

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145859 B

- (21) Ansøgning nr. 4379/76 (51) Int.Cl.³ C 07 J 1/00
(22) Indleveringsdag 29. sep. 1976
(24) Løbedag 29. sep. 1976
(41) Alm. tilgængelig 31. mar. 1977
(44) Fremlagt 21. mar. 1983
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 30. sep. 1975, 618176, US 4. jun. 1976, 693249, US

(71) Ansøger AKZO N.V., Arnhem, NL.

(72) Opfinder Henry A. Strade, US.

(74) Fuldmægtig Firmaet Chas. Hude.
-

- (54) Analogifremgangsmåde til fremstilling af estre af 3-hydroxy-5β-østran-17-on.

Den foreliggende opfindelse angår en analogifremgangsmåde til fremstilling af hidtil ukendte ikke-pyrogene, erythropoietisk virkende estre af 3-hydroxy-5β-østran-17-on af den i krav 1 angivne almene formel.

Erythropoiesi er dannelsesprocessen for røde blodlegemer.

Udtrykket anæmi indebærer et unormalt lavt antal cirkulerende røde blodlegemer eller en aftaget koncentration af hæmoglobin i blodet. Forekomsten af anæmi afspejler enten marvsvigt eller for stort tab af røde blodlegemer eller begge dele. Marvsvigt, d. v. s. nedsat erythropoiesi, kan optræde som resultat af mangelfuld ernæring, udsættelse for gift, tumorinvasion eller andre og til tider ukendte årsager.

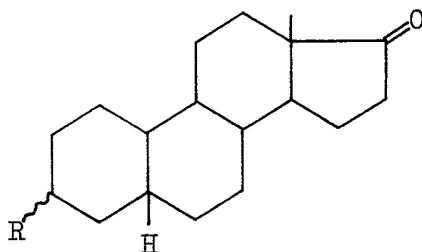
DK 145859 B

Til behandling af anæmi, der skyldes svigt af benmarv (hypoplastiske og aplastiske anæmier), har det været foreslået at anvende stoffer, der kunne stimulere marven, såsom androgener eller corticosteroider. Amerikansk patent nr. 3.383.282 beskriver forskellige 3,5-androsta=dien-3,17-diolderivater som havende erythropoietisk virkning. Amerikansk patent nr. 3.519.659 og 3.519.660 beskriver forskellige pred=nisolonderivater, som har antileukemivirkning.

Det er kendt, at erythropoietisk virkning udvises af metaboliter af visse androgene, anaboliske og progestationale steroider. Således beskriver Levere m.fl. i rapporterne fra et symposium, der blev afholdt i forbindelse med the American Society of Hematology den 4. december 1971, kapitel 3, at etiocholanolon, en human metabolit af testosteron, har erythropoietisk virkning. Jepson, ibid., kapitel 2 beskriver, at nandrolon (19-nortestosteron, 17 β -hydroxy-19-nor-4-androsten-3-on), et anabolisk steroid, har erythropoietisk virkning svarende til testosteron. Dette stof har imidlertid den ulempe at udvise androgene bivirkninger. Etiocholanolon har den væsentlige ulempe at være et pyrogen i mennesker.

Ifølge den foreliggende opfindelse har det vist sig, at visse estre af 3-hydroxy-5 β -østran-17-on udviser erythropoietisk virkning, samtidig med at de ikke er pyrogene og udviser ingen eller ringe hormonale bivirkninger.

Forbindelserne, der har vist sig at være ikke-pyrogene og aktive ved stimulering af erythropoiesi, har formlen



hvor R^1 er acyloxy afledt af en organisk carboxylsyre med 1-18 kulstofatomer.

19-noretiocholanolon (3α -hydroxy- 5β -østran-17-on) er en kendt forbindelse og er beskrevet af Engel m.fl., J. Biol. Chem. 231, 1, 159 (1958). Denne forbindelse er også beskrevet i en artikel af Counsell i Tetrahedron, bind 15, 202-211 (1961). 19-noretiocholanolon kan også syntetiseres ved at hydrogenere nandrolon-17-acetat til det tilsvarende 5β -3-keto-17 β -acetat på den måde, der er beskrevet i J. Org. Chem. 31, 2394 (1966), og derefter reducere 3-ketogruppen til dannelsen af 3α -hydroxygruppen under anvendelse af lithium-aluminium-tert.-butoxyhydrid, beskytte 3α -hydroxygruppen, hydrolysere 17 β -acetatet, oxidere 17 β -hydroxygruppen til 17-keto med CrO_3 -pyridin og til slut fjerne 3α -beskyttelsesgruppen.

Den 3β -epimere kan fås ved epimerisering af 19-norethicholanolon, f. eks. ved omdannelse af 3α -hydroxygruppen til dens 3-tosylat og forsæbning af tosylatet med kaliumacetat, eller endnu bedre efter fremgangsmåden, der er beskrevet i Tetrahedron Letters, bind 18, 1619 (1973), ved anvendelse af triphenylphosphin, diethylazodicarboxylat og myresyre.

3-esterne af de førnævnte forbindelser, som udviser erythropoietisk virkning, er hidtil ukendte forbindelser.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at 3-hydroxy- 5β -østran-17-on bringes til at reagere med syren HR^1 eller et anhydrid eller halogenid deraf.

