

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3323-98

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 04. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **18.04.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9604845**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 11. 99**
(Věstník č. 11/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR97/00693**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/39018**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 07 J	41/00
C 07 J	9/00
C 07 J	7/00
C 07 J	31/00
A 61 K	31/57

(71) Přihlašovatel:

HOECHST MARION ROUSSEL, S. A.,
Puteaux, FR;

(72) Původce:

Bhatnagar Neerja, Savigny Sur Orge, FR;
Claussner André, Villemomble, FR;
Marchandean Christian, Annet Sur Marne,
FR;
Resche Rigon Michele, Paris, FR;
Teutsch Jean-Georges, Pantin, FR;

(74) Zástupce:

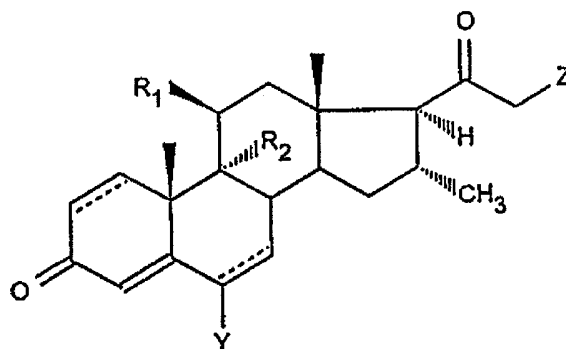
Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Steroidy, způsob jejich přípravy, mezipro-
dukty vzniklé při způsobu jejich přípravy,
kompozice s obsahem steroidů a jejich
užití jako léčiv**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém R₁ představuje halogen, hydroxyl, /C₁₋₈/alkoxy - nebo /C₁₋₁₂/acyloxy a skupinu R₂ představuje halogen nebo vodík, nebo R₁ a R₂ spolu vytvářejí dvojnou vazbu, Z je zvoleno z volitelně substituovaných skupin /C₁₋₈/alkylthio, volitelně substituovaných skupin arylthio, /C₁₋₈/alkyloxy, halogen, kyano, merkpto, thiokyanato a /CH₂/o-1-CO₂H volitelně esterifikovaných, Y představuje vodík nebo methyl, tečkovaná čára v pozici 1-2 nebo 5-6 volitelně představuje druhou vazbu, jejich adiční soli, způsob jejich přípravy, meziprodukty vzniklé při způsobu přípravy a farmaceutické kompozice s jejich obsahem.



29.05.99

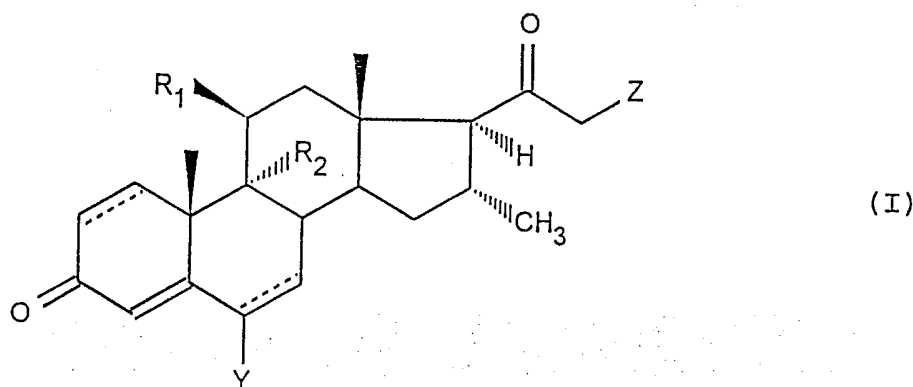
Steroidy, způsob jejich přípravy, meziprodukty vzniklé při způsobu jejich přípravy, kompozice s obsahem steroidů a jejich užití jako léčiv

Oblast vynálezu

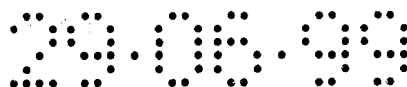
Vynález se týká steroidů, způsobu jejich přípravy, meziproduktů vzniklých při způsobu jejich přípravy, kompozic s obsahem steroidů a jejich užití jako léčiv.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny o obecném vzorci I



ve kterém buď R_1 představuje atom halogenu, hydroxylradikál, alkyloxy radikál s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, acyloxy radikál s obsahem 1 až 12 atomů uhlíku a R_2 představuje atom halogenu nebo atom vodíku nebo R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu, Z se zvolí z alkyloxy skupin s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, nesubstituovaných nebo substituovaných alkylthio skupin s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, nesubstituovaných nebo substituovaných arylthio skupin s obsahem 6 až 12 atomů uhlíku, halogenu, kyano, merkpto, thiokyanato, CO_2A a CH_2CO_2A skupin, kde A je atom vodíku nebo alkyl skupina s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, Y představuje atom vodíku nebo methyl, tečkovaná čára v pozici 1-2 nebo 5-6 představuje volitelně druhou vazbu, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami za předpokladu, že sloučenina 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -6-methyl-21-chlor-pregna-



1,4-dien-3,20-dion je vyloučena a když R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu Z není atom halogenu.

Atomem halogenu se rozumí atom fluoru, bromu, chloru a jodu.

Alkyloxy a alkylthio radikály s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku se především rozumí methoxy, ethoxy, propoxy, butyloxy radikály a dále odpovídající sirná analoga.

Alkyl radikálem s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku se rozumí tyto radikály : methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, terc-butyl, n-pentyl, n-hexyl, 2-methyl pentyl, 2,3-dimethyl butyl, n-heptyl, 2-methylhexyl, 2,2-dimethylpentyl, 3,3-dimethylpentyl, 3-ethylpentyl, n-oktyl, 2,2-dimethylhexyl, 3,3-dimethylhexyl, 3-methyl-3-ethylpentyl. Zvláště jde o methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl a terc-butyl radikály. Arylthio radikál je především thiofenyl.

Když Z je substituovaný alkylthio nebo arylthio radikál, může jít o tyto substituenty: fluor, chlor, brom, jod, alkylradikál jako methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, terc-butyl, alkoxy radikál jako methoxy, ethoxy, propyloxy, isopropyloxy, butyloxy, alkylthio radikál jako methylthio, ethylthio, propylthio, isopropylthio, butylthio, amino radikál, alkylamino radikál jako methylamino nebo ethylamino, dialkylamino radikál jako dimethylamino, diethylamino, methylamino, volitelně acylovaný hydroxyl radikál, např. acetoxy nebo radikál o vzorci : $-O-CO-(CH_2)_n CO_2 H$, kde $n = 2$ až 5, acyl radikál s obsahem 2 až 8 atomů uhlíku jako je acetyl, propionyl, butyryl, benzoyl, volný karboxy radikál, esterifikovaný karboxy radikál jako alkoxy karbonyl, např. methoxy karbonyl nebo ethoxy karbonyl, kyano radikál, trifluormethyl radikál nebo fenyl radikál. Termín alkyl znamená obsah od 1 do 12 atomů uhlíku.

Výraz „volitelně substituovaný“ označuje, že může být přítomen jeden nebo více substituentů, identických nebo různých.

Substituce arylu může být provedena v ortho, meta nebo para pozici.

29.08.99

Když Z je volitelně substituovaný alkylthio radikál, $S-CH_2CH_2-A'$ skupinou se především rozumí skupina, kde A' je hydroxyl, atom halogenu nebo acetyloxy skupina.

Když je kruh B nasycen, Y je především v pozici α .

Vynález se přirozeně vztahuje na soli sloučenin o obecném vzorci I, v případě, že tyto sloučeniny zahrnují aminoskupinu, zejména soli s těmito kyselinami : chlorovodíková, bromovodíková, dusičná, sírová, fosforečná, octová, mravenčí, propionová, benzoová, maleinová, fumarová, jantarová, vinná, citronová, šťavelová, glyoxylová, asparagová, alkansulfonová jako je methan- a ethan-sulfonová, arylsulfonová, jako je benzen- a paratoluensulfonová a arylkarboxylová a když sloučeniny o vzorci I obsahují kyselou skupinu, vztahuje se vynález také na volitelně substituované soli alkalických kovů, kovů alkalických zemin a amonia.

Dalším předmětem vynálezu jsou sloučeniny o obecném vzorci 1 výše definované, kde R_1 hydroxyl radikál a R_2 je atom fluoru, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

Mezi sloučeniny patřící do rozsahu vynálezu lze především uvést sloučeniny o vzorci I, kde kruh B je nasycen a Y je atom vodíku, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami a zásadami.

Dalším předmětem vynálezu jsou sloučeniny o obecném vzorci I výše definované, kde Z je kyano radikál nebo alkylthio skupina s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku.

Mezi výhodné sloučeniny podle vynálezu lze uvést tyto :

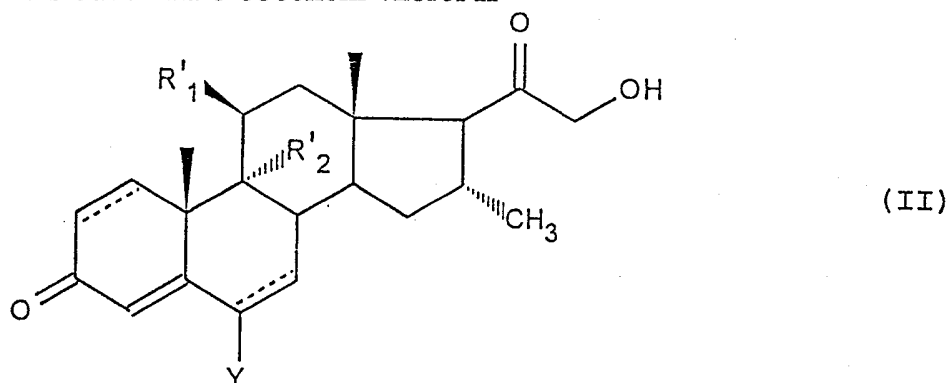
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregn-4-ene-3,20-dioxo-21-karbonitril,
methyl 3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-nor cholan 1,4-dien-24-oát,
21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
21-thio-(2-hydroxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,

29.08.99

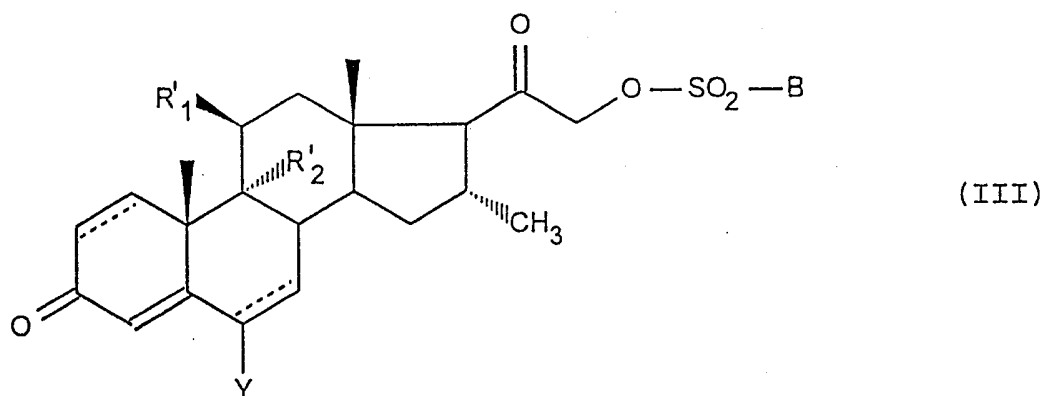
21-thio-(2-acetyloxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,

9 α ,11 β -dichlor-21-fluor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion a zejména
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy sloučenin o vzorci I
vyznačený tím, že sloučenina o obecném vzorci II



ve kterém buď R $'_1$ je hydroxyl a R $'_2$ je halogen nebo vodík nebo R $'_1$ je halogen a R $'_2$ je halogen nebo vodík nebo R $'_1$ a R $'_2$ spolu vytvářejí druhou vazbu a Y je výše definováno, je podrobena působení aktivačního činidla alkoholu o vzorci Hal-SO $_2$ -B, kde Hal je atom bromu nebo atom chloru a B je alkyl radikál s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný 1 až 5 atomy halogenu nebo fenyl nebo naftyl skupina nesubstituovaná nebo substituovaná 1 až 5 alkyl skupinami s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku za účelem přípravy sloučeniny o obecném vzorci III



29.08.99

při čemž sloučenina o vzorci III je případně podrobena jedné nebo více následných reakcí ve vhodném pořadí za účelem přípravy sloučeniny o obecném vzorci I:

- působení chloračního jodačního, bromačního nebo fluoračního činidla,
- působení volitelně substituovaného alkylthiolu nebo arylthiolu,
- působení thioamidu nebo thiomočoviny s následnou hydrolýzou,
- působení KCN,
- hydrolýza kyano skupiny v kyselém prostředí, poté volitelně esterifikace nebo tvorba solí
- postupné působení $\text{CH}_2(\text{COOEt})_2$, a zmýdelnění, poté dekarboxylace volitelně následovaná esterifikací,
- působení KSCN nebo NaSCN,
- působení alkoholu nebo alkoholátu,
- acylace v pozici 11,
- alkylace v pozici 11,
- redukce dvojně vazby v pozici 1 – 2,
- vytvoření dvojně vazby v pozici 1 – 2,
- dehydratace za účelem vytvoření dvojně vazby v pozici 9 – 11,
- tvorba solí.

B představuje především $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, $-\text{PhMe}$ radikály.

Mesylát, tosylát nebo triflát o vzorci III se vytvoří působením methan-sulfonylchloridu, tosylchloridu nebo triflicanhydridu na odpovídající alkohol o vzorci II za přítomnosti zásady jako je pyridin.

Vytvoření 21-chlorovaného derivátu z odpovídajícího mesylátu o vzorci III se provádí podle metody známé odborníkovi, zejména působením chloridu lithného nebo draselného.

Vytvoření 21-bromovaného derivátu z odpovídajícího mesylátu o vzorci III se provádí podle metody známé odborníkovi, zejména působením bromidu lithného

29.08.99

nebo draselného.

21-bromované produkty lze rovněž připravit přímo z odpovídajících alkoholů působením kyseliny bromovodíkové nebo bromidu fosforitého.

Vytvoření 21-jodovaného derivátu z odpovídajícího mesylátu o vzorci III se provádí podle metody známé odborníkovi, zejména působením jodidu sodného nebo draselného.

Vytvoření 21-fluorovaných derivátů z odpovídajících 21-chlorovaných, 21-bromovaných nebo 21-jodovaných derivátů se provádí zejména působením fluoridu draselného v glykolu za refluxu nebo použitím korunového éteru, fázovým transferem nebo iontoměničovou pryskyřicí. Vytvoření 21-fluorovaného derivátu z odpovídajícího mesylátu o vzorci III se provádí podle metody známé odborníkovi, zejména působením fluoridu draselného.

Vytvoření 21-alkylthio nebo arylthio derivátů z odpovídajícího 21-chlorovaného derivátu se především provádí působením alkylthiolu nebo arylthiolu za přítomnosti zásady jako je triethylamin v tetrahydrofuranu.

Vytvoření odpovídajícího thiolu se především provádí nepřímou metodou jako je působení thioamidu nebo thiomočoviny s následnou hydrolýzou.

Vytvoření 21-kyano derivátů se provádí působením kyanidu draselného v ethanolovém prostředí na odpovídající 21-chlorovaný, bromovaný nebo jodovaný derivát.

Hydrolýza 21-kyano skupin se především provádí za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové.

Vytvoření 21-thiokyanát derivátů se provádí působením thiokyanátu draselného nebo sodného v ethanolovém prostředí na odpovídající 21-chlorovaný derivát.

Působení ethyl malonátu na 21-chlorovaného derivátu za účelem přípravy odpovídající sloučeniny $21\text{-CH}(\text{COOEt})_2$ se především provádí za přítomnosti

silné zásady jako je hydrid sodný v aprotickém polárním rozpouštědle jako je HMPT.

Zmýdelnění se provádí podle známé metody, např. za přítomnosti sody a v ethanolovém prostředí.

Dekarboxylace se také provádí podle metod známých odborníkovi, zejména tepelnou cestou.

Esterifikace se provádí podle metod známých odborníkovi, zejména působením diazomethanu. Nejdříve je možno připravit kyselý chlorid a poté na něj působit alifatickým alkoholem.

Vytvoření 21-alkyloxy derivátů se především provádí působením alifatického alkoholu jako je CH_3OH nebo nBuOH na 21-chlorovaný derivát v aprotickém dipolárním rozpouštědle jako je dimethylsulfoxid za přítomnosti zásady jako je soda.

Tvorba solí se může provádět za obvyklých podmínek. Operace se provádí např. za přítomnosti ethanolové sody. Jako sodná sůl může být také použit uhličitán sodný nebo uhličitán draselný nebo kyselý uhličitán.

Dehydratační reakce sloučenin o obecném vzorci I, II nebo III, kde R_1 je hydroxyl a R_2 je atom vodíku za účelem přípravy sloučenin o vzorci I s dvojnou vazbou na pozici 9-11 se provádí podle obvyklých metod, mezi kterými lze uvést jako příklad působení mesylát chloridu nebo triflicanhydridu následované tepelnou reakcí.

Sloučeniny o vzorci I mající druhou vazbu na pozici 1-2 mohou být redukovány na sloučeninu o vzorci I nasycenou na pozici 1-2 hydrogenací podle obvyklých metod známých odborníkovi.

Vytvoření dvojné vazby na pozici 1-2 lze provést podle obvyklých metod enzymatickou nebo chemickou cestou, zejména pak působením 2,3-dichloro-5,6-dikyanobenzochinonu (DDQ) v dioxanu.

29.06.99

Acylační reakce hydroxyly na pozici 11 se provádí působením kyseliny karboxylové nebo karboxanhydridu.

Alkylace hydroxyly na pozici 11 se provádí např. působením alkyl jodidu za přítomnosti zásady jako je terc-butylát draselný v rozpouštědle jako je tetrahydrofuran.

Předmětem vynálezu jsou také nové průmyslové produkty a to sloučeniny o obecném vzorci III s výjimkou níže uváděných sloučenin :

21-(methansulfonyloxy)-16 α -methylpregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dion,

21-(methansulfonyloxy)-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion.

21-(4-methylfenylsulfonyloxy)-16 α -methyl-pregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dion.

Produkty o vzorci II použité jako výchozí produkty v přípravném postupu jsou obecně známé. Jde především o desoxymethason (US 3232839), 9 α , 11 β -dichlor- 16 α -methyl 21-hydroxy pregna 1,4-dien-3,20-dion (dodatková přihláška č. 2381065), 16 α -methyl 1,4-pregnadien-11 β ,21-diol-3,20-dion (US 33554186), 6 α , 16 α -dimethyl 1,4-pregnadien-11 β , 21-diol-3,20dion (US 3232839) .

Mezi protizánětlivými a imunosupresivními molekulami, které jsou v současné době známy, představují glukokortikoidy jednu z nejúčinnějších terapeutických tříd.

Jejich použití je však přesto omezeno a to vzhledem k jejich četným vedlejším účinkům, mezi které lze uvést zejména tyto :

zpožďující působení na osu hypothalamus-hypofýza-nadledvinky (HPA),

netolerance glukosy, což může uspišit objevení diabetu,

poškození svalové tkáně,

zpomalování hojení,

atrofie kůže,

osteoporosa,

zvýšená vnímavost k infekcím,

29.08.99

nervové poruchy,
hypercholesterolemie.

Účinky glukokortikoidů jsou šířeny nukleárními receptory, které náleží k rodině steroid receptorů. Tyto receptory jsou „ligand-inductible“ faktor transkripce, který může pozitivně nebo negativně modulovat transkripci sílových genů. (Ervans, R.M., 1988 Science, 240, 8893895), (Green, S., Kumar, V., Theulaz, I., Wahli, W., and Chambon, P. 1988 EMBO J., 7, 3037-3044), (Beato, M. 1989. Cell, 56, 335-344), (Jonat, C., Rahmendorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H., Herrlich, P., 1990 Cell, 62, 1189-1204), (Pfahl, M. 1993 Endocrine Reviews, 14, 651-658).

Použití mutantů glukokortikoidových receptorů umožnilo stanovit, že určité oblasti těchto receptorů působí na funkci transaktivace nebo transreprese a že tyto dvě funkce je teoreticky možno oddělit (Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmendorf, H.J., Herrlich, P., and Cato, A.C.B. 1994 EMBO J., 13, 4087-4095).

Získání ligandů glukokortikoidového receptoru působících in vivo jako protizánětlivé prostředky zbavené transaktivační funkce by umožnilo vyvinout lépe snášené molekuly.

Sloučeniny o obecném vzorci I podle vynálezu mají užitečné farmakologické vlastnosti :

1) Glukokortikoidní aktivita

Přihlašovatel vlastně objevil novou třídu glukokortikoidů. Různé zkoušky na zvířatech (krysy, myši) umožnily objevit velice účinné protizánětlivé vlastnosti sloučenin podle vynálezu. Zejména se projevila významná glukokortikoidní aktivita při lokální aplikaci (cf test ušního edému vyvolaného krotonovým olejem u myši, aktivita in vivo je stejná nebo větší než u prednisolonu nebo dexamethazonu).



2) Disociovaná aktivita

Navíc sloučeniny podle vynálezu působí dle následujícího mechanismu : molekuly umožňují funkci transaktivace nebo transreprese receptoru oddělit. Vykazují tzv. „disociovanou“ aktivitu na transkripci cílových genů.

Molekuly podle vynálezu byly testovány na modelech HELA buněk naočkovaných GRE-tk-CAT plasmidem (transaktivace) nebo pColl-CAT plasmidem (transreprese). (Cf.TEST 1)

Molekuly jako dexamethazon jsou schopny inhibovat transkripci promotoru kolagenázy; na druhé straně v kontrastu k dexamethazonu příliš neaktivují transkripci GRE-tk promotoru.

Jelikož popsané sloučeniny vykazují protizánětlivé a imunosupresivní aktivity stejného řádu jako prednisolon, terapeutické užití bude užití tradičně uváděné u léčiv na bázi prednisolonu.

Mohou být např. použity pro léčbu alergických, dermatologických, zažívacích, endokrinních, hematologických, zánětlivých, nádorových, ledvinových, nervových, oftalmologických, respiračních nebo revmatologických onemocnění nebo chorob. Jsou zejména užitečné při transplantaci orgánů pro potlačení odmítnutí transplantátů, ale také pro léčbu lokálních zánětlivých reakcí jako jsou např. edémy, dermatosy, různé formy ekzémů, erythema vyvolaná sluncem, tendinitis nebo výrony. Zejména vhodné jsou pro léčbu očních zánětlivých onemocnění.

Jejich disociovaná aktivita způsobuje, že sloučeniny podle vynálezu jsou zvláště užitečné pro léčbu výše uvedených onemocnění vzhledem k tomu, že určité vedlejší účinky léčiv jsou sníženy.

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny o vzorci I, zrovna tak jako jejich adiční soli s farmaceuticky přijatelnými kyselinami nebo zásadami užitě jako léčiva s glukokortikoidní aktivitou.

29.05.99

Zvláštním předmětem vynálezu jsou sloučeniny o vzorci I, zrovna tak jako jejich adiční soli s farmaceuticky přijatelnými kyselinami nebo zásadami užívané jako léčiva vykazující disociovanou glukokortikoidní aktivitu, při čemž tato disociace umožňuje snížit nebo vyloučit vedlejší účinky léčiv.

Mezi léčiva podle vynálezu lze uvést zejména tyto sloučeniny:

- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-3,20-dioxo-pregn-4-ene-21-karbonitril,
- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
- methyl 3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-nor cholán 1,4-dien-24-oát,
- 21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion.

Dále lze jako léčiva podle vynálezu uvést zejména tyto sloučeniny:

- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion-21-karbonitril,
- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion.

Užitečné dávkování se pohybuje podle povahy onemocnění, které se má léčit a také podle způsobu podávání. Např. od 1 mg až do 1000 mg denně u dospělého orální cestou.

Vynález se rovněž vztahuje na farmaceutické kompozice obsahující jako aktivní složku nejméně jedno z výše uvedených léčiv.

Sloučeniny o obecném vzorci I je možno aplikovat orálně, parenterálně nebo lokálně, např. i injekčně. Mohou být předepisovány ve formě tablet nebo potahovaných tablet, kapslí, granulí, čípků, injekčních přípravků, mastí, krémů, gelů, mikrokuliček, implantátů, náplastí, které se připraví podle metod obvyklých ve farmaceutickém průmyslu.

Aktivní složka (složky) může být zapracována do excipientů obvykle používaných v těchto farmaceutických kompozicích jako je talk, arabská guma, laktosa, škrob, stearat hořečnatý, kakaové máslo, vodná nebo i bezvodá vehicula, tukové látky jak zvířecího, tak i rostlinného původu, deriváty parafinu, glykoly a

29.06.99

rovněž různá zvlhčující, dispersní nebo emulsifikační činidla, konzervační prostředky.

Užitečné dávky se pohybují v závislosti na léčeném pacientovi a na onemocnění. Např. lze aplikovat jednou až čtyřikrát denně mast obsahující 0,1% až 5% sloučeniny z příkladu 1.

Zvláštním předmětem vynálezu jsou farmaceutické kompozice, které mohou být aplikovány lokálně s obsahem léčiva na základě výše popsaných sloučenin.

Příklady

Sloučeniny o vzorci I

Příprava 1. : 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-chlor-pregna-1,4-dien-3,20-dion
(cf Mol.and Cell.Endocrinal (1981) 22 153-168)

Po rozpuštění 6 g desoxymethasonu v 24 ml pyridinu se přidá 6 g chloridu lithného v 6 ml chloridu kyseliny methansulfonové, při teplotě menší než 50°C, poté se směs míchá 2 h při teplotě místnosti . Reakční medium se přelije do vody, separuje se a surový produkt se promyje, vysuší a vyčistí chromatografií na silikagelu při eluci směsí chloroform/ethylacetát v poměru 2:8. Výsledkem je 1,86 g čistého produktu.

B.t. = 185°C

Infračervené spektrum

C=O 1726 a 1707 cm⁻¹

Příklad 1: 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion

Po rozpuštění 1,86g produktu z přípravy 1 v 20 ml tetrahydrofuranu a 2 ml triethylaminu se nechá směs probublávat po dobu 1 h při teplotě 0°C methylthiol a dále se míchá po 48 h při teplotě místnosti. Reakční medium se přelije do vody,

29.05.99

separuje se, surový produkt se promyje a vyčistí rekrystalizací ze směsi methylenchloridu (CH_2Cl_2) a isopropyléteru. Získá se 1,477 g očekávaného čistého produktu.

B.t. = 166°C

Infračervené spektrum (CHCl_3)

OH	3620 cm^{-1} + asociované
C=O	1715 (rameno), $1694, 1666\text{ cm}^{-1}$
C=C	$1627, 1611\text{ cm}^{-1}$

Příklad 2 : 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion-21-karbonitril

3,9 g produktu z přípravy 1, 39 ml ethanolu, 1,090 g kyanidu draselného (90%) a 1,6 ml vody se míchá v inertní atmosféře za refluxu po 1 h 30 min. Po zchlazení v ledové lázni a úpravě na pH 4 přidáním kyseliny octové se minerální soli separují, směs se odpaří za redukováného tlaku až do doby, kdy se získá 4,7 g surového produktu, který se poté vyčistí chromatografií na silikagelu za eluce směsí ethylacetát/benzen v poměru 4:6. Získá se 2,7 g čistého produktu.

B.t. = 250°C

Infračervené spektrum (CHCl_3)

OH	3615 cm^{-1} + asociované
C=O	$1723, 1664\text{ cm}^{-1}$
Δ^{1-4}	$1627, 1608\text{ cm}^{-1}$
$\text{C}\equiv\text{N}$	2260 cm^{-1}

Příklad 3 : 21-chlor-9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregn-4-ene-3,20dion

Postupuje se jako u přípravy 1 s 8 g 16 α -methyl-9 α -fluor-pregn-4-ene-11 β ,21-diol-3,20-dion (FR1315629). Získá se 4.95 g očekávaného čistého produktu

29.06.99

po rekrystalizaci z 2,2-dimethoxypropanu.

B.t. = 196°C

Infračervené spektrum (CHCl₃)

OH	3616 cm ⁻¹
C=O	1725, 1706 cm ⁻¹
Δ4	1663, 1624 cm ⁻¹

Příklad 4: 9α-fluor-11β-hydroxy-16α-methyl-3,20-dioxo-pregn-4-ene-21-karbonitril

Postupuje se jako v příkladu 2 s 3,450 g produktu z příkladu 3. Získá se 2,36 g očekávaného čistého produktu.

B.t.=224 °C

Infračervené spektrum (CHCl₃)

OH	3610 cm ⁻¹ + asociované
C=O	1722 cm ⁻¹
Δ4	1667, 1625 cm ⁻¹
C≡N	2260 cm ⁻¹

Příklad 5 : methyl 3,20-dioxo-11β- hydroxy-16α-methyl-21-norcholan 1,4-dien-24-oát

Stupeň A: 21-chlor-16α-methyl-pregna-1,4,9 (11)-trien-3-20-dion

8,8 ml methansulfonylchloridu se při 10 °C přidá v inertní atmosféře ke směsi z 15 g methyl 16α-methyl-21-hydroxy-pregna-1,4,9(11)-trien-3-20-dion v 40 ml methylethylpyridinu a směs se míchá za teploty místnosti 5 h. Poté se směs přelije do směsi vody a ledu, okyselí se přidáním kyseliny chlorovodíkové; zfiltruje se, poté promyje a vysuší. Získá se 16,2 g surového produktu, který se vyčistí chromatografií při eluci směsí benzen / ethylacetát v poměru 8 : 2 . Získá se 13,4 g

29.06.99

očekávaného čistého produktu.

B.t. = 154 °C

Stupeň B : ethyl 3,20-dioxo-23-ethoxykarbonyl-16 α -methyl-21-norchola-1,4,9(11)triene 24 oát.

13,9 g chlorovaného produktu připraveného v předchozím stupni v 80 ml HMPT se v inertní atmosféře přidá ke směsi 1860 g 50% hydridu sodného v 50 ml HMPT a 60ml ethylmalonátu a míchá se při okolní teplotě do 4 h. Reakční medium se přelije do vody, provede se extrakce ethylacetátem, vysuší se a odpaří za redukováného tlaku. Získá se 21,5 g surového produktu, který se vyčistí chromatografií při eluci směsí benzen / ethylacetát v poměru 9 : 1. Získá se 16,4 g očekávaného produktu.

Stupeň C : 23-karboxy-3,20-dioxo-16 α -methyl-21-norchola-1,4,9 (11)-rien 24-ová kyselina.

16,4 g diesteru připraveného v předchozím stupni, 200 ml ethanolu a 100 ml 2N sody se smíchá a směs se dále míchá po dobu 3 h při teplotě místnosti. Po odpaření ethanolu za redukováného tlaku se směs rozředí přidáním směsi led-voda (1 litr) a okyselí se kyselinou chlorovodíkovou. Poté se směs zfiltruje, promyje a vysuší, získá se 14,6 g očekávaného produktu.

B.t. = 170°C.

Stupeň D: 3,20-dioxo-16 α -methyl-21-norchola-1,4,9(11)trien-24-ová kyselina

Směs sestávající z 14,6 g diacidu získaného v předchozím stupni v 250 ml HMPT se ohřívá po 4 min v kovové lázni předehtáté na 180°C, poté se směs přelije do 1500 ml směsi voda-led. Vysrážený monoacid se zfiltruje, promyje se a vysuší. Získá se 11,9 g očekávaného produktu.

B.t. = 208°C

Stupeň E: methyl 3,20-dioxo-16 α -methyl-21-norchola-1,4,9(11)-trien 24-oát

Roztok 13 g/l diazomethanu v dichlormethanu se přidá k roztoku 11.9 g

29.06.99

monokyseliny připravené v předchozím stupni v 250 ml dichlormethanu, vysuší se za redukováného tlaku. Získá se 12,3 g očekávaného produktu.

B.t. 98°C

Stupeň F: methyl- α -brom-3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-norchola-1,4-dien-24oát

7,3 g A-bromosukcinimidu, 7,3 ml kyseliny kyseliny chloristé a 35 ml vody se při teplotě od 0-10°C přidá v inertní atmosféře k 10,8 g methylesteru v 150 ml acetonu. Po míchání po dobu 2 h při -5°C se reakční medium přelije do 500 ml vody, provede se filtrace a vysuší sraženina. Získá se 12,8 g očekávaného produktu.

B.t. = 230°C

Stupeň G: methyl 3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-norchola-1,4-dien 24oát.

18 g octanu chromnatého se přidá v inertní atmosféře ke směsi 12,8 g bromhydrinu připraveného v předchozím stupni v 50 ml dimethyldulfoxidu a 6 ml thiofenolu; směs se míchá po dobu 1 h při teplotě místnosti. Reační směs se přelije do 1 l vody, provede se extrakce ethylacetátem, organická fáze se promyje, vysuší a odpaří za redukováného tlaku. Získá se 16 g očekávaného surového produktu, který se vyčistí chromatografií s eluátem ze směsi benzen / ethylacetát v poměru 7:3, rekrystalizuje z horkého ethanolu. Získá se tak 3,4 g očekávaného čistého produktu.

B.t. = 166°C

Infračervené spektrum (CHCl₃)

C=O 1735 cm⁻¹(ester), 1709 cm⁻¹ (20-keto)

C=C 1609 cm⁻¹, 1626 cm⁻¹, 1664 cm⁻¹

OH 3615 cm⁻¹

29.08.99

Příklad 6: Příklad farmaceutické kompozice s obsahem sloučeniny o vzorci I

Byly připraveny tablety s obsahem 50 mg produktu z příkladu 1 jako aktivní složky.

Produkt z příkladu 1

50 mg

Excipient (talk, škrob, stearat hořečnatý)

Farmakologická studie produktů podle vynálezu

I) Studie regulace transkripce do transfektovaných Hela buněk

Hela buňky (ATCC ref: CCL-2) byly rozděleny na desce s šesti prohlubněmi do nutričního media s hustotou 4×10^5 buněk/ml 24 h před transfekcí a inkubovány při 37°C. Transitní transfekce byly produkovány srážecí metodou za použití fosforečnanu vápenatého. V případě studie transaktivace byly buňky transfektovány 1 µg GRE-tk-CAT plasmidem, 1 µg polyII-β-GAL plasmidem a KS plasmidem (Stratagene), s.q.f. 5 µg. V případě studie transreprese byly buňky transfektovány 3 µg Coll (-517/+63)CAT plasmidem, 250 ng pSV-cjun plasmidem, 1 µg polyII β-GAL plasmidem a KS plasmidem (Stratagene), s.q.f. 5 µg. Sraženina se ponechala v kontaktu s buňkami po 16 h. Buňky se poté promyly a pokryly nutričním mediem obsahujícím různé koncentrace dexamethasonu nebo produktů, které se mají zkoumat (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} m). 24 h po přidání produktů se buňky rozpustily v 250 µl pufru MOPSS-NaCl-Triton X-100. CAT je dávkován do buněčných extraktů za použití ELISA Kit (Bohringer Mannheim).

Standardní glukokortikoidy jako dexamethason vyvolávají aktivaci transkripce GRE-tk promotoru a inhibici transkripce promotoru kolagenasy.

Závěr:

Produkty z příkladu 1 a 2 jsou dobrými inhibitory kolagenasy, ale slabými aktivátory transkripce.

	Koncentrace	aktivace	inhibice
	(M)	GRE-tk (%)	Coll promotor(%)
dexamethason	10^{-9}	7,34+/-2,	42,16+/-5,46
	10^{-8}	53,38+/-2,65	87,60+/-2,94
	10^{-7}	89,48+/-2,26	96,63+/-1,78
	10^{-6}	98,82+/-1,18	93,08+/-2,87
příklad 1	10^{-9}	3,78+/-0,87	3,57+/-3,09
	10^{-8}	27,74+/-1,05	37,12+/-6,7
	10^{-7}	35,21+/-2,24	57,61+/-2,46
	10^{-6}	37,56+/-1,9	81,79+/-2,98
příklad 2	10^{-9}	0	20,61+/-3,19
	10^{-8}	1,34+/-1,33	36,2+/-1,39
	10^{-7}	10,45+/-4,33	81,32+/-1,82
	10^{-6}	16,92+/-3,55	75,57+/-1,34

2) Protizánětlivá aktivita

Nádorový (granuloma) test – Thymolitická aktivita

Protizánětlivá aktivita byla zkoumána podle standardního nádorového testu. Byla použita technika modifikace metody Meier and Coll. (Experientia, 1950, 6, 469). Krysím samičkám Wistar o hmotnosti od 90 do 100 g byly implantovány pod kůži thoraxu dvě bavlněné pelety o hmotnosti 10 mg. Produkty se okamžitě podaly orální cestou a dále jednou denně po čtyři dny. Zvířata pak byla usmrcena. Pelety obklopené nádorovou tkání byly zváženy v čerstvém stavu a poté po 18 h při 60°C. Váha nádoru se vypočítala odečtením počáteční váhy bavlny.

Byly odstraněny brzlíky a zváženy za účelem stanovení thymolytické aktivity produktů.

29.08.99

Produkt podle příkladu	nádor ED 50(mg/kg/po)	thymolysis EDD 50(mg/kg/po)
dexamethason	0,1	<0,05
prednisolon	2,5	1,6
příklad 1	5	2,5
příklad 2	>7	2,5

Závěr: produkty z příkladů 1 a 2 vykazují protizánětlivou aktivitu blízkou prednisolonu.

Test ušního edému vyvolaného krotonovým olejem

Produkty byly rovněž testovány na modelu ušního edému u myši vyvolaného krotonovým olejem podle metody popsané v Tonelli et al. (Endocrinology, 1965, 77, 625-634). Ušní edém byl vyvolán u myšního samečka o váze 18 až 22 g krotonovým olejem (2% v/v) v roztoku pyrydin-voda-éter v poměru 4:1:14,6 (obj.). Zvířata byla usmrcena po 6 h, ucha byla vyjmuta a zvážena. Rozdíly ve váze mezi uchem natřeným krotonovým olejem a uchem neošetřeným umožnily určit 100%edému. Testované produkty byly rozpuštěny v roztoku krotonového oleje a aplikovány na ucho.

Produkt z příkladu	edém vyvolaný krotonovým olejem (myš) ED 50 (μg/ucho)
Dexamethason	1
Prenisolon	4
Příklad 1	10
Příklad 2	2

Závěr : v tomto testu vykazuje produkt dle příkladu 2 protizánětlivou aktivitu mezi protizánětlivou aktivitou prednisolonu a dexamethasonu.

29.05.99

3) Imunosupresivní aktivita

Imunosupresivní aktivita byla zkoumána podle testu zpožděné hypersensitivity popsané v článku publikovaném Hambleton et al. (Agents and Actions, 990, 29, 328). Krysím samečkům Wistar vážícím od 150 do 160 g byla ke dni 0 aplikována subkutánní injekcí do zadečku suspence Mycobacterium Tuberculosis 4 mg/ml v parafinovém oleji (0,1 ml/zvíře).

Produkty byly podávány orální cestou od čtvrtého do sedmého dne.

Sedmého dne, hodinu po poslední dávce, byla zvířatům injekčně podána rozpustná frakce antigenu stimulující hypersensitivní reakci: 0,4 mg/krysa v 0,2 ml implantární cestou do zadní tlapky.

Edém byl změřen 24 h poté za použití UGO BASIL plethysmometru od fy APELEX.

Aktivita produktů byla vyhodnocena procentní redukcí zvětšení tlapky, do níž byla aplikována injekce ve srovnání s kontrolními zvířaty.

Produkt z příkladu	Zpožděná hypersensitivita (M.Tuberculosis, krysa) ED 50 (mg/kg)
dexamethason	0,05
prednisolon	5–20
příklad 1	2,3
příklad 2	1,5

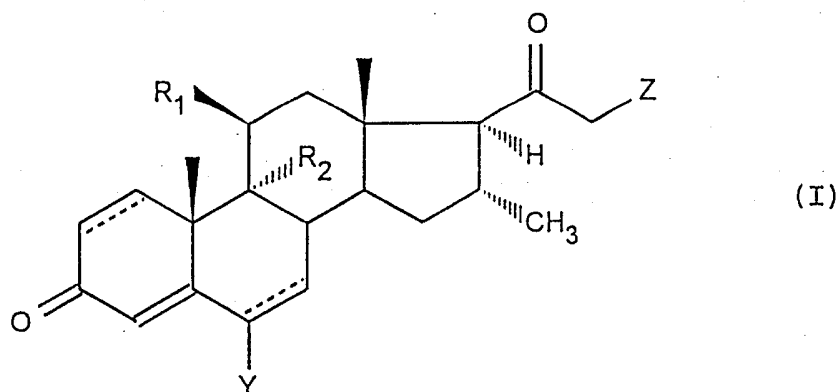
Závěr:

prednisolon vykazuje hodnotami ED 50 plateau mezi 5 a 20mg/kg s maximální inhibicí 50%, produkty z příkladu 1 a 2 mají hodnoty ED 50 2,3 a 1,5 mg/kg. Jejich aktivita je závislá na dávkování, maximum inhibice 82% (příklad 1) a 90% (příklad 2) při 10mg/kg.

29.06.99

Patentové nároky

1. Sloučeniny o obecném vzorci (I)



ve kterém buď R_1 představuje atom halogenu, hydroxylradikál, alkyloxy radikál s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, acyloxy radikál s obsahem 1 až 12 atomů uhlíku a R_2 představuje atom halogenu nebo atom vodíku nebo R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu, Z se zvolí z alkyloxy skupin s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, nesubstituovaných nebo substituovaných alkylthio skupin s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, nesubstituovaných nebo substituovaných arylthio skupin s obsahem 6 až 12 atomů uhlíku, halogenu, kyano, merkpto, thiokyanato, CO_2A a $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{A}$ skupin, kde A je atom vodíku nebo alkyl skupina s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, Y představuje atom vodíku nebo methyl, tečkovaná čára v pozici 1-2 nebo 5-6 představuje volitelně druhou vazbu, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami za předpokladu, že sloučenina 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -6-methyl-21-chlor-pregna-1,4-dien-3,20-dion je vyloučena a když R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu, Z není atom halogenu.

2. Sloučeniny o vzorci (I) podle nároku 1, kde R_1 je hydroxylradikál a R_2 je atom fluoru, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

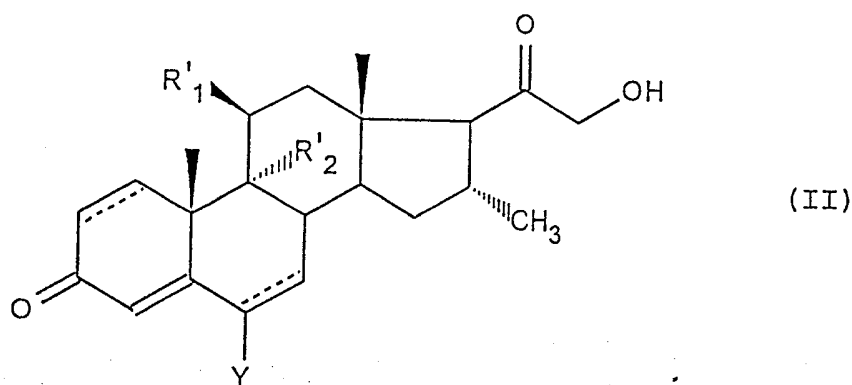
3. Sloučeniny o vzorci (I) podle nároku 1 nebo 2, kde kruh B je nasycen a Y je atom vodíku, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

4. Sloučeniny o vzorci (I) podle jednoho z nároků 1-3, kde Z je zvoleno z kyano a alkylthio skupin s obsahem 1 až 78 atomů uhlíku.

5. Sloučeniny o vzorci (I) podle nároku 1

9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregn-4-ene-3,20-dioxo-21-karbonitril,
 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
 methyl 3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-nor cholan 1,4-dien-24-oát,
 21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
 21-thio-(2-hydroxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
 21-thio-(2-acetyloxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
 9 α ,11 β -dichlor-21-fluor-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion .

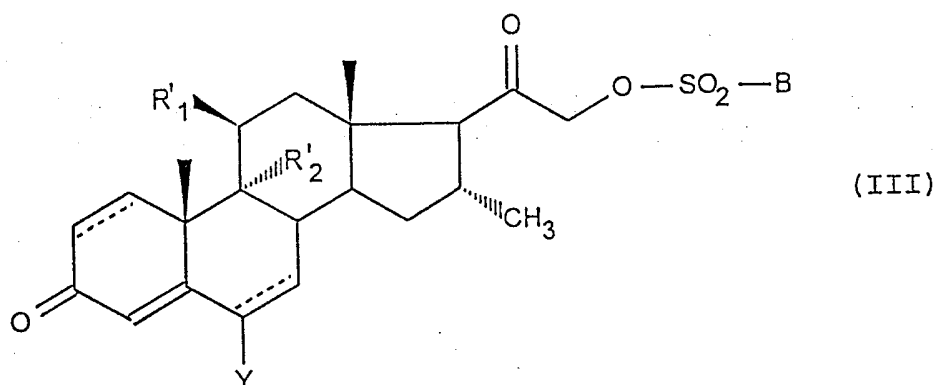
6. Způsob přípravy sloučenin o vzorci (I) vyznačený tím, že sloučenina o obecném vzorci (II)



ve kterém buď R'_1 je hydroxyl a R'_2 je halogen nebo vodík nebo R'_1 je halogen a R'_2 je halogen nebo vodík nebo R'_1 a R'_2 spolu vytvářejí druhou vazbu a Y je výše definováno, je podrobena působení aktivačního činidla alkoholu o vzorci Hal-SO₂-B, kde Hal je atom bromu nebo atom chloru a B je alkyl radikál s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaný nebo substituovaný 1 až 5 atomy halogenu nebo fenyl nebo naftyl skupina nesubstituovaná nebo substituovaná 1 až 5 alkyl

29.06.99

skupinami s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku za účelem přípravy sloučeniny
o obecném vzorci (III)



při čemž sloučenina o vzorci (III) je případně podrobena jedné nebo více
následných reakcí ve vhodném pořadí za účelem přípravy sloučeniny o obecném
vzorci (I):

působení chloračního jodačního, bromacího nebo fluoračního činidla,

působení volitelně substituovaného alkylthiolu nebo arylthiolu,

působení thioamidu nebo thiomočoviny s následnou hydrolýzou,

působení KCN,

hydrolýza kyano skupiny v kyselém prostředí, poté volitelně
esterifikace nebo tvorba solí

postupné působení $\text{CH}_2(\text{COOEt})_2$, a zmýdelnění, poté

dekarboxylace volitelně následovaná esterifikací,

působení KSCN nebo NaSCN,

působení alkoholu nebo alkoholátu,

acylace v pozici 11,

alkylace v pozici 11,

redukce dvojně vazby v pozici 1 – 2,

vytvoření dvojně vazby v pozici 1 – 2,

dehydratace za účelem vytvoření dvojně vazby v pozici 9 – 11,

tvorba solí.

29.06.99

7. Sloučeniny o obecném vzorci (I) podle nároku 1 jako léčiva, jakož i jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

8. Sloučeniny o obecném vzorci (I) podle jednoho z nároků 2 až 4 jako léčiva, jakož i jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

9. Sloučeniny o obecném vzorci (I) podle nároku 5 jako léčiva.

10. Farmaceutické kompozice s obsahem léčiv podle nároků 7 až 9.

11. Sloučeniny o obecném vzorci (III) podle nároku 6 jako průmyslové produkty s tím, že dále uváděné sloučeniny o vzorci (III) jsou vyloučeny :

21-(methansulfonyloxy)16 α -methylpregna-1,4,9(II)-trien-3,20-dion

21-(methansulfonyloxy) 11 β -hydroxy-16 α -methyl-pregna-1,4-dien-3,20-dion

21-(4-methylfenylsulfonyloxy)-16 α -methyl-pregna-1,4,9(II)-trien-3,20-dion.