



NORGE

(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) № 158380

(51) Int. Cl.⁴ C 07 J 13/00

(83)

(21) Patentsøknad nr. 861695
(22) Inngivelsesdag 29.04.86
(24) Lopedag 22.07.81

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr. 812509

(71)(73) Søker/Patenthaver MERRELL DOW PHARMACEUTICALS INC.,
2110 E. Galbraith Road,
Cincinnati, OH 45215, USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 24.01.83
(44) Utlegningsdag 24.05.88

(72) Oppfinner BRIAN W. METCALF, Mason, OH,
J. O'NEAL JOHNSTON, Milford,
OH, USA.

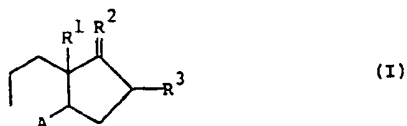
(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor A-S, Oslo.

(30) Prioritet begjært Ingen.

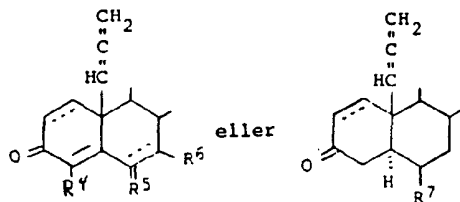
(54) Oppfinnelsens benevnelse NYE 10-(1,2-PROPADIENYL)STEROIDER OG ANTIKONSEPSJONS-
MIDLER INNEHOLDENDE DISSE.

(57) Sammendrag

Nye 10-(1,2-propadienyl)steroider
av generell formel



hvor A er lik



hvor --- betegner en enkelt- eller en
dobbelbinding;

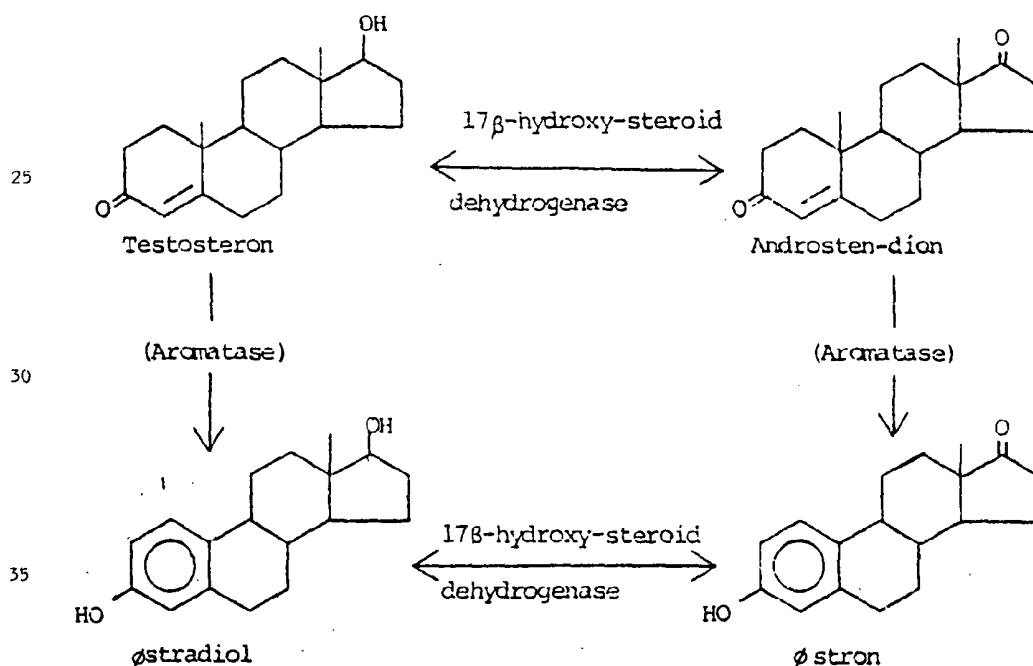
R^1 er methyl eller ethyl;
 R^2 er (H) (OR^8) eller $=\text{O}$;
 R^3 er H eller C_{1-3} -alkyl;
 R^4 er H eller OR^8 ;
 R^5 er H, O eller (H) (C_{1-3} -alkyl);
 R^6 og R^7 er hver H eller C_{1-3} -alkyl; og
 R^8 er H eller C_{2-4} -alkanoyl,
kan anvendes som aktiv bestanddel i
antikonsepsjonsmidler.

(56) Anførte publikasjoner USA (US) patent nr. 3102127, 3476781.

Foreliggende oppfinnelse angår nye 10-(1,2-propadienyl)-steroider som er irreversible inhibitorer av aromatase-
 enzymer, og antikonsepsjonsmidler inneholdende disse.

Innbyrdes forskjellige kjønnshormoner som syntetiseres
 av kjønnskjertlene og i mindre grad av binyrene er i første
 rekke ansvarlig for tilkjennegivelsen av sekundær kjønnska-
 rakteristikk av enten menn eller kvinner. Disse steroider
 reguleres av et flertall enzymer. Enzymaromatase er det
 hastighetsbegrensende enzym i omdannelsen av androgener
 (mannlige hormoner) til østrogen (kvinnelige hormoner).
 Den ikke-reversible omdannelse av androgener til østrogen
 innbefatter også oksydasjonen og elimineringen av methylgrup-
 pen fra C10 som maursyre. 1 β - og 2 β hydrogenene fra C1 og
 C2 tapes også under dannelse av den aromatiske A-ring i øs-
 trogenene. Androgenene, testosteron og androstendion, eller
 østrogenene, østradiol og østron kan mellomomdannes av 17 β -
 hydroxy-steroid-dehydrogenase (fig. 1).

Fig. 1 - Enzymatisk mellomomdannelse av androgener og
 østrogen



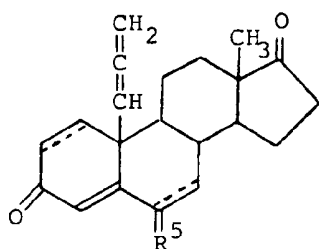
158380

2

Reguleringen av omdannelsen av androgen til østrogen eller inhiberingen av denne omdannelse har anvendelse ved regulering av kliniske tilstander som potensieres av nærværet av østrogener.

Aromataseinhibitorer har vist seg å være effektive ved behandling av mannlig sterilitet og når det gjelder forhindring av den østrogenproduksjon som er nødvendig for eggløsning hos kvinner. Da østrogensyntesen er nødvendig for implantering av befruktet egg i mange arter, har postcoital administrering av aromataseinhibitorer den styrke at de regulerer befruktningen.

Oppfinnelsen angår således nye 10-(1,2-propadienyl)-steroider, hvilke steroider er kjennetegnet ved at de har generell formel I



(I)

hvor --- betegner en enkelt- eller dobbeltbinding, og R_5 er oxygen eller to hydrogenatomer.

Forbindelsene kan fremstilles som beskrevet i norsk utlegningsskrift 156.694.

De nye forbindelser har en høy affinitet overfor aromatase-enzymet. I tillegg bindes aromatase-inhibitorerne til enzymet på en tidsavhengig måte og inaktiverer derved enzymet progressivt.

Den aromataseinhiberende virkning av forbindelsene kan studeres under anvendelse av et radioenzymatisk forsøk. Et aromataseenzympreparat fra microsomalfraksjonen isolert fra human placenta anvendes. Stereospesifikk eliminering av 1β og 2β tritiummerker fra androgensubstrater slik som testosteron eller androstendion og etterfølgende tilsynekomst av tritiert vann anvendes for å måle graden av enzymreaksjon under in vitro inkuberinger.

Aromataseinhibitorene ble vurdert med hensyn til enzymaffinitet ved måling av deres konkurrerende inhibering av om-dannelsen av ^3H -testosteron til østrogener. $1\beta, 2\beta$ - ^3H -testosteron (40 - 60 Ci/mM spesifikk aktivitet) ble oppløst i en prøvebuffer for å gi en prøvekonsentrasjon på $1,7 \times 10^{-9}\text{M}$ med ca. 200000 disintegrasjoner pr. minutt i 100 μl . Prøvebuffer inneholder 100 mM KCl, 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM dithiothreitol og 1 mM EDTA ved pH 8,0. ~10 mg inhibitorforbindelser ble oppløst i ethanol og/eller dimethylsulfoxyd og fortynnet med prøvebuffer under dannelsen av prøvekonsentrasjoner varierende fra 10^{-4}M til 10^{-9}M . 100 μl tritiummerket testosteron (substrat) og 100 μl enzyminhibitor ble tilsatt til et 35 ml's sentrifugerør inneholdende 600 μl av et NADPH utviklende system. Aromatase krever NADPH som cofaktor, og derfor er et utviklende system innbefattet som anvender 0,5 mM NADP^+ , 2,5 mM glucose-6-fosfat, og 1,0 enhet/ml glucose-6-fosfatdehydrogenase i prøvebuffer. Enzymreaksjonen startes ved tilsetning av 700 μl aromatasepreparat, vanligvis 50 g microsomal protein pr. ml prøvebuffer. Disse preparater blandes under anvendelse av en hvirvelblander og inkuberes 30 minutter ved 37°C med en 95 % O_2 :5 % CO_2 gassfase i en Dubinoff risteinkubator.

Den enzymatiske reaksjon avsluttes ved tilsetning av 10 ml CHCl_3 . Etter hvirvelblanding 20 sekunder dispergeres de vandige/organiske emulsjoner, og faseseparasjon ble oppnådd etter sentrifugering ved 600 x g i 10 minutter. Dobbelte 500 μl 's prøver av den øvre vandige fase av hver inkuberingsprøve ble tilsatt til 10 x 75 mm dyrkningsrør. Til disse rør ble tilsatt 500 μl kald 0,25 % dextran-belagt kullsuspen-sjon, denne ble hvirvelblandet og inkubert 15 minutter ved

4°C, og derefter sentrifugert ved 2600 x g i en avkjølt sentrifuge (4°C). Supernatantfraksjonen ble dekantert i en 20 ml's scintillasjonsampulle, og 15 ml vandig scintillasjonsvæske ble tilsatt. Radioaktiviteten av $^3\text{H}_2\text{O}$ resulterende fra frigitte 1 og 2 tritiumatomer under den enzymatiske reaksjon ble bestemt ved telling 10 minutter i en væske-scintillasjonsteller. Denne prøveprosedyre er bearbeidet etter prosedyrene beskrevet av Reed et al, J. Biol. Chem., 251, 1625 (1976) og Thompson et al, J. Biol. Chem., 249, 5364 og 5374 (1974).

Den enzymatiske aktivitet står i forbindelse med prosenten av tritium som frigis fra ^3H -testosteron som kommer tilsyne som $^3\text{H}_2\text{O}$. Aktiviteten av hver konsentrasjon av inhibitor beregnes som en prosent av bærerkontrollen, som vilkårlig er satt til 100 %. Den molare konsentrasjon av hver inhibitor som reduserer enzymaktiviteten med 50 % kalles 50 % inhiberingskonsentrasjon, IC_{50} . Disse verdier for en inhibitor ifølge oppfinnelsen, 10-(1,2-propadienyl)østr-4-en-3,17, og referanseforbindelsene aminoglutethimid, androsta-1,4,6-trien-3,17-dion og 1-dehydrotetololacton, er vist i tabell 1. 10-allenylforbindelsen har større enzymaffinitet enn andre kjente inhibitorer, som har vært anvendt som befruktningshindrende midler i gnagere.

25. Tabell 1: Konkurrerende inhibering av aromataseinhibitorer

Inhibitorforbindelse	IC_{50}
10-(1,2-propadienyl)østr-4-en-3,17-dion	$7,5 \times 10^{-8}$
30 α -(p-aminofenyl)- α -ethylglutarimid (aminoglutethimid)	$1,0 \times 10^{-6}$
Androsta-1,4,6-trien-3,17-dion	$1,0 \times 10^{-7}$
1,2,3,4,4a,4b,7,9,10,10a-decahydro- 2-hydroxy-2,4b-dimethyl-7-oxo-1- fenenthren-propionsyre O-lacton 35 (1-dehydrotetololacton)	$2,5 \times 10^{-6}$

Forbindelsene som utviste god inhibering, IC_{50} $10^{-7}M$, ble vurdert med hensyn til tidsavhengig inhibering. I dette forsøk ble inhibitoren preinkubert med enzymet før prøving for enzymaktivitet i nærvær av høye substratnivåer. En tidstilknyttet nedsettelse i enzymaktivitet er indikativ for irreversibel binding av inhibitoren med enzymet.

I det tidsavhengige forsøk tilsettes en mengde av enzyminhibitoren i 100 μl av den tidligere beskrevne prøvebuffer som vil gi prøvekonsentrasjoner som er ca. én og ti ganger IC_{50} verdiene til 35 ml's sentrifugerør inneholdende 600 μl av det ovenfor beskrevne NADPH utviklende system. Preinkuberingen startes ved tilsetning av 700 μl aromatasepreparat, vanligvis 500 - 800 μg av microsomalprotein pr. ml prøvebuffer. Disse preparater blandes under anvendelse av en hvirvelblander og inkuberes 0, 10, 20 eller 40 minutter ved $25^{\circ}C$. Derefter tilsettes 100 l $1\beta,2\beta$ - 3H testosteron i prøvebuffer for å gi en prøvekonsentrasjon av substrat ($4,5 \times 10^{-7}M$) som er minst ti ganger K_m for testosteron ($0,045 \mu M$). Etter hvirvelblanding fortsettes enzyminkuberingen 10 minutter før den avsluttes ved tilsetning av kloroform. Mengden av radioaktivitet i den vandige fraksjon bestemmes ved scintillasjonsprosedyrer. Den enzymatiske aktivitet beregnes fra prosenten av 3H -testosteron omdannet til 3H_2O . Enzymaktiviteten for hver konsentrasjon av inhibitor ved hver preinkuberingsperiode beregnes som en prosent av "0" minuttet for bærerkontrollen vilkårlig satt til 100 %. Den prosentvise inhibering uttrykkes derfor som en prosent av 100 % enzymaktivitetsverdien.

Forbindelser som viser tidsavhengig inhibering ble derefter undersøkt for å fastslå inhiberingskonstanten K_i , som er den tilsynelatende dissosiasjonskonstant for enzyminhibitorkomplekset. Denne bestemmelse krever målinger ved begynnelseshastigheter for enzymreaksjon. Enzymaktiviteten bestemmes etter forskjellige preinkubasjonstider ved forskjellige inhibitorkonsentrasjoner når den prøves ved en substratkonsentrasjon på minst ti ganger K_m for testosteron. Enzymhalveringstiden ($t_{1/2}$) ved disse forskjellige inhiberingskonsentrasjoner ($[In]$) anvendes for å bestemme K_i ved

lineær regresjonsutligning av $t_{1/2}$ vs. $1/[In]$. K_i er ekvivalent med inhibitor-konsentrasjonen når $t_{1/2}$ er lik 0. Resultatene av de tidsavhengige forsøk er vist i tabell 2.

Tabell 2: Tidsavhengig inhibering av aromatase

Inhibitor	Inhibitor-konsentrasjon (M)	% inhibering Preinkubasjonstid (minutter)			Tilsvarende K_i (μM)
		0	20	40	
10-(1,2-propadienyl)- østr-4-en-3,17-dion	0,01	0,0	13,0	31,5	0,014
	0,05	6,2	42,5	56,6	
	0,1	8,6	45,7	62,4	
	0,5	34,7	62,5	76,5	
	1,0	50,2	69,2	84,0	
Aminogluthethimid	1,0	13,7	0,5	14,4	20,28
	10,0	70,0	64,0	73,2	
Androsta-1,4,6-trien-3,17-dion	0,1	20,5	45,5	54,8	
	1,0	88,8	92,8	95,2	
1-dehydrotestololacton	0,25	0,0	3,6	36,1	7,9
	2,5	24,7	82,7	96,9	

Tabell 2 viser den prosentvise inhibering etter forskjellige preinkubasjonstider før tilsetning av det merkede substrat, for forskjellige konsentrasjoner av 10-(1,2-propadienyl)-østrendion og referanseforbindelser. Allenylforbindelsen utviser signifikant tidsavhengig inhibering av aromatase ved meget lave konsentrasjoner, dvs. 0,01-0,05 μM . Basert på disse aktiviteter kan det fastslås at 10-(1,2-propadienyl)-østrendion har bedre aktivitet til kjente terapeutiske midler som anvendes ved brystkreftterapi og som også inhiberer aromatase.

K_i for 10-(1,2-propadienyl)-østrendion er $1,4 \times 10^{-8} M$. Disse data indikerer at denne inhibitor er irreversibelt bundet til enzymet med en affinitet for enzymet som er tre ganger større enn verdien for det naturlige substrat testosteron, som har en enzymaffinitet (K_m) på $4,48 \times 10^{-8} M$. Enzymaktiviteten for 10-allenylforbindelsen overstiger enzymaffiniteten av androsta-1,4,6-trien-3,17-dion med en faktor på 8,1, overstiger aktiviteten av 1-dehydrotestololacton med 58,1 og aminogluthethimid med 1.491,2.

Disse data viser at 10-(1,2-propadienyl)østr-4-en-3,17-dion er overlegent overfor kjente aromataseinhibitorer.

Generelt kan forbindelsene av formel I administreres analogt med kjente aromataseinhibitorer slik som androsta-1,4,6-trien-3,17-dion, testololacton eller aminoglutethimid. De kan administreres oralt eller parenteralt enten i fast eller flytende form, og i nærværet av en farmasøytisk akseptabel bærer om ønsket. Faste doseringsformer slik som f.eks. kapsler, piller, tabletter og lignende er egnede. Individuelle faste doseringsenheter kan inneholde, i tillegg til de aktive bestanddeler, en farmasøytisk akseptabel bærer, f.eks. stivelse, sukker, sorbitol, gelatin, smøremidler, siliciumsyre, talkum og lignende. Alternativt kan væskedoseringsformer enten for oral administrering eller sterile injiserbare oppløsninger anvendes. Mer enn én administreringsform kan anvendes hvor slike finnes å være nyttige.

Oral administrering av forbindelsene utføres med fordel med kapsler eller tabletter med individuelle doseringsenheter inneholdende fra 1,0 til 250 mg av aromataseinhibitoren, fortrinnsvis fra 10 til 50 mg. En daglig dose på fra 50 til 1000 mg, fortrinnsvis fra 10 til 150 mg, anbefales.

Forbindelsene av formel I kan også administreres som væskesuspensjoner eller oppløsninger under anvendelse av en steril væske slik som olje, vann, en alkohol, eller blandinger derav, med eller uten tilsetning av et farmasøytisk egnet overflateaktivt middel, suspenderingsmiddel eller emulgeringsmiddel for oral eller parenteral administrering.

De etterfølgende eksempler illustrerer oppfinnelsen. I eksemplene er alle temperaturer angitt i °C, og alle deler og prosenter er på vektbasis.

EKSEMPEL 1 Fremstilling av 10-(1,2-propadienyl)østr-4-en-3,17-dion(5)

1,8 g (4,4 mmol) 3,17-bis(ethylendioxy)-19-ethynyl-androst-5-en-19-ol 2 (Covey et al, Tet.Let. 2105 (1979)) i 20 ml pyridin ble avkjølt til 0°C og derefter behandlet med

700 mg (6 mmol) methansulfonylchlorid. Blandingen ble holdt ved -20°C 48 timer, derefter fortynnet med ether og vasket med 1N HCl, mettet NaHCO_3 og saltvann, og ble derefter tørket og konsentrert.