Som eksempler på organiske carboxylsyrer kan nævnes følgende: myresyre, eddikesyre, propionsyre, smørsyre, valerianesyre, isocapronsyre, decansyre, undecylsyre, laurinsyre, tridecylsyre, myristinsyre, oliesyre, palmitinsyre, stearinsyre, trimethyleddikesyre, diethyleddikesyre, cyklohexancarboxylsyre, cyklopentylpropionsyre, cyklohexylsmørsyre, cyklohexylpropionsyre, undecylensyre, benzoesyre, phenyleddikesyre, phenylpropionsyre, phenylsmørsyre, malonsyre, ravsyre, glutarsyre, pimelinsyre og vinsyre.

Ifølge opfindelsen er R^1 fortrinsvis acyloxy afledt af en organisk carboxylsyre med 3-12 kulstofatomer og især dekanoyloxy.

De førnævnte forbindelser fremstillet ifølge opfindelsen er egnede til administration deraf til mennesker eller andre varmblodede dyr i mængder, der er effektive til at stimulere erythropoiesi, hvilke mængder i almindelighed er i intervallet fra ca. 5 til ca. 500 mg pr. enhedsdosis. Den sædvanlige metode til administration er parenteralt, til hvilket formål forbindelserne kan fremstilles i en form egnet til injektion som en opløsning eller suspension i 1 ml ampuller. Forbindelserne kan også administreres enteralt, herunder oromucosalt, i form af tabletter, piller, kapsler, suppositorier og lignende.

Det følgende forsøg illustrerer den erythropoietiske virkning af forbindelserne fremstillet ifølge opfindelsen.

Primære fuglelevercellekulturer

Induktion af porphyrinsyntese og hæmdannelse i celler blev undersøgt i det primære fuglelevercellekultursystem, der er beskrevet af Granick og Kappas, J. Biol. Chem. 242, 4587-4593 (1967). Ifølge denne teknik bliver lever fra 16-17 dage gamle kyllingefostre hakket og cellerne adskilt med trypsin. Suspensioner indeholdende 3 til 5×10^5 celler podes i små flasker, som indeholder en dækstrimmel og 1,0 ml Eagle's basalmedium suppleret med glutamin, oksefosterserum og antibiotika. Flaskerne inkuberes ved 37°C i 5% CO_2 og luft i 20 timer. Vækstmediet erstattes så med frisk medium, og der foretages tilsætning af steroidet efter behov. Efter reinkubation i yderligere 20 timer undersøges dækstrimlerne, der nu er overvokset med et monolag af hepatiske parenchymalceller, under faseoptik og fluorescensoptik. Semikvantitative bestemmelser af cellulære porphyriner foretages på det grundlag, at værdier af fluorescensintensiteter, der ligger fra +1,0 til +4,0, er ækvivalente med ca. 5 til 50×10^{-11} mol protoporphyrin pr. mg protein på dækstrimmelen. Mængderne af protoporphyrin, som er dannet, afspejler niveauet af δ -aminolævulinat syntetase, som er det hastighedsbegrænsende enzym i hæmdannelsen.

De afprøvede forbindelser var 19-noretiocholanolon, 3-decanoat (A) og 3 β -hydroxy-5 β -østran-17-on, decanoat (B). Begge forbindelserne viste sig at være ikke-pyrogene.

Resultaterne er vist i følgende tabel:

Tabel:

Induktion af porphyrinsyntese med steroider i kultiverede kyllinge-fosterleverceller

<u>Behandling</u>	<u>Antal prøver og dosis</u>	<u>Protoporphyrin fundet (pmol/ mg protein, 20 timer)</u>
Steroid A	4 - 2 μ g/ml	341,1 $\pm$ 32,0
Steroid A	4 - 10 μ g/ml	434,5 $\pm$ 45,9
Steroid B	4 - 2 μ g/ml	323,8 $\pm$ 43,6
Steroid B	4 - 10 μ g/ml	375,7 $\pm$ 51,7

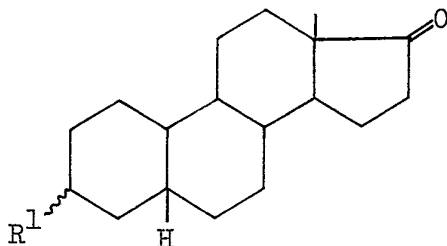
Det følgende eksempel illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel

Til en suspension af 10 g 3 α -hydroxy-5 β -østran-17-on i 100 ml pentan og 10 ml pyridin sættes 10 ml decanoylchlorid ved 15°C i løbet af 1 time. Efter omrøring i 2 1/2 time sættes vand til reaktionsblandingen for at dekomponere overskuddet af syrechlorid. Reaktionsblandingen ekstraheres med pentan. Pentanekstrakten tørres på natriumsulfat og inddampes til tørhed. Resanen krystalliseres af pentan. Udbyttet er 14,1 g 3 α -hydroxy-5 β -østran-17-on-3 α -decanoat, smeltepunkt 39-43°C, $[\alpha]_D^{20} = +90^\circ$ (i CHCl₃).

P a t e n t k r a v

1. Analogifremgangsmåde til fremstilling af estre af 3-hydroxy-5 β -østran-17-on med den almene formel



hvor R^1 er acyloxy afledt af en organisk carboxylsyre med 1-18 kulstofatomer, k e n d e t e g n e t ved, at 3-hydroxy-5 β -østran-17-on bringes til at reagere med syren HR^1 eller et anhydrid eller halogenid deraf.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R^1 er acyloxy afledt af en organisk carboxylsyre med 3-12 kulstofatomer.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at R^1 er dekanoyloxy.

Fremdragne publikationer:
