxydantien wie z.B.  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Tocopherol enthalten. Der Einsatz von geeigneten Flüssigkeiten wie flüssigen Polyäthylenglykolen No. 200 bis 600 als Verdünnungsmittel kann sich empfehlen, wobei sich ebenfalls Stabilisatoren und Antioxydantien zufügen lassen.

20 Zur parenteralen Verabreichung werden die erfindungsgemässen Konzentrate mit destilliertem Wasser versetzt. Der entstehenden wässrigen Injektions-Mikroemulsion können viskositätserhöhende Stoffe, wie z.B. Na-Carboxymethylcellulose, Sorbit, Mannit und/oder Dextran, und gegebenenfalls auch Stabilisatoren und Antioxydantien zugefügt werden.

25 Die pharmazeutischen Präparate für die parenterale Anwendung enthalten vorzugsweise zwischen 0,1 bis 60%, und hauptsächlich zwischen 1 bis 40% des erfindungskonformen, spontan dispergierbaren Konzentrates.

Als topisch anwendbare Präparate, welche sich vornehmlich zur Prophylaxe von Hautkrebsarten eignen, kommen z.B. Crèmen, Salben, Pasten, Pomaden, Schäume, Tinkturen und Lösungen in Betracht, welche zwischen 0,01 bis 70% des erfindungsgemässen Konzentrates enthalten.

30 Für Crèmen und Öl-in-Wasser-Emulsionen, welche mehr als 50% Wasser aufweisen, verwendet man als ölige Grundlage in erster Linie Fettalkohole, z.B. Lauryl-, Cetyl- oder Stearylalkohol, flüssige bis feste Wachse, z.B. Isopropylmyristat, Woll- oder Bienenwachs und/oder Kohlenwasserstoffe wie z.B. Vaseline (Petrolatum) oder Paraffinöl. Zur Emulgierung dieser öligen Grundlagen eignen sich in erster Linie oberflächenaktive, pharma-verträgliche Substanzen mit vorwiegend hydrophilen Eigenschaften, wie z.B. nichtionogene Emulgatoren, vorab Fettsäureester von Polyalkoholen oder Äthylenoxydaddukten (etwa Polyglycerinfettsäureester oder Polyäthylensorbitan-Fettsäureester) mit einem HLB-Wert von unter 8. Zusätze zur Wasserphase sind u.a. Mittel, welche die Austrocknung der Crèmen vermindern, z.B. Polyalkohole wie Glycerin, Sorbit, Propylenglykol und/oder Polyäthylenglykole No. 200 bis 600, ferner Konservierungsmittel, Riechstoffe, etc.

40 Salben sind Wasser-in-Öl-Emulsionen, die bis zu 70%, vorzugsweise jedoch zwischen 20 und 50% Wasser oder wässrige Phasen enthalten.

Als Fettphase kommen in erster Linie Kohlenwasserstoffe, z.B. Vaseline, Paraffinöl und/oder Hartparaffine in Frage, welche zur Verbesserung des Wasserbindungsvermögens geeignete Hydroxydverbindungen, wie z.B. Fettalkohole oder Ester, davon etwa Cetylalkohol oder Wollwachsalkohole, enthalten.

45 Fallweise werden noch Emulgatoren mit einem HLB-Wert von 8 bis 16, wie z.B. Sorbitan-Fettsäureester (etwa Sorbitanisostearol) zugesetzt. Zusätze zur Wasserphase sind u.a. Feuchthaltungsmittel, wie Polyalkohole (Glycerin, Propylenglykol, Sorbit und/oder Polyäthylenglykole No. 200, 400, 600); ferner Konservierungsmittel, Riechstoffe, etc.

50 Fettsalben sind wasserfrei und enthalten als Grundlage vornehmlich Kohlenwasserstoffe, z.B. Paraffin, Vaseline und/oder flüssige Paraffine; überdies natürliche oder partial synthetische Fette wie z.B. Kokosfettsäuretriglycerid, ferner: Fettsäurepartialester des Glycerins, wie z.B. die im Zusammenhang mit den Salben erwähnten, die Wasser-Aufnahmefähigkeit steigernden Fettalkohole, Emulgatoren und/oder Zusätze.

55 Pasten sind Crèmen und Salben mit sekretabsorbierenden Puderbestandteilen, wie beispielsweise Metalloxide (etwa Titanoxid oder Zinkoxid), ferner Talk und/oder Aluminiumsilikate, welche die Aufgabe haben, vorhandene Feuchtigkeit oder Sekrete zu binden.

60 Schäume werden aus Druckbehältern verabreicht und sind in Aerosolform vorliegende Öl-in-Wasser-Emulsionen der erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Konzentrate, wobei halogenierte Kohlenwasserstoffe (wie z.B. Chlorfluorniederalkane: etwa Dichlordifluormethan und Dichlortetrafluoräthan) als Treibmittel verwendet werden. Dazu kommen gegebenenfalls die üblichen Zusätze wie Konservierungsmittel, usw.

65

## CH 681 153 A5

Verfahrensbeispiele zur Herstellung der erfindungsgemässen Sterolester und Sterolphosphatide

### 1. Herstellung von Ergosta-5,7,22-trien-3-ol-dodecenoat

5     2 g Dodecenyssäure und 1,8 g Thionylchlorid werden in 300 ml Tetrahydrofuran während 2 Stunden am Rückfluss gekocht. Anschliessend werden 150 ml Tetrahydrofuran abdestilliert und 3,97 g Ergosterol (= Ergosta-5,7,22-trien-3-ol) und 0,5 g Dimethylformamid zugesetzt.

Nach zweistündiger Erhitzung bei 70°C wird das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt. Der Rückstand wird in Acetonitril/Aceton (50/50) umkristallisiert.

10     Man erhält das reine Ergosteroldodecenoat mit einem Schmelzpunkt von 86,6–91,1°C. Auf gleichartige Weise werden auch folgende Verbindungen hergestellt:

	Ergosterolcrotonat	Smp:	150–151,6°C	
15	Ergosterolcapryloat	Smp:	97,9°C	
	Ergosterol-10-undecenoat	Smp:	75,8–76,2°C	
		IR:	2932 cm <sup>-1</sup>	v(CH)
			2871 cm <sup>-1</sup>	v(CH)
20			1722 cm <sup>-1</sup>	v(C=O) Ester
			1639 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
			1457 cm <sup>-1</sup>	δ(CH)
25			1371 cm <sup>-1</sup>	δ(CH <sub>3</sub> )
			1186 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
			983 cm <sup>-1</sup>	δ(CH)}
			914 cm <sup>-1</sup>	Vinyl }
30	Ergosterollaurat	Smp:	86,5°C	
	Ergosterolpalmitat	Smp:	99,5°C	
	Ergosteroleoleat	Smp:	86,3–95,7°C	
35	Ergosterollinoleat	Smp:	89,8–91,2°C	
		UV:	253,0 nm	

### 2. Herstellung von Stigmasterol-3β-all-trans-Retinat

40     Zu 600 mg all-trans-Retinsäure und 50 mg Dimethylformamid in 70 ml Toluol werden bei 5°C 360 mg Oxalychlorid in 30 ml Toluol zugetropft. Nach 4 Std. bei 20°C wird die Hälfte des Lösungsmittels am Vakuum abdestilliert.

45     Zur Restlösung werden 650 mg Stigmasterol und 50 mg p-Dimethylaminopyridin in 30 ml Toluol zugegeben. Die Reaktionslösung wird während 2 Std. am Rückfluss bei 100 bis 110°C erwärmt. Anschliessend wird das Lösungsmittel durch Vakuumdestillation entfernt. Der Rückstand wird auf einer Silicagelsäule mit Hexan/Essigester (9:1) chromatographiert.

Man erhält das reine Stigmasterol-all-trans-Retinat mit einem Schmelzpunkt von 89°C, UV-Absorption 358,5 nm.

50     Auf gleichartige Weise werden auch folgende Verbindungen hergestellt, welche die Eigenschaften von Fettkristallen haben, d.h. dass der Schmelzbereich meist unbestimmbar ist:

55

60

65

	Ergosterol-all-trans-Retinat	UV: 354,0/264,0 nm	
5		IR: 2958 cm <sup>-1</sup>	v(CH)
		2871 cm <sup>-1</sup>	v(CH)
		1701 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
		1608 cm <sup>-1</sup>	v(C=C)
		1583 cm <sup>-1</sup>	v(C=C)
10		1457 cm <sup>-1</sup>	δ(CH)
		1239 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
		1153 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
		1016 cm <sup>-1</sup>	v(C=O)
15		970 cm <sup>-1</sup>	trans C=C δ(CH)
	β-Sitosterol-all-trans-Retinat	UV: 344,5 nm	
20	Cholesterol-all-trans-Retinat	UV: 354,5 nm	
	Stigmasterol-13-cis-Retinat	UV: 348,0 nm	
25	Ergosterol-13-cis-Retinat	UV: 346,0 nm	
	β-Sitosterol-13-cis-Retinat	UV: 368,5 nm	
	Cholesterol-13-cis-Retinat	UV: 345,5 nm	
	Ergosterol-Linolenat	UV: 252,2 nm	
30	Stigmasterol-Archidonat	UV: 251,8 nm	
		BI: 1.51320/20°C	

UV-Spektren gemessen am Spectrophotometer Shimadzu UV160A BI (Brechungsindex) = RI (Refractory Index), gemessen am DUR-Refractometer Schmidt + Haensch, Berlin.

IR-Spektren gemessen am Spectrophotometer Perkin Elmer 983G

NMR-analytische Daten zur Strukturbestätigung für Ergosterol-3β-all trans Retinat ermittelt am Bruker AM-360 Spectrometer

### 3. Herstellung von Stigmasterol-Azafrinat

Zu 80 mg Azafrin [Verbindung wie Formel XXI; Herstellung vgl. Helv.Chim.Acta 58 (1975) 1722–1727 und Helv.Chim.Acta 65 (1982) 353–354] in 50 ml Chloroform werden 65 mg N,N'-Carbonyldiimidazol zugesetzt. Man lässt die Reaktionslösung während 12 Std. bei 20°C stehen und setzt dann 40 mg Stigmasterol zu.

Nach weiteren 12 Std. bei 30°C wird das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand in 50 ml Essigester aufgenommen. Diese Lösung schüttelt man einmal mit 1/10 N Salzsäure und einmal mit 1/10 N Natronlauge aus. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand auf einer Silicagelsäule mit Hexan/Essigester (9:1) als Eluiermittel chromatographiert.

Man erhält das Stigmasterol-Azafrinat, mit einer UV-Absorption bei 429,5 nm.

Auf gleichartige Weise werden auch folgende Verbindungen hergestellt, charakterisiert durch den Brechungsindex n<sub>D</sub> 20°C (BI), bzw. die UV-Absorptions-Maxima:

	Ergosterol-Azafrinat	UV: 425,6 nm
55	Östradiol-3,17-Di-10-Undecenoat	BI: 1,4816
		UV: 232,8/276,0 nm
	β-Östradiol-3,17-Dioleat	BI: 1,5058
		UV: 232,0/280 nm
60	β-Östradiol-3,17-Di-all trans-Retinat	UV: 354,5/371,0 nm
	β-Östradiol-3-Benzoat-17-10-Undecenoat	UV: 247,6 nm
	β-Östradiol-3-Benzoat-17-all trans-Retinat	UV: 354,5 nm

65

## 4. Herstellung von Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycerophosphat und von Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycero-thiophosphat

2-Dipalmitoyl-glycero-3-H-phosphonat-Triäthylammoniumsalz wird genau nach der Vorschrift von I. Lindth und J. Stawinski in J. Org. Chem. 54, 1338–1342 (1989) [«Synthesis of Glycero-phospholipids and their Analogues via H-Phosphonate Intermediates»] hergestellt. Auf die chromatographische Zwischenreinigung des Reaktionsproduktes wird verzichtet; das Rohprodukt wird demnach unmittelbar in der nächsten Stufe eingesetzt.

600 mg Rohprodukt und 600 mg Stigmasterol werden in 15 ml Pyridin gelöst und im Vakuum zur Trockene gebracht. Der Rückstand wird erneut in 15 ml Pyridin gelöst, und unter Rühren werden 0,2 ml Pivaloylchlorid zugegeben. Die Reaktionslösung wird unter Feuchtigkeitsausschluss bei Raumtemperatur 30 Min. gerührt.

Dann werden noch 0,1 ml Pivaloylchlorid zugefügt, und anschliessend wird nochmals 30 Min. gerührt. Die Reaktionslösung wird in zwei Teile geteilt: Zur einen Hälfte der Lösung werden unter Rühren 150 mg Jod in 2 ml Pyridin-Wasser 98:2 gegeben. Nach 30 Min. Rühren bei 20°C wird das Reaktionsgemisch in 50 ml Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird einmal mit 20 ml 5% Na-Bisulfidlösung und zweimal mit 20 ml Wasser gewaschen. Die wässrigen Phasen werden mit 50 ml Chloroform zurückgewaschen und die vereinigten Chloroformphasen im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Zur anderen Hälfte der Lösung werden 150 mg Schwefel in 2 ml Pyridin-Toluol 1:1 gegeben. Die Lösung wird 3 Std. bei 20°C gerührt, in 50 ml Chloroform gelöst, zweimal mit 20 ml Wasser gewaschen und im Vakuum zur Trockene eingedampft.

Die beiden Rohprodukte werden an je 15 g Silicagel mit Chloroform/Hexan 2:1 und 8:1 chromatographiert. Es werden Fraktionen zu 20 ml aufgefangen und im D.C. (Laufmittel Chloroform) untersucht. Je-ne Fraktionen, welche im wesentlichen reines Produkt enthalten, werden im Vakuum zur Trockene gebracht.

Man erhält: das Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycerophosphatid mit einem Schmelzpunkt von 171,6°C und das Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycerothiophosphatid mit einem Schmelzpunkt von 168°C.

Schmelzbereich-Messung für die beiden Verbindungen auf dem Density Scanning Calorimetry Gerät Mettler TA-4000.

Rf.-Werte von erfindungsgemässen Verbindungen, welche nach den Verfahrensbeispielen 1 bis 4 hergestellt worden sind:

1%-Lösung in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, bandförmig aufgetragen 2 cm/2 · l

Linomat III CAMAC 10 cm run

UV 366 nach 1:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH 2 min. 120°C

System	1	2	3	4	5	6	7
ERGOSTEROL-C 8:0	–	0.17	0.32	0.77	–	0.81	–
ERGOSTEROL-C 12:0	0.06	0.14	0.29	0.73	0.89	0.74	0.57
ERGOSTEROL-C 16:0	0.07	0.16	0.32	0.75	0.92	0.82	0.58
ERGOSTEROL-C 18:1	0.08	0.18	0.35	0.80	0.92	–	0.63
ERGOSTEROL-all trans-RETINAT	0.07	0.17	0.42	0.00	0.91	0.87	0.73
β-ÖSTRADIOL-3-17-BIS-UNDECENOAT	0.00	0.00	0.04	0.18	0.71	0.29	0.07

Erklärung:

System 1 Platte Merck Art. 5715 Petroläther/Diethyläther 98:2

System 2 Platte Merck Art. 5715 Petroläther/Diethyläther 97:3

System 3 Platte Merck Art. 5715 Cyclohexan/Ethylacetat 97:3

System 4 Platte Macherey Nagel RP 18 Art. 811 071 Petroläther/Diethyläther 95:5

System 5 Platte Macherey Nagel RP 18 n-Hexan/t. Butylmethyläther/Aceton 90:5:5

System 6 Platte Macherey Nagel RP 18 Petroläther/Cyclohexan/Ethylacetat/H<sub>2</sub>O 48:48:3:1

System 7 Platte Macherey Nagel RP 18 Petroläther/Diethyläther 97:3

CH 681 153 A5

Rf.-Werte Fortsetzung

System Verbindung	1	2	3	4	5
5 ERGOSTEROL-C 18:2	0.76	0.39	0.60	0.92	0.79
ERGOSTEROL-C 18:3	0.78	0.40	0.65	0.92	0.80
β-Östradiol-3,17-DI-UNDECENOAT	0.38	0.10	0.15	0.75	0.30
10 β-Östradiol-3,17-DI-OLEAT	0.42	0.22	0.20	0.83	0.38
Erklärung:					
System 1 Platte RP 18 MN Petroläther/Cyclohexan/Ethylacetat/H <sub>2</sub> O 48:48:3:1					
System 2 Platte SM Cyclohexan/Ethylacetat 97:3					
System 3 Platte SM Petroläther/Diäthyläther 97:3					
15 System 4 Platte RP 18w MN Hexan/tert.BME/Acetonitril 90:5:5					
System 5 Platte RP 18w MN Petroläther/Diäthyläther 95:5					
N.B. SM Platte Merck Art. No. 5715					
RP 18 NM(w) Macherey Nagel Art. No. 811 071					

20

Rf.-Werte mit Normalchromatographie Hexan/Essigester 90:10:

25 β-Östradiol-Diundecenoat	0.37
β-Östradiol-Dioleat	0.48
Ergosterol-all trans-Retinat	0.88
Ergosterol-Linoleat	0.82
30 Ergosterol-Linolenat	0.96
Stigmasterol-Glycero-Phosphatid	0.88
Stigmasterol-Glycero-Thiophosphatid	0.94
Platte Merck Art. No. 5715	

35

40 AUFWEIS DES SPREITUNGS- UND WANDERUNGSVERMÖGENS DER ERFINDUNGSGETREUEN KONZENTRATE UND VON DAMIT HERGESTELLTEN EMULSIONEN

Methode: DC-Platte 0,25 mm Kieselgel 60F254, Merck Art. No. 11 798 mit Konzentrationszone  
 Laufmittel: PBS Dulbecco's ohne Ca und Mg (= Ringerlösung, bzw. physiologische Kochsalzlösung, gepuffert).

45

Rf.-Werte

CHOLESTEROL	0
ERGOSTEROL	0
50 ERGOSTEROL-C 11:1	0.38
ERGOSTEROL-C 11:1-EMULSION	0.60
ERGOSTEROL-all trans-RETINAT	0.55
55 UVITEX CF conc./Ethanol	0.49
UVITEX CF conc.-EMULSION	0.62
P.S. 0,1% Substanz, gelöst in Chloroform	
Emulsion 1000 ppm Wirksubstanz = 1 mg/ml.	

60

65 Die oben angeführten Rf.-Werte vermitteln wichtige Hinweise auf das Verhalten der mit erfindungsgemässen Konzentrationen hergestellten Mikroemulsionen in den Zellverbänden und vorab an den Zellmembranen. Durch die geringe Oberflächenspannung der Konzentrate mit Werten von 30 bis 32 mN/m, den kleinen Teilchenradius der sich ausbildenden Mikromizellen, sowie die niedrige Viskosität der Emulsio-

nen werden vornehmlich das DIFFUSIONSVERMÖGEN und die SPREITUNG im Zellplasma in ausnehmend günstiger Weise beeinflusst. Kontrollmessungen, ausgeführt am Institut für Polymere der ETH, Zürich, haben ergeben, dass die Radien der Mizellen um 1 nm betragen (Prof. Dr. Pierluigi LUISI und PD. Dr. Peter SCHURTENBERGER).

5

Zusammensetzungsbeispiele

von erfindungsgemässen, spontan dispergierbaren Mitteln, welche als antitumorale Wirkstoffe Sterolester und/oder Sterolphosphorverbindungen gemäss den Formeln (I) bis (XV) enthalten.

10

a) 0,5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer Sterolester, bzw. Sterolphosphorverbindungen der Formeln (I) bis (XV)

1 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Miglyol® 812 (Dynamit-Nobel)

20 bis 45 Gewichts-% Diphazol® 3873 (CIBA-GEIGY)

15

20 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800% (CIBA-GEIGY)

b) 0,5 bis 25 Gewichts-% eines oder mehrerer Sterolester, bzw. Sterolphosphorverbindungen der Formeln (I) bis (XV)

1 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat, Isopropylpalmitat oder Miglyol® 812 (Dynamit-Nobel)

20 bis 45 Gewichts-% Invadin® JFC 800% (CIBA-GEIGY)

20

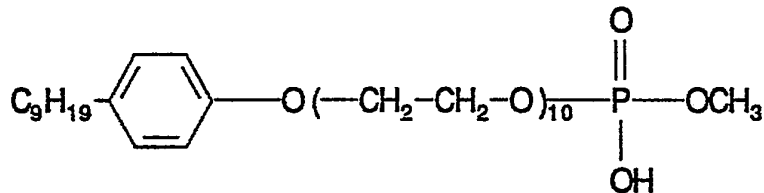
20 bis 45 Gewichts-% Soprophor® FL (Rhône-Poulenc)

Miglyol® 812-Neutralöl ist ein Neutralöl (Oleum neutrale) der Firma Dynamit-Nobel, das einem gemischtsäurigen Triglycerid der fraktionierten Kokosfettsäuren C<sub>8</sub> bis C<sub>10</sub> entspricht.

25

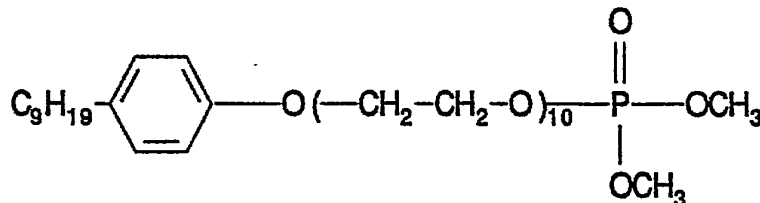
Diphazol® 3873 ist ein Mischemulgator, bestehend aus je 50% der beiden Verbindungen mit den Formeln:

30



35

40



45

Invadin® JFC 800% (CIBA-GEIGY) ist ein tert. Octylphenyl-polyoxyäthylenäther mit 9 bis 10 Oxyäthylengruppen.

50

Soprophor® FL (Rhône-Poulenc) ist ein Tristyrylphenol-polyoxyäthylen-18-mono/dimethyl-Phosphorsäureester.

Beispiel für die pharmazeutische Herstellung eines Systempräparates mit erfindungsgemässen Konzentrationen in der Form von «multiple units».

55

a) Granulierung

Metolose® 90 SH-4000 (Shin-Etsu Chemical)	90.0 g
Avicel® PH-101	80.3 g
Erfindungsgemässes KONZENTRAT	139.4 g
Aerosil® 200	80.3 g
$\Sigma$	390.0 g

60

65

Granulieren/formen im Schnellmixer oder im Rotationsbett unter Zusatz von 110 g Ethanol, brechen, sieben 18 bis 42 mesh, trocknen 24 h bei 40°C.

5 b) MSR- und RETARD-Ausrüstung  
im Rotationsbett mit AQOAT® AS-HG (Shin-Etsu Chemical) und Talk

c) Zusammensetzung fertiges Granulat/bzw. Micropellets

10	Kernmaterial	44%
	Erfindungsgemässes KONZENTRAT	25%
	MSR- und Retard-Beschichtung	31%
	$\Sigma$	100%

15 N.B. MSR = Magensaft-Resistenz. Die Pellets/Granulate gemäss a) können auch ohne Befüllung un-  
mittelbar in Kapseln abgefüllt werden, welche aus AQOAT™ (HPMC-AS-M oder HPMC-AS-N) herge-  
stellt sind, mit Aceton/Ethanol 1:1 verschlossen werden und so die Funktionen der MSR und der verzö-  
gerten Abgabe angemessen steuern. Diese neuartige Darreichungsform weist gegenüber Gelatinekap-  
seln für die erfindungsgemässen Konzentrate eine massgeblich verbesserte Stabilität auf.

20 BIOLOGISCHE PRÜFUNGEN

Die antitumorale Wirkung von spontan dispergierbaren Konzentraten mit Wirkstoffen gemäss den  
Aufarbeitungsbeispielen No. 1 bis 4 wird anhand folgender Prüfungsergebnisse bestätigt:

25 In vitro-Tests mit geeigneten Tumorzell-Linien

Es wurde ein biologisches Assay-System entwickelt, das mit Mikrotiterplatten und Verdünnungsrei-  
hen arbeitet. Angesetzt werden je  $10^4$ /ml Tumorzellen in Kulturmedium RPMI 1640 mit 10% fötalem Kalbse-  
rum inaktiviert (GIBCO); sie werden so undicht ausgesät, dass sie während des Assays wachsen kön-  
nen, in sog. nichtkonfluenten Monolayers. Die Probenzugabe erfolgt nach 6–24 Stunden, mit  $100 \cdot l$  pro  
30 Reihe, die man im 1. Loch mit  $100 \cdot l$  Medium versetzt. Davon wird die Hälfte entnommen und in das folgen-  
de Loch eingebracht, wieder mit  $100 \cdot l$  Medium versetzt, usf. Es entsteht eine geometrische Verdün-  
nungsreihe n.

Die Proben werden im Plaque Assay während 3–5 Tagen bei 37°C mit 3 · % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschlies-  
send färben/fixieren mit 0,1% Kristallviolett (Fluka, Buchs) in einer Lösung von 70% Methanol, 1% For-  
maldehyd, 29% Wasser. Die Auswertung wird am Mikroskop vorgenommen, Vergrösserung 300fach.  
35 Man bestimmt die grösste zytotoxische Verdünnung. Die quantitative Auswertung lässt sich auch mittels  
Scanning und Absorptionsmessung am Spektrophotometer vornehmen.

40	Tumorlinie Präparat	TSA: Murines Adenocarcinom In Verdünnung wirksam bis 1: 16 h	(Verdünnung auf W.S.-Gehalt berechnet) 40 h
45	C 18:2-ERGOSTEROL	2 000 000	16 000 000
	STIGMASTEROL-AZAFRINAT	28 600 000	28 600 000
	ERGOSTEROL-all trans-RETINAT	800 000	1 600 000
	STIGMASTEROL-GLYCERO-PHOSPHATID	400 000	1 600 000
50	STIGMASTEROL-GLYCERO-THIOPHOSPHATID	10 000 000	20 000 000
	$\beta$ -ÖSTRADIOL-3,17-OLEAT	20 000 000	40 000 000
	TSA: murines Adenocarcinom (spontanes Mamacarcinom) Prof. Guido Forni, Istituto di Microbiologia, Università degli Studi di Torino, Scuola di Medicina.		

55 Die Überprüfung der Wirkung eines solchen spontan emulgierbaren Konzentrates mit einem Gehalt  
von 1000 ppm ERGOSTEROL-LINOLEAT (ERGO-C 18:2) an humanen Leucocyten ergab folgende Werte:

60

65

	Verdünnung	24 h	4 Tage	5 Tage
	1:20	alle Zellen tot	alle Zellen lysiert	–
5	1:80	alle Zellen tot	alle Zellen lysiert	–
	1:200	RBC lysiert	RBC lysiert	–
	1:400	RBC lysiert Leucocyten i.O.	alle Zellen lysiert	–
	1:1000	alle Zellen i.O.	Leucocyten i.O.	Leucocyten i.O.
10	1:5000	alle Zellen i.O.	Leucocyten i.O.	Leucocyten i.O.
	1:20 000	alle Zellen i.O.	Leucocyten i.O.	Leucocyten i.O.

N.B. RBC steht für «Red blood cells», Erythrocyten, rote Blutkörperchen

#### 15 Nachweis der Membran-Penetration an der Tumorzelle

Am Lichtmikroskop wie auch mit Hilfe der «Laser scanning microscopy» lässt sich aufzeigen, dass wenige Stunden nach der Inkubation (Beispiel Py6-Zellen der 3T3-Maus; dünn ausgesät, mittlere Verdünnung der Wirkstoff-Konzentrate) sich ein Kranz von Vakuolen um den Zellkern herum ausbildet.

20 Der analytische Nachweis, dass diese Vakuolen die Sterolester-Wirksamkeiten enthalten, kann sehr deutlich dadurch erbracht werden, dass man den gereinigten, inkubierten Tumorzellen das Zellplasma entnimmt, es zentrifugiert und mit einer 0,05%-Lösung von Uvitex® CF conc. (CIBA-GEIGY) in Aceton/Wasser (85:15), bzw. von Uvitex® EBF oder Tinopal® GS versetzt.

25 Die eingesetzten erfindungsgetreuen Sterolester löschen die durch den Marker Uvitex™ CF conc., bzw. Uvitex® EBF hervorgerufene Fluoreszenz im langwelligen UV-Lichtbereich aus; auf der Dünnschicht-Platte entsteht eine blaue Färbung. UV-Scanning bei 366 nm. Microdialyse mit Hilfe von Kapillar-Electrophorese und Laser induzierter Fluoreszenz-Detektion (EUROPHOR IRIS 2000).

#### Funktionelle Untersuchungen

30 Mit 0,25% ERGOSTEROL-all trans-RETINAT-KONZENTRAT wurden auch Phagozytose- und Respiratory Burst Tests vorgenommen, wobei frisch abgenommenes Heparinblut mit Hilfe von Escherichia coli Bakterien evaluiert wurde. Messung am Flusszytometer (FACS). Es wurde eine eindeutige Dosis-Abhängigkeit der intrazellulär ablaufenden Reaktionen festgestellt, woraus geschlossen werden kann, dass ERGOSTEROL-all trans-RETINAT durch die Zelle aufgenommen wird. (Anawa Laboratorien A.G., Wangen/ZH; Dr. Peter Joller.)

#### Prüfung mit humanen Tumorzell-Linien

40 Das BATTELLE INSTITUT, Frankfurt, (Dr. Matthias GIESE) hat die zytotoxische Wirkung bei verschiedenen soliden, eher langsam wachsenden Tumorarten geprüft. Eingesetzt wurden 2%-Konzentrate (gewichtsmässig) von:

45 A ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT (ERGO-C 11:1)  
B ERGOSTEROL-all trans-RETINAT  
mit folgenden Tumorzell-Linien (DKFZ, Heidelberg, BRD):

1 EJ 28: Blasen-Carcinom  
2 LX-1: Lungencarcinom  
50 3 KTCTL-1M: Nierencarcinom  
4 CX-1: Colon-Adenocarcinom  
5 DAN-C: Pankreas-Carcinom

Als Kontroll-Substanzen wurden biologische «response modifiers» (BRM) verwandt:

55 a rhu Interferon-Gamma (Biozol, BRD)  
b rhu Tumor-Nekrose Faktor Alpha (Biozol, BRD)

60 Ergebnis-Ausweis mittels Verdünnungsreihen und in der Kurzform der IC<sub>50</sub>. (= Inhibitory Concentration; bzw. LC = Lethal Concentration) Inkubierung der Zellen über 24 h, bzw. 72 h bei 37°C; Vitalitäts-Färbetest nach 3, bzw. 14 Tagen. Testbereich 1:10<sup>5</sup> bis 1:10<sup>9</sup>.

Es konnten kleinere Unterschiede zwischen den Zell-Linien, wie auch zwischen den beiden Wirkstoff-Konzentraten festgestellt werden. Die LC<sub>50</sub> lag im Verdünnungsbereich 1:10<sup>6</sup> bis 1:10<sup>7</sup>.

65 Der Hauptbefund der Tests lautet: es liegt eine zytotoxische und keine zytostatische Wirkung vor.  
Der stärkste Zytotoxizitäts-Effekt liess sich für ERGOSTEROL-10-Undecenoat (ERGO-C 11:1) auf

der LX-1-Zellkultur ermitteln. Die Kontroll-Substanzen BRM zeigten keine messbaren Wirkungen auf die 5 geprüften Zell-Linien.

Hingegen konnten durchaus vergleichbare Antitumor-Wirkungen erzielt werden mit Konzentraten, enthaltend:

5

ERGOSTEROL-OLEAT (ERGO-C 18:1)  
 ERGOSTEROL-LINOLENAT (ERGO-C 18:3)  
 ERGOSTEROLESTER-MISCHUNG  
 STIGMASTEROL-GLUCOSID/PHOSPHATID-MISCHUNG

10

Die in der Beilage 1/5 wiedergegebenen graphischen Darstellungen fassen in den Fig. 1 und 2 die Ergebnisse für die beiden ersten Konzentrate für je 5 langsam wachsende humane Tumorarten wie folgt zusammen:

15

Fig. 1 Zytotoxizität für Ergosterol-10-Undecenoat-Konzentrat  
 Fig. 2 Zytotoxizität für Ergosterol-all trans Retinat-Konzentrat

Prüfungen beim National Cancer Institute, Bethesda

20

Im breit ausgebauten «in-vitro assay» des NCI werden gegenwärtig standardmässig 60 verschiedene humane Tumorarten als Zell-Linien eingesetzt, gruppiert in die 8 Panels (statistischen Klassen):

25

Leukämie  
 Lungentumore, nicht-kleinzellig  
 Lungentumore, kleinzellig  
 Colontumore  
 ZNS-Tumore  
 Ovariencarcinome  
 Nierencarcinome

30

Als Messgrössen werden ausgewiesen

35

PG (Percentage Growth)  
 Dose-Response-Curves  
 Mean Graphs

Percentage Growth (Prozent-Wachstum) ist eine optische Dichtemessung mit Hilfe des Sulforhodamin B Färbe- und Vitalitätstests; Exposition der Zellen 48 h, in 5 verschiedenen Konzentrationen.

40

Dose-Response-Curves: Konzentrations-Abhängigkeit der Antitumorwirkung, dargestellt in Kurvenform als Dosis-Wirkung-Beziehung.

Die PG-Werte werden gegen  $\log_{10}$  der entsprechenden Konzentration jeder einzelnen Zell-Linie aufgetragen. Gezeigt werden die PG-Werte für +50, 0, -50. An den Schnittpunkten lassen sich die Werte für  $G_{150}$ ,  $TG_1$  und  $LC_{50}$  ablesen. Die ganze Matrix zeigt interpolierte Response Parameter für die Sensibilität der einzelnen Zell-Linie gegenüber der Prüfsubstanz, bzw. dem Prüfkonzentrat.

45

Mean Graphs: Mittelwert-Graphen, abgeleitet von den IC-Werten (= Inhibition Concentration). Ausgewiesen werden das arithmetische Mittel des Logarithmus der IC-Werte für alle Zell-Linien-Messwerte für eine gegebene Prüfsubstanz, bzw. ein gegebenes Prüfsubstanzkonzentrat, sowie die Abweichungen davon als Mass der relativen Sensitivität der einzelnen Zell-Linien. Die Abweichungen zeigen, ob die Empfindlichkeit der einzelnen Zell-Linien grösser oder kleiner als der Durchschnitt ist. Es entsteht ein «Fingerprint Muster».

50

Als Hauptergebnis resultiert, wie bei den Prüfungen am Battelle Institut, dass nicht nur ein Antiproliferations-effekt, d.h. eine Wachstumshemmung vorliegt, sondern eine echte Zytotoxizität, insbesondere auch bei jenen Zell-Linien, welche keine kurzen Verdoppelungszeiten aufweisen und deshalb vergleichsweise gegenüber langsamer wachsenden Linien als überempfindlich erscheinen. Die Wirksamkeit der Konzentrate ist nicht auf einzelne, spezifische Tumore beschränkt, sondern manifestiert sich mehr oder weniger stark bei allen Arten in allen 8 Klassen. Dies weist auf ein generelles antitumorales Prinzip hin. Der Vorteil gegenüber einer bloss cyto-statischen Wirkung mit ihrem bekannten ungünstigen Einfluss auf die Stammzellen und somit auf die Blutbildung ist evident.

55

Vgl. im übrigen: Michael R. Boyd: Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen, PPO updates, Vol 3, Oct. 1989, Number 10.

60

Anne Monks et al.: Feasibility of a high-flux Anticancer Drug Screen using a diverse Panel of cultured human Tumor Cell Lines. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 83, No. 11, June 5, 1991.

Auf den Beilagen 2/5 bis 5/5 wird eine Auswertung in Matrix-Form der Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die untersuchten 8 Tumor-Klassen für die folgenden Antitumor-Mittel gegeben:

65

Fig. 3 und 4: ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT-KONZENTRAT (Beilagen 2/5 und 3/5)  
Fig. 5 und 6: ERGOSTEROL-all trans-RETINAT-KONZENTRAT (Beilagen 4/5 und 5/5)

Leberschranke

5 Die Prüfung wurde an der perfundierten, in situ belassenen Rattenleber vorgenommen. Eingesetzt wurden erfindungsgemässe, spontan dispergierbare Konzentrate, welche 2% ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT, bzw. 2%-ERGOSTEROL-all trans-RETINAT enthielten und welche mit destilliertem Wasser 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und mit Ringerlösung injiziert wurden. Die Arbeiten wurden in verdankenswerter Weise vom Institut für klinische Pharmakologie der Universität Bern (Prof. Dr. R. PREISIG) durchgeführt. Entnahme von je 15 Fraktionen innert 20 Minuten. Die analytische Auswertung geschah mittels Zonen-Kapillar-Elektrophorese (12 kV konstant) mit einem Gerät von Beckman Instruments (P/ACE System 2000, Version 1.50),  
10 Ergebnis: Die Wirksubstanzen passieren, auch in der höchsten geprüften Konzentration von 1:10 (= 2000 ppm), innerhalb von je 10–12 Minuten die hepatische Barriere vollständig.  
15

Patentansprüche

20 1. Sterolester, bzw. Sterolphosphatide der Formeln (I) bis (XV)

25

30

35

40

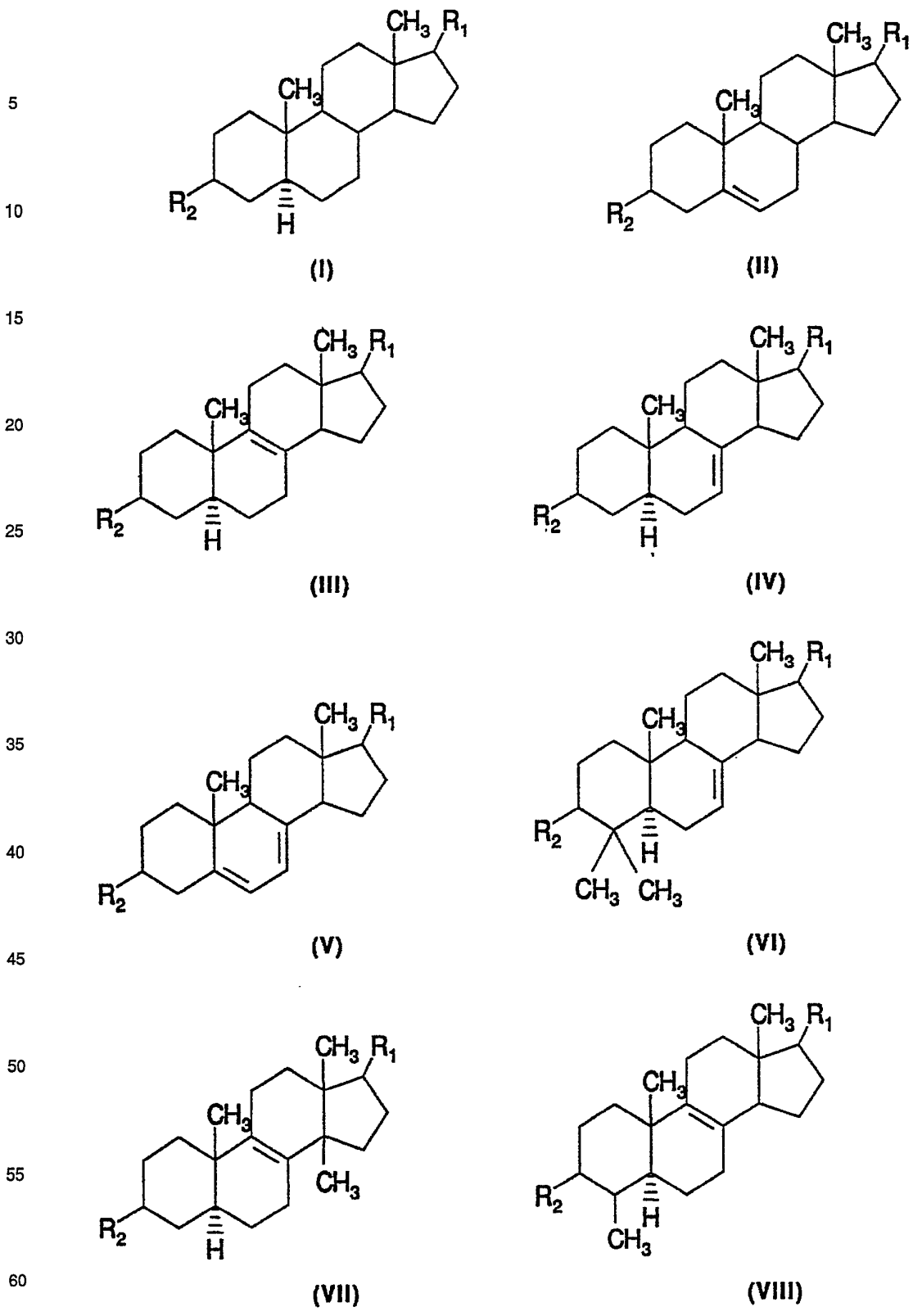
45

50

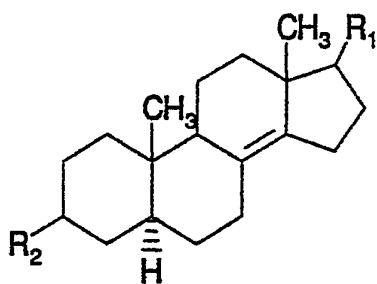
55

60

65

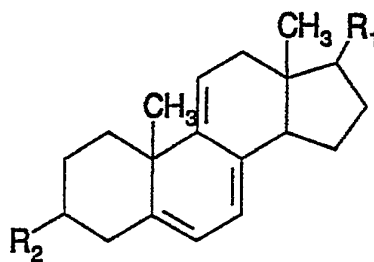


5



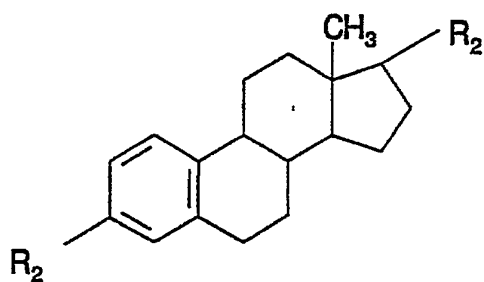
(IX)

10



(X)

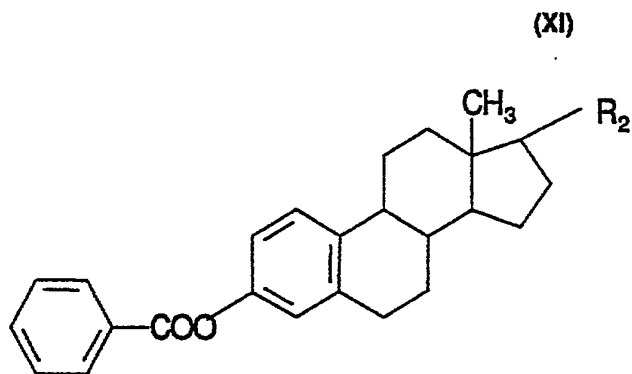
15



(XI)

20

25



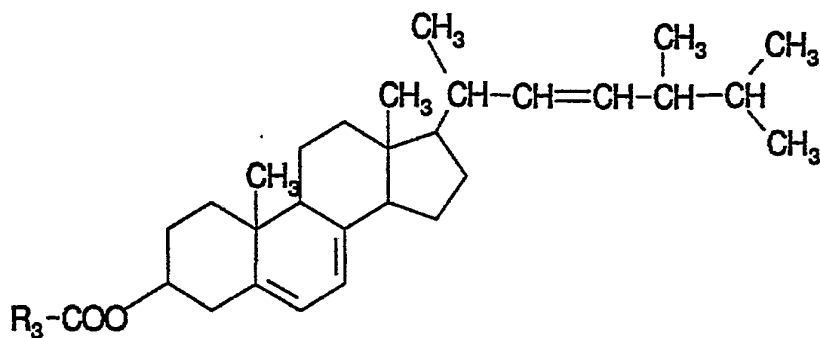
(XII)

30

35

40

45



(XIII)

50

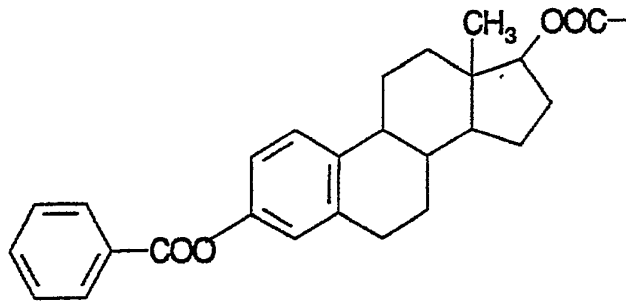
55

60

65

5

10

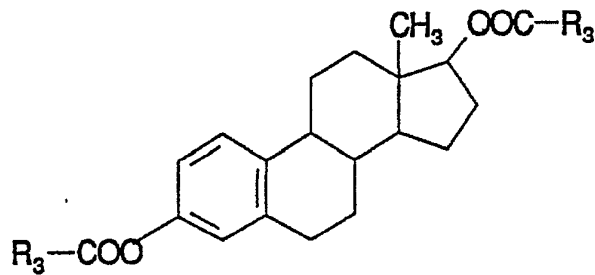


(XIV)

15

20

25

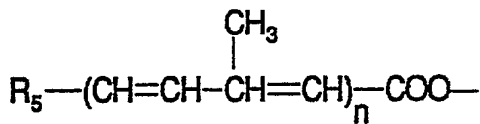


(XV)

30

wobei in den Formeln (I) bis (X) das Radikal R<sub>1</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkenyl-  
gruppe und das Radikal R<sub>2</sub> in den Formeln (I) bis (XII) eine Gruppe der Formeln (XVI) oder (XVII) ist

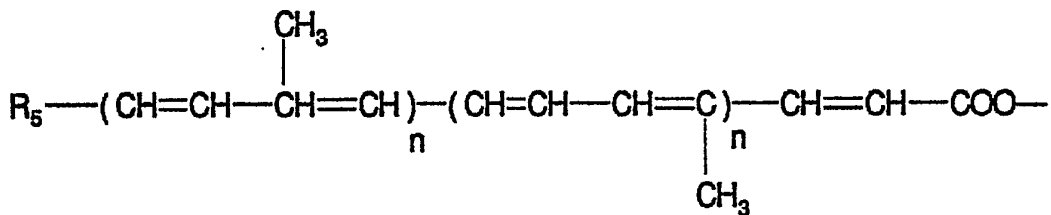
35



40

(XVI)

45



50

(XVII)

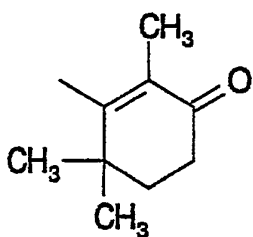
55

worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bezeichnet und R<sub>5</sub> für die Radikale der Formeln:

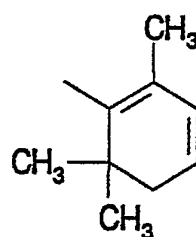
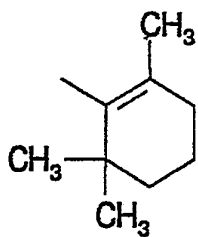
60

65

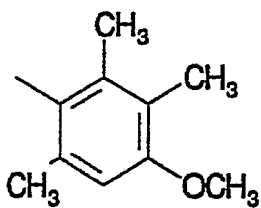
5



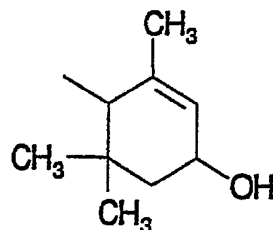
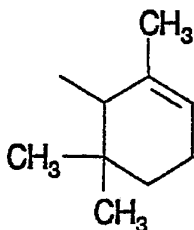
10



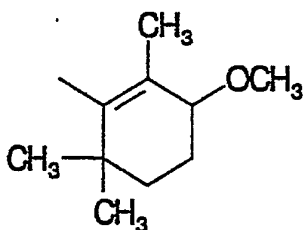
15



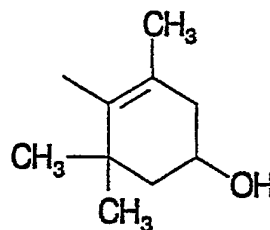
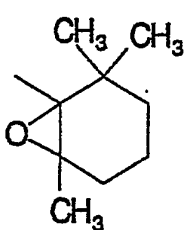
20



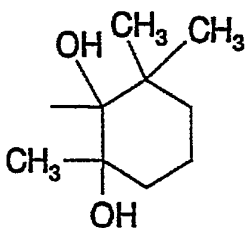
25



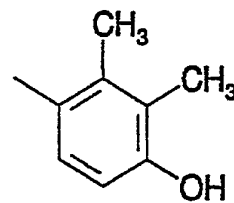
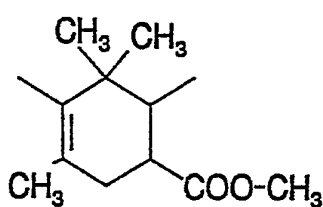
30



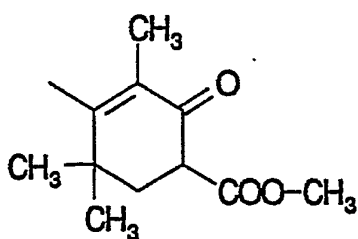
35



40

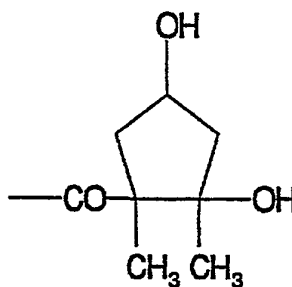


45



50

oder

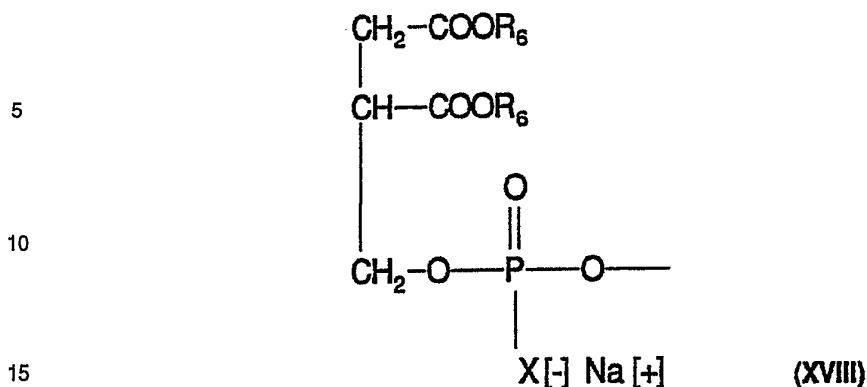


55

steht oder aber die Gruppe gemäss der Formel (XVIII) darstellt

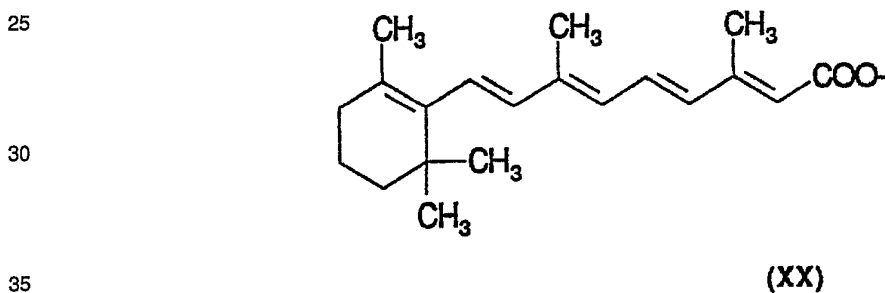
60

65

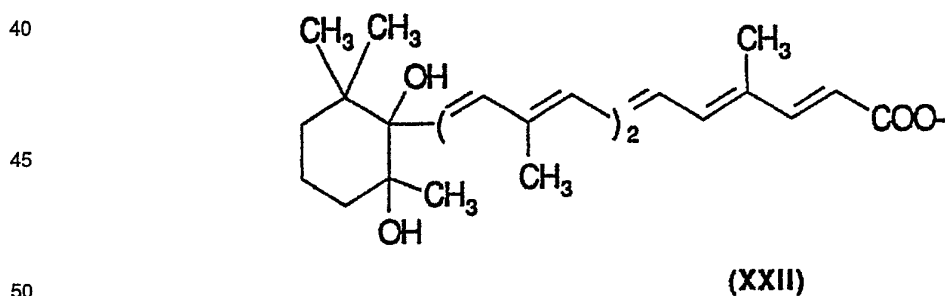


in welcher  $R_6$  eine  $C_1$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl- bzw. Alkylpolyengruppe und X Sauerstoff oder Schwefel bedeuten, und wobei  $R_3$  in den Formeln (XIII) bis (XV) für eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkylgruppe oder eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl- bzw. Alkylpolyengruppe steht.

20 2. Eine Verbindung gemäss Anspruch 1, wobei in den Formeln (I) bis (X) das Radikal  $R_1$  eine  $C_1$ - bis  $C_{10}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{10}$ -Alkenylgruppe bedeutet und das Radikal  $R_2$  in den Formeln (I) bis (XII) für eine Verbindung der Formel (XX) steht



oder die Verbindung (XXII) bezeichnet:

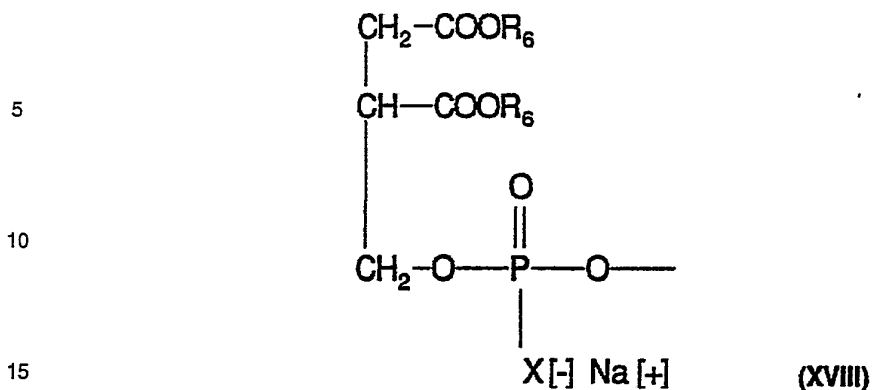


oder aber die Gruppe gemäss Formel (XVIII) bestimmt

55

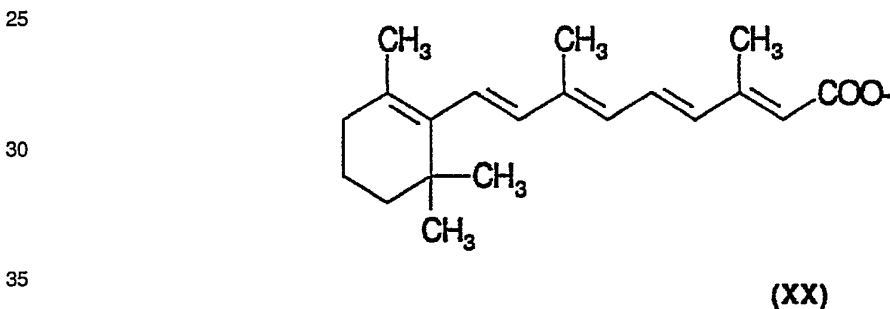
60

65

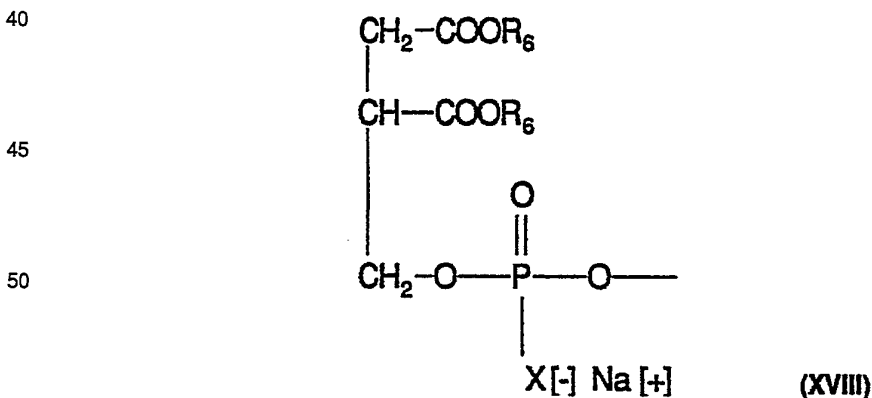


20 In welcher R<sub>6</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>32</sub>- Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe ist, X Sauerstoff oder Schwefel darstellt, und wobei zudem R<sub>3</sub> in den Formeln (XIII) bis (XV) für eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe steht.

3. Eine Verbindung gemäss Anspruch 2, wobei in den Formeln (I) bis (X) das Radikal R<sub>1</sub> eine C<sub>8</sub>- bis C<sub>10</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>8</sub>- bis C<sub>10</sub>- Alkenylgruppe bedeutet, das Radikal R<sub>2</sub> in den Formeln (I) bis (XII) für eine Gruppe der Formel



steht oder die Gruppe der Formel (XVIII) bezeichnet



worin R<sub>6</sub> eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe ist, X Sauerstoff oder Schwefel darstellt, und wobei R<sub>3</sub> in den Formeln (XIII) bis (XV) für eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>4</sub>- bis C<sub>22</sub>-Alkenyl- bzw. Alkapolylengruppe steht.

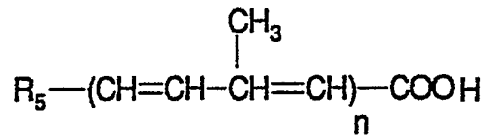
4. Eine der folgenden Verbindungen gemäss Anspruch 3

- 60 Stigmasterol-all-trans-retinat  
 Stigmasterol-13-cis-retinat  
 Ergosterol-all-trans-retinat  
 Ergosterol-13-cis-retinat  
 Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycero-phosphatid  
 65 Stigmasterol-1,2-dipalmitoyl-glycero-thiophosphatid

- Ergosterolcrotonat
- Ergosterolcaprylat
- Ergosterol-10-undecenoat
- Ergosterollaurat
- 5 Ergosterol-2-trans-dodecenoat
- Ergosterolpalmitat
- Ergosteroleat
- Ergosterollinoleat
- Ergosterollinolenat
- 10  $\beta$ -Östradiol-3,17-diundecenoat
- $\beta$ -Östradiol-3,17-dioleat
- $\beta$ -Östradiol-3,17-diretinat
- 15  $\beta$ -Östradiol-3-benzoat-17-undecenoat
- $\beta$ -Östradiol-3-benzoat-17-retinat.

5. Verfahren zur Herstellung von Sterolestern der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formeln (XXIII), bzw. (XXIV)

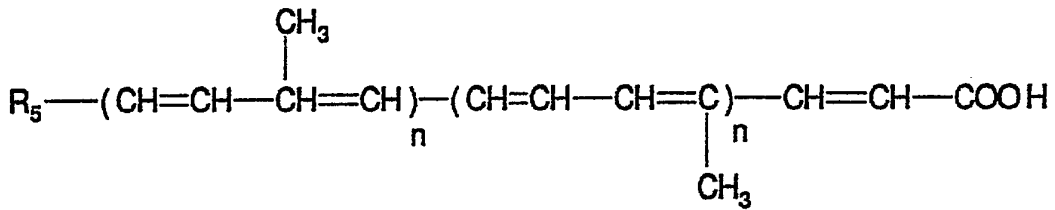
20



25

(XXIII)

30



35

40

(XXIV)

worin n die Zahlen 1, 2, 3, 4 oder 5 bedeutet und R<sub>5</sub> für die Radikale der folgenden Formeln

45

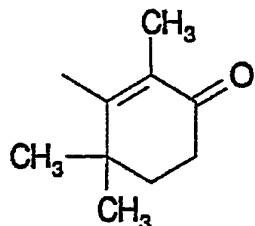
50

55

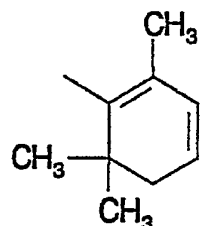
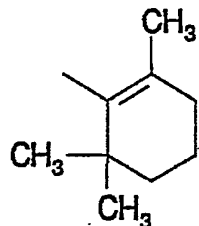
60

65

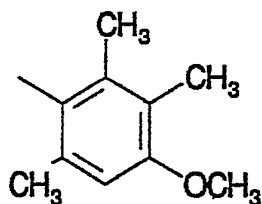
5



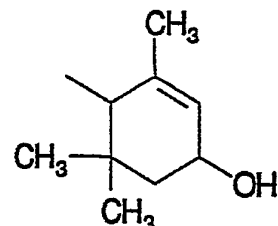
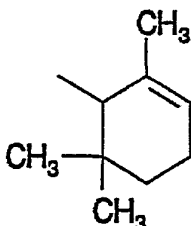
10



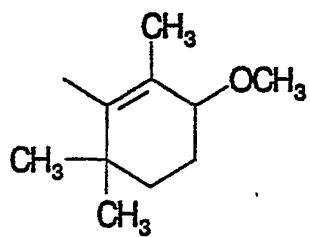
15



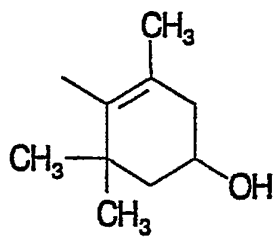
20



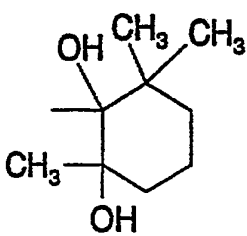
25



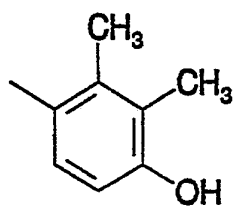
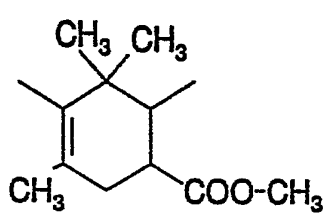
30



35

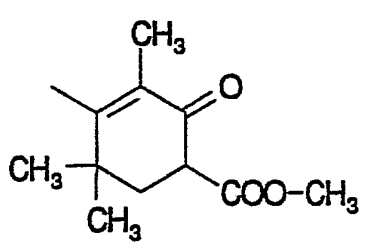


40



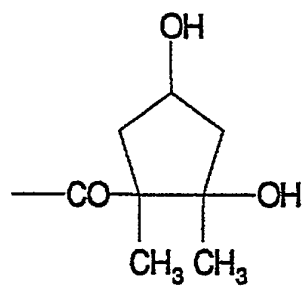
45

50



55

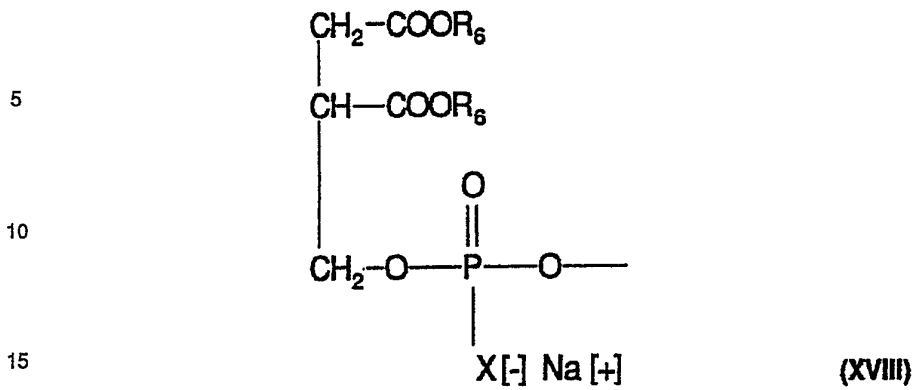
oder



60

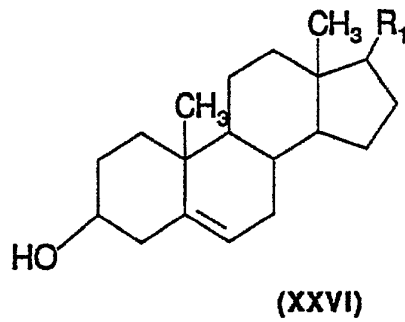
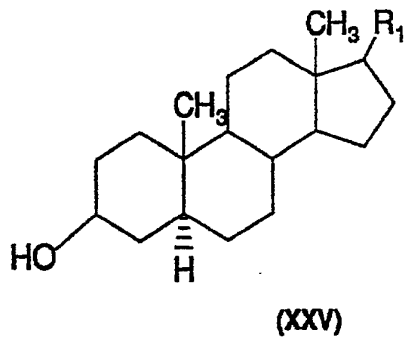
steht oder aber die Gruppe gemäss Formel (XVIII) darstellt

65

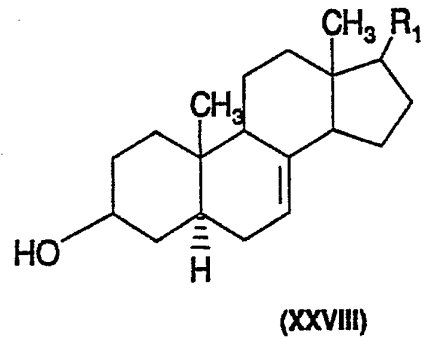
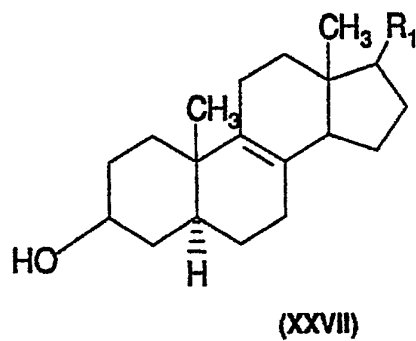


mit N,N'-Carbonyldiimidazol bei 25 bis 70°C unter Zusatz einer katalytischen Menge eines Alkoholates in einem indifferenten Lösungsmittel umgesetzt und anschliessend das entstandene Imidazolot mit einem Sterol der Formeln (XXV) bis (XXXVII)

20



35



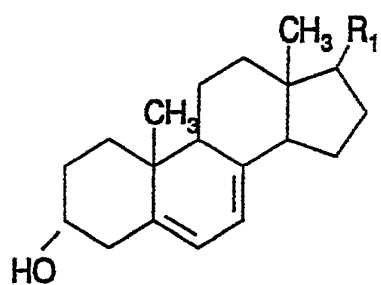
50

55

60

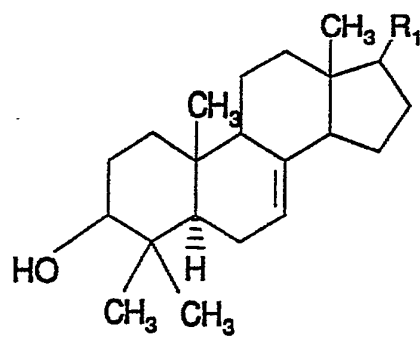
65

5



(XXIX)

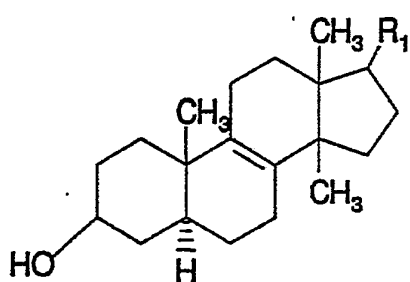
10



(XXX)

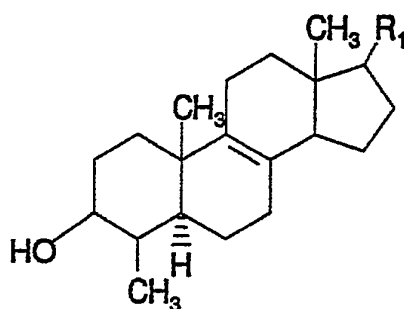
15

20



(XXXI)

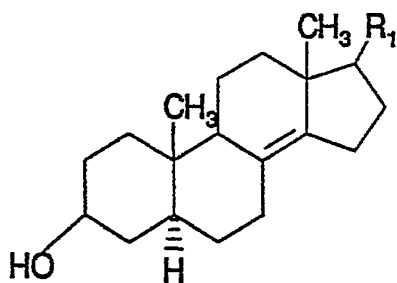
25



(XXXII)

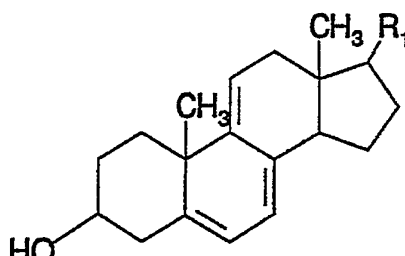
30

35



(XXXIII)

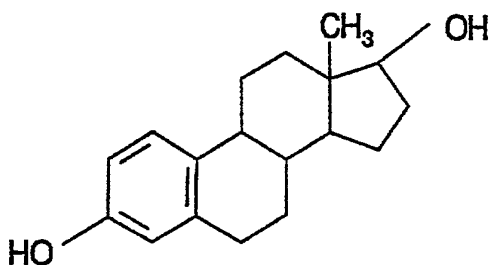
45



(XXXIV)

50

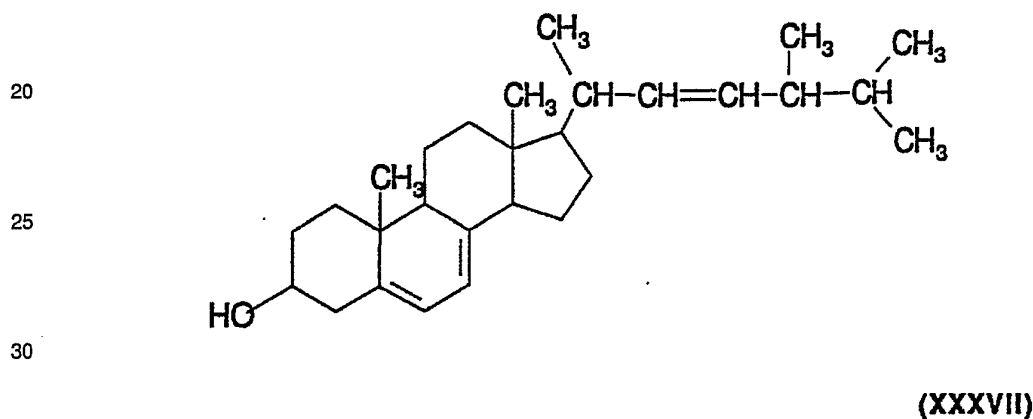
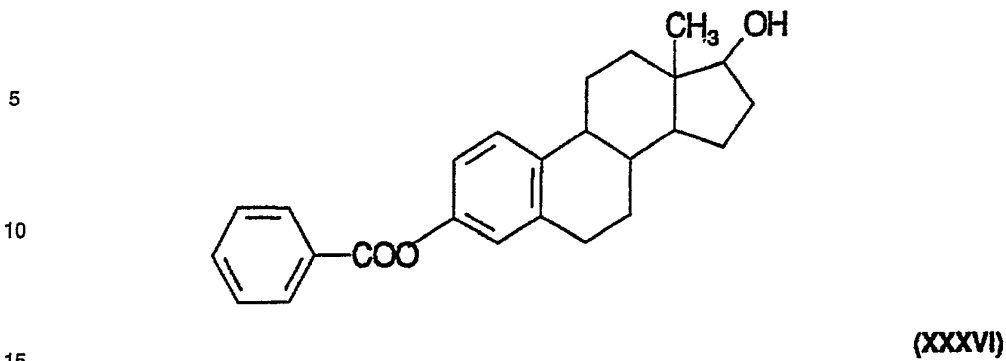
55



(XXXV)

60

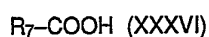
65



35 worin das Radikal  $R_1$  für eine  $C_1$ - bis  $C_{10}$ -Alkyl- oder eine  $C_2$ - bis  $C_{10}$ -Alkenylgruppe steht, reagieren lässt.

40 6. Verfahren zur Herstellung von Sterolestern der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel (XXIII) gemäss Anspruch 5 mit einem Chlorierungs-, bzw. Bromierungsmittel in das Säurechlorid, bzw. in das Säurebromid überführt und diese dann mit einem Sterol der Formeln (XXV) bis (XXXVII) gemäss Anspruch 5 bei einer Temperatur von 40 bis 120°C in einem indifferenten Lösungsmittel und in Gegenwart eines Katalysatoren umsetzt.

45 7. Verfahren zur Herstellung von Sterolestern der Formeln (XII), (XIV) oder (XV) gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel (XXXVI)



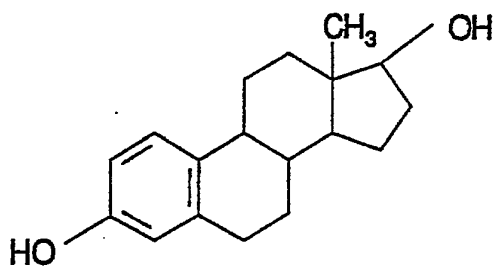
50 worin  $R_7$  eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkyl- oder eine  $C_4$ - bis  $C_{32}$ -Alkenyl-, bzw. Alkapolengruppe bedeutet, mit einem Chlorierungs-, bzw. Bromierungsmittel in das Säurechlorid, bzw. in das Säurebromid überführt und diese dann mit einem der Sterole der Formeln (XXXV), (XXXVI) oder (XXXVII)

55

60

65

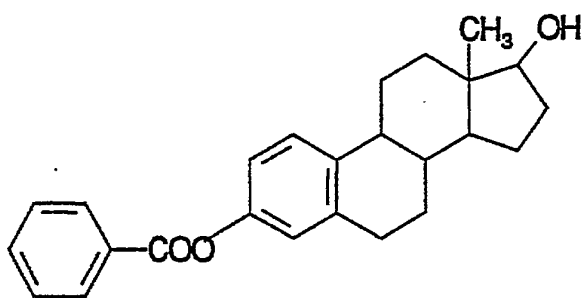
5



(XXXV)

10

15

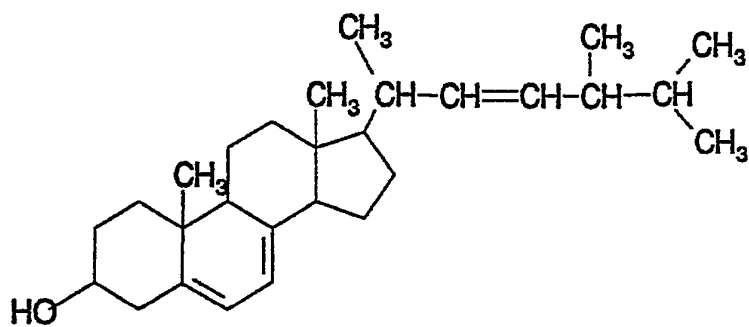


(XXXVI)

25

30

35



(XXXVII)

45

50

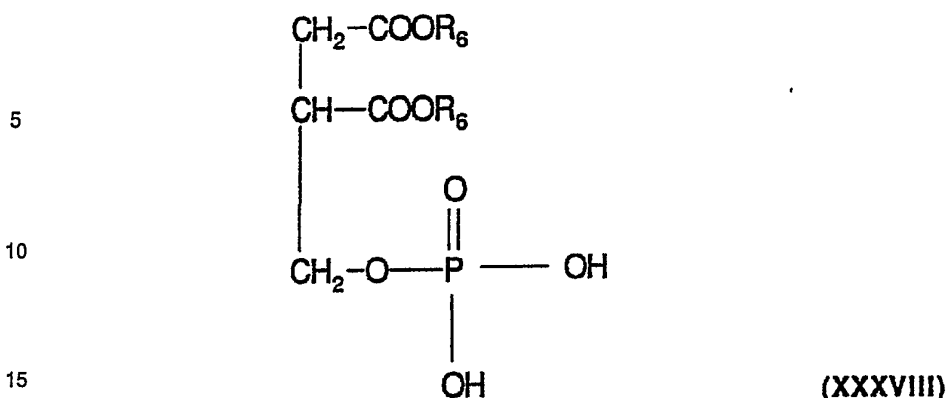
reagieren lässt.

8. Verfahren zur Herstellung von Sterolphosphorverbindungen der Formeln (I) bis (XII) gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel (XXXVIII)

55

60

65



worin R<sub>6</sub> eine C<sub>1</sub>- bis C<sub>32</sub>-Alkyl- oder eine C<sub>2</sub>- bis C<sub>32</sub>- Alkenyl-, bzw. Alkapolylengruppe bedeutet, in einem inerten Lösungsmittel mit Pivaloylchlorid umgesetzt und dann mit einem Sterol der Formeln (XXV) bis (XXXVII) reagieren lässt.

9. Spontan dispergierbares Konzentrat, dadurch gekennzeichnet, dass es als antitumorale Komponente

0,001 bis 25 Gewichts-% eines Sterolesters, bzw. einer Sterolphosphorverbindung der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, bzw. einer Kombination solcher Komponenten, sowie

0 bis 40 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches

0,001 bis 90 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

0 bis 10 Gewichts-% einer freien Fettsäure, Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel enthält.

10. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es als antitumorale Komponente

0,001 bis 15 Gewichts-% eines Sterolesters, bzw. einer Sterolphosphorverbindung der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, bzw. einer Kombination solcher Komponenten, sowie

0 bis 40 Gewichts-% eines als Hydrotrop, bzw. Co-Emulgator dienenden, pharmaverträglichen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches

0,001 bis 85 Gewichts-% eines pharmaverträglichen Tensides oder Tensidgemisches

0 bis 10 Gewichts-% eines Vitamins oder Provitamins,

0 bis 10 Gewichts-% einer freien Fettsäure, Trägerstoffe und/oder Verdünnungsmittel enthält.

11. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmaverträgliche Tensid oder Tensidgemisch anionaktiv, kationaktiv, amphoter oder nicht-ionogen, vorzugsweise nicht-ionogen, ist und ein hydrophiles-lipophiles Verhältnis zwischen 2 bis 6 einerseits und 10 bis 15 andererseits hat und dass das Hydrotrop, bzw. der Co-Emulgator ein aliphatischer Carbonsäureester oder ein Neutralöl ist.

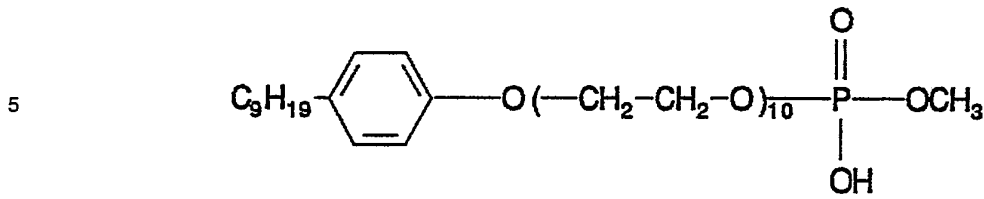
12. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 11 dadurch gekennzeichnet, dass es 7,5 bis 15 Gewichts-% eines Sterolesters oder einer Sterolphosphorverbindung der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, sowie 0 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat oder Isopropylpalmitat oder Neutralöl 20 bis 45 Gewichts-% eines Mischemulgators bestehend aus je 50% der beiden Verbindungen mit Formeln

50

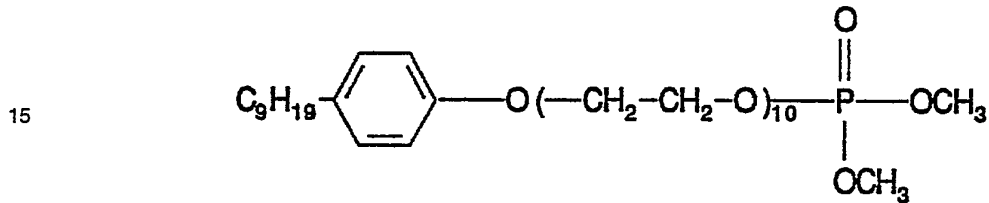
55

60

65



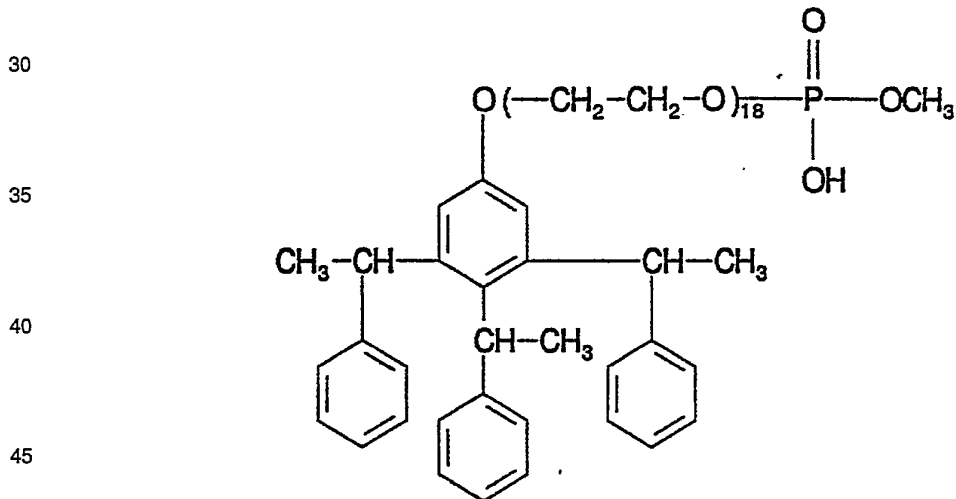
10 und



20 und 20 bis 45 Gewichts-% des tert. Octylphenylpolyoxyäthylenäthers mit 9–10 Oxyäthylengruppen enthält.

13. Spontan dispergierbares Konzentrat gemäss Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es 7,5 bis 15 Gewichts-% eines Sterolesters oder einer Sterolphosphorverbindung der Formeln (I) bis (XV) gemäss Anspruch 1, sowie

25 0 bis 40 Gewichts-% Isopropylmyristat oder Isopropylpalmitat oder Neutralöl 20 bis 45 Gewichts-% eines Emulgators der Formel



und 20 bis 45 Gewichts-% des tert. Octylphenylpolyoxyäthylenäthers mit 9–10 Oxyäthylengruppen enthält.

50 14. Therapeutisches Systempräparat, welches 1 bis 95 Gewichts-% des spontan dispergierbaren Konzentrates gemäss Anspruch 9 enthält und welches in Dosis-Einheitsform als Micropellets, Granulat, Dragées, Suppositorien, Ampullen oder als Kapseln vorliegt.

15. Therapeutisches Systempräparat gemäss Anspruch 14, welches 44 Teile Kernmaterial für die Granulat-, bzw. Pellet-Bildung, 25 Teile eines erfindungsgemässen Konzentrates und 31 Teile magensaftresistente und retardierende Beschichtung mit Hydroxypropyl-Methylcellulose-Acetat-Succinat enthält.

55 16. Therapeutisches Systempräparat gemäss Anspruch 14, welches 64 Teile Kernmaterial für die Granulat-, bzw. Pellet-Bildung und 36 Teile eines erfindungsgemässen Konzentrates enthält.

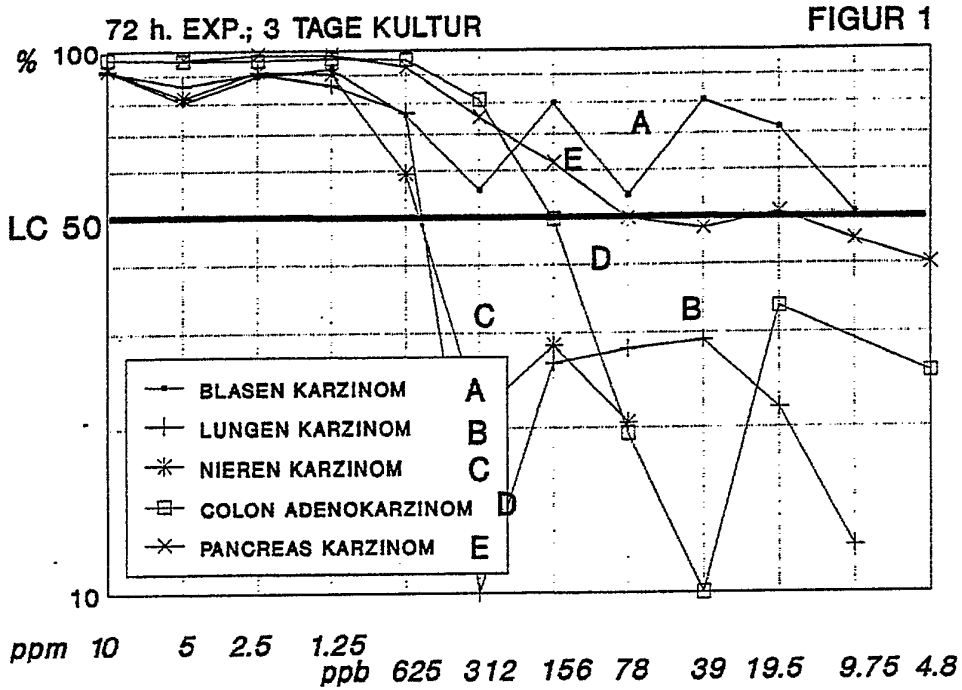
60

65

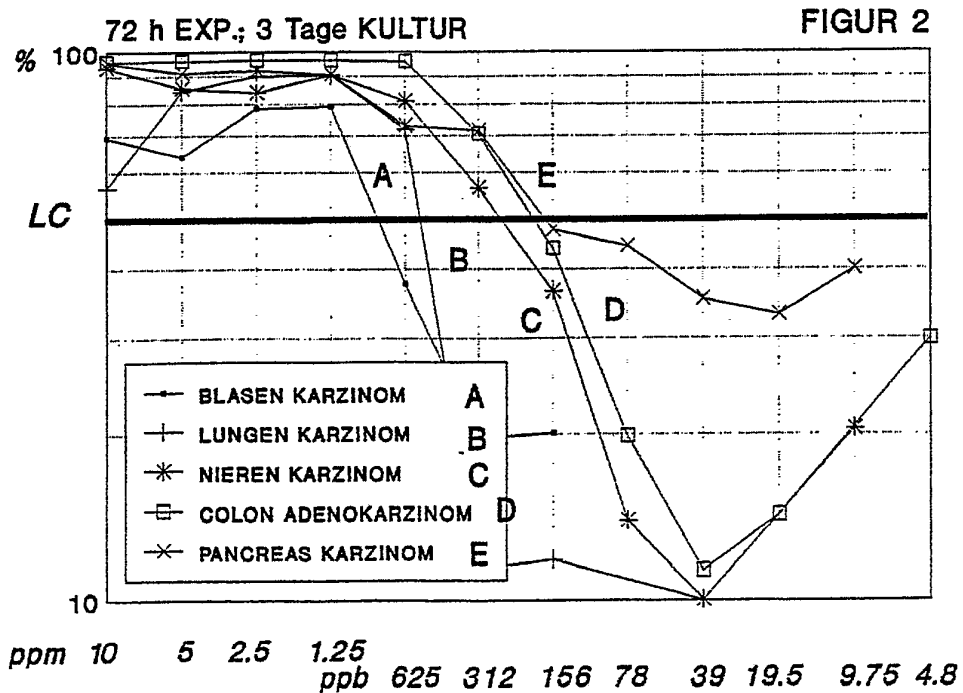
BATTELLE INSTITUT, FRANKFURT  
 IN VITRO TESTS MIT SOLIDEN HUMANTUMOREN

ZYTOTOXIZITÄT LC<sub>50</sub> = 50% ABTÖTUNG

ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT  
 2% - KONZENTRAT



ERGOSTEROL-all trans-RETINAT  
 2% - KONZENTRAT



NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA  
ENTWICKLUNGSPROGRAMM FÜR THERAPEUTICA

ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT-KONZENTRAT  
MATRIX DER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG I

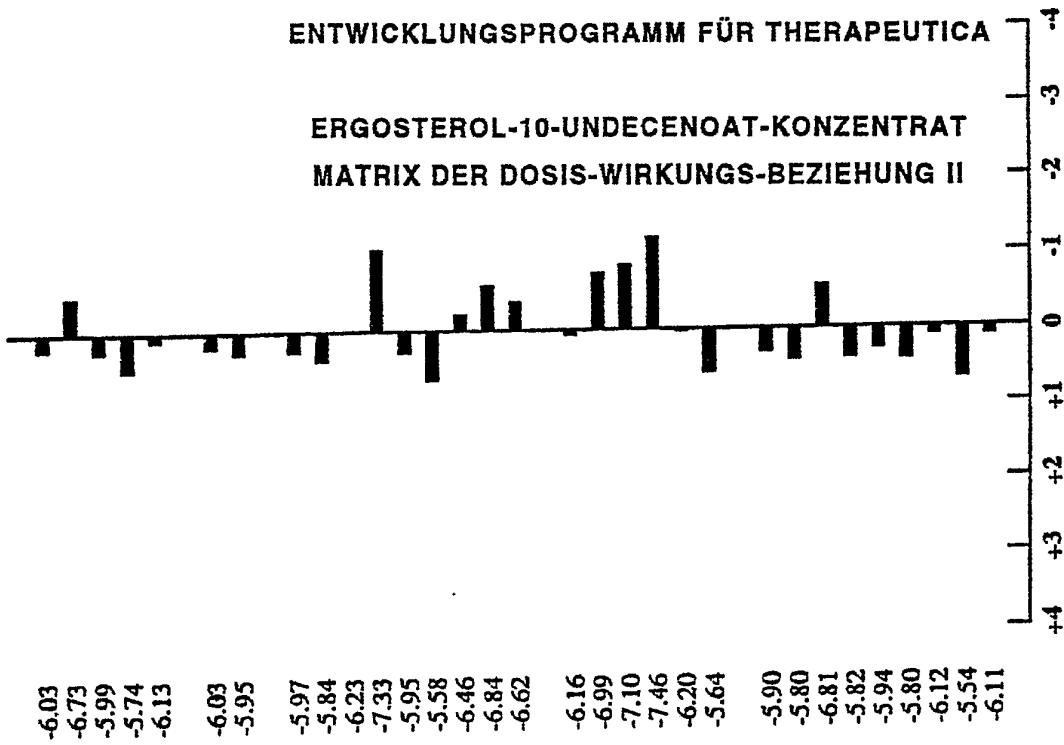
NSC: D-647440 -W/I		Exp. ID: 9110NS31	
		Stain: PROTEIN-51	
Test Date: October 28, 1991		SSPL: ODFP	
Report Date: January 8, 1992			
NCI Developmental Therapeutics Program Dose Response Matrix		GI50	GI50
Log <sub>10</sub> Concentration (Molar)	Panel/Cell Line	Log <sub>10</sub> GI50	GI50
PG (-6.1)			
-4.1	Leukemia		
-5.1	CCR6-CEM	-6.26	
-6.1	HL-60(TB)	-6.73	
-7.1	K-562	-6.66	
-8.1	MOLT-4	-6.03	
	RPMI-8226	-6.10	
	SR		
	Non-Small Cell Lung Cancer		
	A549/ATCC	-6.00	
	BKVX	-5.89	
	HOP-18	-5.67	
	HOP-62	-6.02	
	HOP-92	-5.89	
	NCI-H226	-5.97	
	NCI-H23	-7.69	
	NCI-H322M	-5.77	
	NCI-H460	-5.74	
	NCI-H522	-7.25	
	LXPL 529	-6.60	
	Small Cell Lung Cancer		
	DMS 114	-7.24	
	DMS 273	-6.08	
	Colon Cancer		
	COLO 205	-6.48	
	DLD-1	-5.94	
	HCC-2998	-5.73	
	HCT-116	-6.60	
	HCT-15	-5.94	
	HT29	-6.82	
	KM12	-6.07	
	KM20L2	-6.10	
	SW-620	-5.74	

2  
7

5  
6

NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA  
ENTWICKLUNGSPROGRAMM FÜR THERAPEUTICA

ERGOSTEROL-10-UNDECENOAT-KONZENTRAT  
MATRIX DER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG II



CNS Cancer

SF-268  
SF-295  
SF-539  
SNB-19  
SNB-75  
SNB-78  
U251  
XF 498

Melanoma

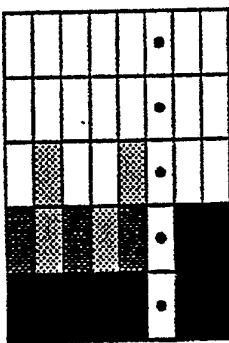
LOX IMVI  
MALME-3M  
M14  
M19-MEL  
SK-MEL-2  
SK-MEL-28  
SK-MEL-5  
UACC-257  
UACC-62

Ovarian Cancer

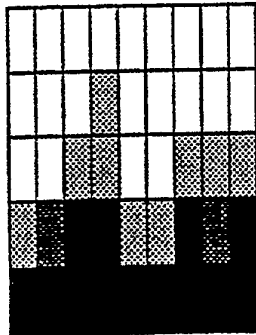
IGROV1  
OVCAR-3  
OVCAR-4  
OVCAR-5  
OVCAR-8  
SK-OV-3

Renal Cancer

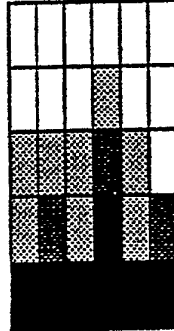
786-0  
A498  
ACHN  
CAKI-1  
RXF-393  
RXF-631  
SN12C  
TK-10  
UO-31



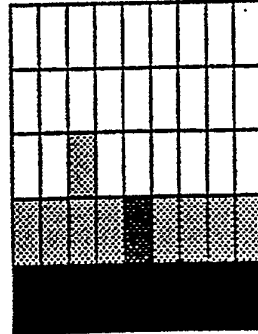
57  
33  
64  
60  
50  
60  
73



58  
79  
47  
19  
59  
92  
34  
27  
36



49  
39  
25  
-3  
47  
105



60  
65  
34  
70  
64  
72  
50  
74  
51

PG > GI50  
PG ≤ GI50  
PG ≤ TGI  
PG ≤ LC50

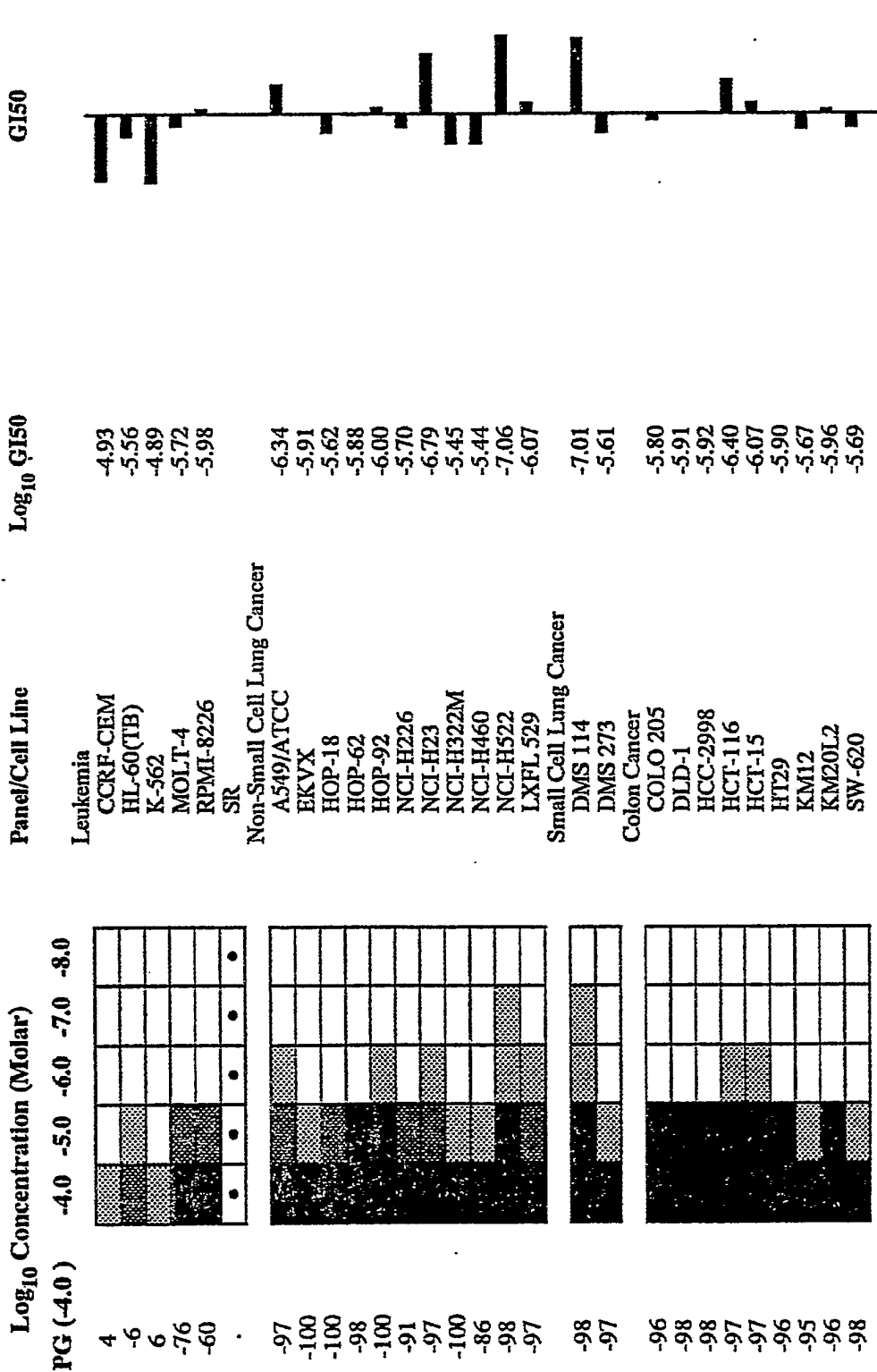
D<sub>GI50</sub> = 49.0 (-6.1)  
D<sub>TGI</sub> = 49.0 (-5.1)  
D<sub>LC50</sub> = 28.0 (-5.1)  
D<sub>H</sub> = 50.88 (-6.1)

MG\_MID GI50 = -6.24  
Delta = 1.46  
Range = 2.15  
MGD<sub>H</sub> = 47.37

NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA  
 ENTWICKLUNGSPROGRAMM FÜR THERAPEUTICA

ERGOSTEROL-all trans-RETINAT-KONZENTRAT  
 MATRIX DER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG I

<b>NCI Developmental Therapeutics Program Dose Response Matrix</b>		NSC: D-647441 -X/1	Exp. ID: 9110NS31
		Test Date: October 28, 1991	Stain: PROTEIN-51
		Report Date: January 8, 1992	SSPL: OBFP



NATIONAL CANCER INSTITUTE, BETHESDA  
 ENTWICKLUNGSPROGRAMM FÜR THERAPEUTICA

ERGOSTEROL-all trans-RETINAT-KONZENTRAT  
 MATRIX DER DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG II