Det resulterende urene mesylat 3 ble oppløst i 50 ml toluen og avkjølt til -70°C , derefter behandlet med 2 ml (70 % i benzen) natrium bis(methoxyethoxy)-aluminiumhydrid og fikk stå 12 timer ved -20°C . Vann ble derefter forsiktig tilsatt, og blandingen ble ekstrahert med ether. Etheroppløsningen ble vasket med 1N HCl, og vandig NaHCO_3 , derefter tørket og konsentrert under dannelsen av et residuum som ble renset ved kromatografi på silicagel i ethylacetat/hexan under dannelsen av allen 4.

Allenet 4 ble oppløst i 30 ml aceton, 50 mg p-toluen-sulfonsyre ble tilsatt, og oppløsningen omrørt over natten ved romtemperatur og derefter konsentrert. Residuet ble tatt opp i ether, vasket med vandig natriumbicarbonat, tørket, konsentrert og kromatografert på silicagel. Diketonproduktet ble ytterligere renset ved omkrystallisering fra hexan under dannelsen av produkt 5 som farveløse krystaller med sm.p. $104 - 105^{\circ}\text{C}$.

EKSEMPEL 2

Fremstilling av 10-(1,2-propadienyl)østra-4,6-dien-3,17-dion (10)

En blanding av 250 mg diketon 5 og 460 mg kloranil i 17 ml t-butylalkohol ble oppvarmet ved tilbakeløpskokning 3 timer. Blandingen ble fortynnet med ethylacetat og filtrert. Filtratet ble vasket med 1N NaOH og saltvann, derefter tørket og konsentrert. Kromatografi av residuet på silicagel under anvendelse av ethylacetat/hexan gav produktet 10 som ble omkrystallisert fra diklormethan/hexan, sm.p. $152 - 154^{\circ}\text{C}$.

EKSEMPEL 3

Fremstilling av 10-(1,2-propadienyl)østr-4-en-3,6,17-trion(19)

80 mg ketol 18 ble oppløst i 50 ml benzen, 15 mg p-toluen-sulfonsyre ble tilsatt, og blandingen ble oppvarmet ved tilbakeløpskokning 30 minutter under anvendelse av en Dean-

Stark vannseparator. Den avkjølte oppløsning ble derefter vasket med vandig Na_2CO_3 og saltvann, derefter tørket og fordampet. Residuet ble omkrystallisert fra diklormethan/hexan under dannelse av trion 19; sm.p. $187 - 190^\circ\text{C}$.

EKSEMPEL 4 Tablettformulering

En illustrativ tablettformulering egnet for anvendelse som antikonsepsjonsmiddel, er som følger.

10	(a)	10-(1,2-propadienyl)estr-4-en-3,17-dion	10 g
	(b)	Hvetestivelse	50 g
	(c)	Lactose	150 g
	(d)	Magnesiumstearat	8 g

15 En granulering erholdt efter blanding av lactosen med endel av stivelsen og en granulert stivelsespasta fremstilt av resten av stivelsen tørkes, siktes og blandes med de aktive bestanddeler (a) og (b) og magnesiumstearatet. Blandingen presses til 1000 tabletter, som hver veier 218 mg.

20

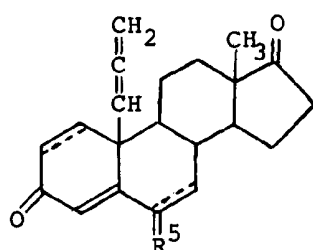
25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Nye 10-(1,2-propadienyl)steroider,
karakterisert ved at de har generell
5 formel I



(I)

- 15 hvori --- betegner en enkelt- eller dobbeltbinding, og R_5 er
oxygen eller to hydrogenatomer.

2. 10-(1,2-propadienyl)steroid ifølge krav 1,
karakterisert ved at dette er 10-(1,2-
20 propadienyl)østr-4-en-3,17-dion.

3. Antikonsepsjonsmidler,
karakterisert ved at de som aktiv bestand-
del inneholder et 10-(1,2-propadienyl)steroid ifølge hvilket
25 som helst av kravene 1 - 2.