(19) DANMARK

PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **158358 B**

(21) Patentansøgning nr.: **2827/84**

(51) Int.Cl.[5] **C 07 J 1/00**

(22) Indleveringsdag: **08 jun 1984**

(41) Alm. tilgængelig: **19 dec 1984**

(44) Fremlagt: **07 maj 1990**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **18 jun 1983 DE 3322285**

(71) Ansøger: ***SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT; Muellerstrasse 170-178; 1 Berlin 65; Berlin und Bergkamen, DE**

(72) Opfinder: **Ulrich *Kerb; DE, Gerhard *Sauer; DE, Rudolf *Wiechert; DE, David *Henderson; DE, Yukishige *Nishino; DE, Sybille *Beier; DE**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) 1-substituerede androsta-1,4-dien-3,17-dioner og farmaceutiske præparater indeholdende dem

(56) Fremdragne publikationer

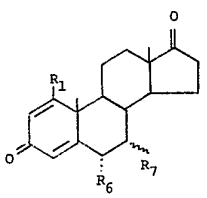
---

(57) Sammendrag:

De hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I er egnede til fertilitetskontrol og til behandling af sygdomme, der fremkaldes af østrogener.

2827-84

1-alkyl-androsta-1,4-dien-3,17-dioner med den almene formel I:



(I')

hvor R_1 er en methyl-, ethyl-, hydroxymethyl-, C_1-C_3-alkoxymethyl- eller C_1-C_4-alkanoyloxymethylgruppe,

R_6 er et hydrogenatom eller en methylgruppe og

R_7 er et hydrogenatom eller en methylgruppe i 7α- eller 7β-stilling.

DK 158358 B

Opfindelsen angår hidtil ukendte 1-substituerede androsta-1,4-dien-3,17-dioner, som er ejendommelige ved at have den i krav 1 angivne formel I, og farmaceutiske præparater indeholdende disse forbindelser.

Det har vist sig, at de hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I hæmmer østrogenbiosyntesen. Dette er overraskende, for de tilsvarende i 1-stilling usubstituerede androsta-1,4-dien-3,17-dioner forhøjer østrogenspejlet tydeligt.

Ved biosyntesen af østrogener spiller omdannelsen af androgener til østrogener en vigtig rolle. Denne omdannelse forløber over en række reaktioner, der sammenfattet betegnes som "aromatisering." Enzymet aromatase er det hastighedsbestemmende enzym ved omdannelsen af androstendion og testosteron til østron og østradiol.

Forbindelserne ifølge opfindelsen blev undersøgt for aromatasehæmningsvirkning og for endokrinfarmakologiske bivirkninger.

A: 4-hydroxy-4-androsten-3,17-dion, "Endocrinology 100(1977)1684." (som sammenligningsstof ved afprøvning for aromatasehæmningsvirkning, for østrogen virkning og ved testikelhæmningsvirkning).

B: 1-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

C: 1,7α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

D: 1,6α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

1.) PMSG-test på rotte til afprøvning af aromatasehæmningsvirkning.

Påvirkningen på PMSG (pregnant mare serumgonadotropin)-stimuleret østrogenproduktion med prøvestofferne A, B, C og D blev undersøgt. Den ved behandlingen med PMSG forøgede sekretion af østradiol (kontrol) kan formindskes ved applikation af aromatasehæmmere.

20 dage gamle hunrotter blev hveranden dag forbehandlet subcutant ialt 7 gange med 100 I.U. PMSG. En time før og otte timer efter den sidste PMSG-applikation (d_{12}) fik dyrene prøvestoffet ved injektion. Kontroldyrene fik kun bæreren. 24 timer efter den sidste PMSG-applikation blev dyrene dræbt. Østradiol blev så bestemt serumradioimmunologisk. Der angives østradiolkoncentrationen i nmol/l og standardafvigelsen

Signifikanserne af forskellene fra kontrolgruppen blev undersøgt ved variansanalyse. Virkningsstyrken blev konstateret ved regressions/kovariansanalyse.

Tabel 1

Påvirkning af østradiolkoncentrationen i perifer serum hos PMSG-forbehandlet rotte.

	Dosis mg/dyr 2 x s.c.	n	Østradiol-koncentration nmol/l		Relativ virkningsstyrke (A = 1,0)
PMSG-kontrol	(0,2 ml bærer)	10	4,25 ± 1,57		
A	0,1	10	4,31 ± 1,78		1,0
	0,3	10	3,19 ± 1,31		
	1,0	10	1,58 ± 0,92	*	
	3,0	10	1,52 ± 0,74	*	
B	0,1	10	3,53 ± 1,84		1,3
	0,3	10	2,92 ± 1,o9		
	1,0	10	1,80 ± 1,13	*	
	3,0	10	0,78 ± 0,18	*	
C	0,1	10	2,21 ± 1,o5	*	6,3
	0,3	10	0,81 ± 0,32	*	
	1,0	10	0,49 ± 0,21	*	
	3,0	10	0,37 ± 0,11	*	
D	0,1	10	3,73 ± 0,89		1,2
	0,3	10	2,78 ± 1,17		
	1,0	10	1,78 ± 0,67	*	
	3,0	10	1,o2 ± 0,38	*	

* = signifikant forskel fra PMSG-kontrol

n = antal dyr pr. gruppe

Forbindelserne B, C og D ifølge opfindelsen bevirker - ligesom sammenligningsstoffet A - dosisafhængigt fald af den med PMSG forhøjede østradiolkoncentration i perifer serum hos rotter (tabel 1). B og D er ca. ligeså stærkt virkende som sammenligningsstoffet A, medens C er ca. 6 gange så virksomt som sammenligningsstoffet A.

2.) Uterus/vagina-vækstprøve hos mus og rotter til afprøvning for østrogenvirkning.

Ovariektomierede rotter (200 g) eller mus (30 g) fik dagligt, en gang, 5 dage i træk prøvestoffet subcutant. Kontroldyrene fik kun bæreren.

En dag efter den sidste behandling blev dyrene dræbt. Uterus og vagina blev så straks udpræpareret og vejet.

For hver gruppe blev konstateret middelværdien af organvægten og standardafvigelsen. Signifikanserne af forskellene fra kontrolgruppen blev undersøgt ved variansanalyse.

Tabel 2

Østrogentest hos ovariektomierede mus.

	Dosis mg/dyr/d s.c.	Organvægt [mg] Uterus	Vagina
E_2-kontrol	0.00003	126,5 ± 20,5 *	55,9 ± 7,8
A	3	48,4 ± 8,8 *	16,6 ± 3,3
	10	64,7 ± 13,1 *	23,1 ± 4,4
B	3	23,8 ± 6,7	17,7 ± 4,5
	10	13,7 + 3,0	10,6 ± 1,5
Olie-kontrol	-	32,3 ± 9,2	23,5 ± 6,5

* = signifikant forskel fra kontrol

E_2 = østradiol

Tabel 3

Østrogentest hos ovariektomierede rotter.

	Dosis mg/dyr/d s.c.	Organvægt [mg] Uterus	Vagina
E_2-kontrol	0.0001	214,4 ± 25,1 *	102,3 ± 11,8*
A	3	94,3 ± 21,9	52,9 ± 5,7
	10	131,9 ± 21,0	68,1 ± 6,2
B	3	85,0 ± 7,6	55,8 ± 7,4
	10	87,4 ± 21,1	56,6 ± 9,4
Olie-kontrol	-	94,5 ± 22,8	66,0 ± 20,5

* = signifikant forskel fra kontrol

E_2 = østradiol

Forbindelsen B ifølge opfindelsen (3 og 10 mg/dyr/dag 5 x s.c.) viser hverken hos rotte eller mus en østrogenvirkning (tabel 2 og 3). Sammenligningsstoffet A fører derimod ved en dosis på 3 og 10 mg/dyr/dag (5 x s.c.) til en signifikant stigning i uterusvægten.

3.) Testikelhæmningsprøve på rotte til afprøvning af antigonadotrop virkning.

Infantile hanrotter (30 g) blev daglig, en gang, i 12 dage behandlet subcutant med prøvestoffet. En dag efter den sidste behandling blev dyrene dræbt og testikelvægten konstateret. Kontroldyrene fik kun bæreren.

Til kontrol blev organvægten af prostata, sædblærer og binyrer konstateret.

Organvægtene blev omregnet til mg/100 g legemsvægt. For hver gruppe blev beregnet middelværdien og standardafvigelsen.

Signifikanserne af forskellene fra kontrollen blev afprøvet ved variansanalyse.

Tabel 4

Testikelhæmningsprøve på rotte.

	Dosis mg/dyr/d	n	Testikel	Organvægt mg/100 g legemsvægt Sædblære	Prostata	Binyrer
B	1	10	891 ± 75	12,8 ± 4,4 *	40,1 ± 6,7	32,4 ± 5,4
	3	10	913 ± 70	14,5 ± 3,6	42,0 ± 7,7	27,4 ± 3,4
A	1	10	779 ± 125 *	9,6 ± 2,6 *	43,3 ± 9,8	23,9 ± 2,9 *
	3	10	633 ± 50 *	14,4 ± 3,0	57,5 ± 11,7	26,1 ± 4,3
Kontrol (Olie)	-	10	1012 ± 129	17,8 ± 5,1	51,3 ± 17,0	30,3 ± 3,1

n = antal dyr pr. gruppe

* = signifikant forskel fra kontrol

DK 158358 B

Forbindelsen B ifølge opfindelsen har i de afprøvede doser (1 og 3 mg/dyr/dag 12 x s.c.) ved testikelhæmningsprøven ingen indflydelse på testikelvægten (ingen antigonadotrop virkning), men bevirker i en dosis på 1 mg/dyr/dag et let fald i sædblærevægten. Derimod fører sammenligningsstoffet A til et signifikant fald af organvægtene af testikler, sædblærer og binyrer.

Ved anabol/androgen-prøven har forbindelsen B ifølge opfindelsen ingen indflydelse på den friske vægt af sædblærer, prostata, M. levator ani og binyrer.

Af forsøgene 1-3 fremgår, at forbindelserne ifølge opfindelsen er stærke aromataseinhibitorer, som er vidtgående neutrale endokrinfarmakologisk.

Som aromataseinhibitorer er de hidtil ukendte forbindelser af den almene formel I egnede til hæmning af østrogenbiosyntesen og dermed til behandling af sygdomme, der er betinget af østrogener eller afhængige af østrogener.

Et østrogenoverskud finder man ofte hos kvinder i menopausen med en risiko for at få brystkræft.

Hos mænd fører en forøget østrogenproduktion og et forhøjet østrogen/androgen-forhold til gynækomasti og til prostatahyperplasi.

Forbindelserne egner sig dermed til behandling af brystkræft og andre østrogeninducerede eller- stimulerede tumorer.

Aromataseinhibitorer er også med fordel egnede til profylaktisk og/eller terapeutisk behandling af prostatahyperplasi.

De hidtil ukendte forbindelser er også værdifulde til påvirkning af fertilitet f.eks. til behandling af mandlig infertilitet, som er et resultat af forhøjet østrogenspejl. Endvidere kan forbindelserne anvendes som antifertilitetsmiddel for at forhindre ovulation eller implantation hos kvinder i den forplantningsdygtige alder.

Forbindelserne kan indgives oralt eller parenteralt f.eks. intraperitonalt, intramuskulært, subcutant eller percutant. Forbindelserne kan også implanteres i vævet.

Den mængde forbindelse der skal indgives svinger inden for et bredt område og kan dække enhver virksom mængde. I afhængighed af den tilstand, som skal behandles og indgiftsmåden, kan mængden af den indgivne forbindelse være 0,01-100 mg/kg legemsvægt fortrinsvis 0,1-20 mg/kg legemsvægt pr. dag.

Til oralindgift kan der være tale om kapsler, piller, tabletter, dragéer osv. Doseringsenhederne kan ved siden af det virksomme stof indeholde en farmaceutisk anvendelig bærer, som f.eks. stivelse, sukker, sorbit, gelatine, glidemidler, kiselsyre, talkum osv. De enkelte doseringsenheder til oral applikation kan f.eks. indeholde 10-100 mg virksomt stof (aromataseinhibitor).

Til parenteral indgift kan de virksomme stoffer være opløst i et fysiologisk anvendeligt fortyndingsmiddel eller suspenderet i et sådant. Som fortyndingsmiddel anvendes meget hyppigt olier med eller uden tilsætning af en opløsningsformidler, et overfladeaktivt middel, et suspenderingsmiddel eller emulgeringsmiddel. Eksempler på anvendte olier er f.eks. olivenolie, jornøddeolie, bomuldsfrøolie, soyabønneolie, ricinusolie og sesamolie.

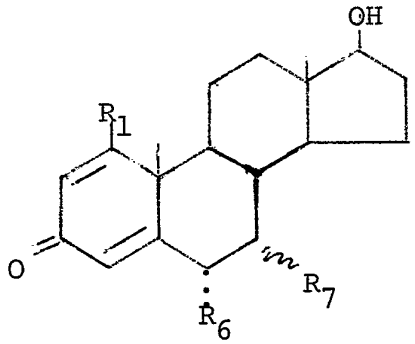
Forbindelserne kan også anvendes i form af en depotinjektion eller et implantatpræparat, der kan være sammensat således, at en forhalet frigørelse af et virksomt stof muliggøres.

Implantater kan som indifferente materialer indeholde f.eks. biologisk nedbrydelige polymere eller syntetiske siliconer som f.eks. siliconekautsjuk. De virksomme stoffer kan desuden, med henblik på percutan applikation, indarbejdes f.eks. i et plaster.

Opfindelsen angår også farmaceutiske præparater, der er ejendommelige ved, at de indeholder forbindelser med den almene formel I.

De hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I kan fremstilles ved, at man

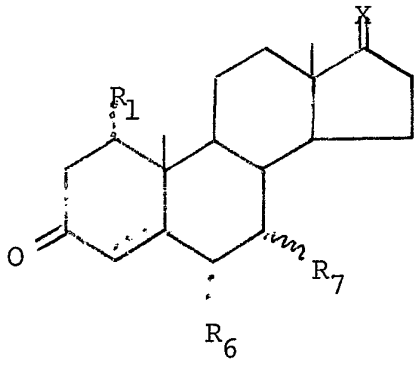
a) i et 17-hydroxysteroid med den almene formel II:



(II)

hvor R_1, R_6 og R_7 har den i formel I anførte betydning, oxiderer 17-hydroxygruppen til 17-oxogruppen eller:

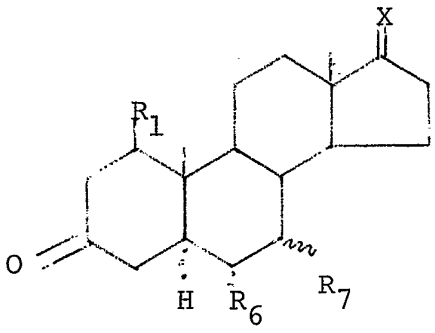
b) dehydrogenerer et i A-ringen mættet eller enkelt umættet steroid med den almene formel III:



(III)

hvor X er O, H(OH) eller H(OAc), hvor Ac er en lavere acylgruppe indeholdende 1-4 C-atomer, R_1, R_6 og R_7 har den i formel I anførte betydning og Δ^4-dobbeltbindingen er fakultativ i 1,2- eller 1,2- og 4,5-stillingen, og oxiderer en fri eller frigjort 17-hydroxygruppe eller

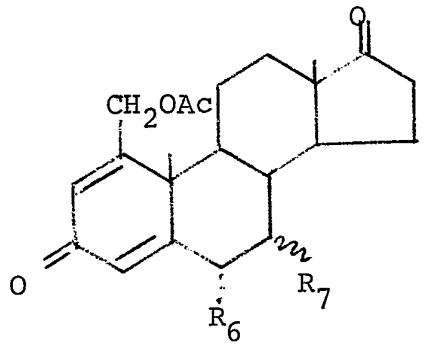
c) dehydrogenerer et i A-ringen mættet steroid med den almene formel IV:



(IV)

hvor X er O, H(OH) eller H(OAc), hvor Ac er en lavere acylgruppe indeholdende 1-4 C-atomer og R_1, R_6 og R_7 har den i formel I anførte betydning i 1,2- og 4,5-stilling, og oxiderer en fri eller frigjort 17-hydroxygruppe eller

d) forsæber alkanoyloxygruppen i et 1-alkanoyloxymethylsteroid med den almene formel I':



(I')

hvor Ac er en alkanoylgruppe med 1-4 carbonatomer, og R_6 og R_7 har den i formel I anførte betydning og eventuelt omdanner den frigjorte hydroxygruppe i 1-hydroxymethylsteroidet til en C_{1-3}-alkylether eller en fra OAc forskellig C_{1-4}-alkanoylester.

Omsætningerne a) og b) sker på kendte måder indenfor steroidkemien.

Oxidationerne ifølge fremgangsmådevariant a kan udføres på i og for sig kendt måde, f.eks med kromsyrereagenser (Jones-reagens eller kromsyre-pyridin) eller med pyridiniumdichromat eller- chlorchromat.

1,2-dehydrogeneringen ifølge fremgangsmåde b kan udføres på kendte måder med dehydrogeneringsmidler såsom selendioxid eller dichlordicyanobenzoquinon.

Dobbeltbindinger i 1,2- og 4,5-stilling kan indføres samtidig f.eks. ved bromering til den tilsvarende 2,4-dibrom-3-keton og dehydrobromering af dibromidet med lithium- el-calciumcarbonat og lithiumbromid i dimethylformamid.

En ved omsætningen frigjort 1-hydroxymethylgruppe kan bagefter forestres eller forethres, og en frigjort 17-hydroxygruppe kan bagefter oxideres.

Forestringen af 1-hydroxymethylgruppen i nærværelse af en 17-hydroxygruppe sker fortrinsvis med blydiacetat og eddikesyreanhydrid i dimethylformamid.

Oxidationen af 17β-hydroxygruppen udføres efter fremgangsmådevariant a.

Til dehydrogeneringen ifølge fremgangsmådevariant c kan der være tale om både kemiske dehydrogeneringsmidler og mikrobiologisk dehydrogenering. Egnede mikroorganismer til indføring af 1,2- og 4,5-dobbeltbindingen er f.eks. schizomyceter som f.eks. arthrobacter simplex (ATCC 6946), bacillus lentus (ATCC 13805) eller bacillus sphaericus (ATCC 7055).

Hydrolysen af en 1-alkanoyloxymethylgruppe ved fremgangsmåde d kan ske med en uorganisk base i alkoholisk opløsning. Den eventuelt efterfølgende forestring foretages fortrinsvis med det tilsvarende syreanhydrid i nærværelse af organiske baser.

Til omdannelse af 1-hydroxymethylsteroidet med den almene formel I til den tilsvarende 1-alkoxymethylether bliver, i en foretrukken udførelsesform, 1-hydroxymethylsteroidet omsat med p-toluensulfonsyrechlorid og pyridin til 1-tosyloxymethylsteroid og derpå med alkalimetalalkoholat til 1-alkoxymethylsteroid.

De følgende eksempler belyser opfindelsen nærmere.

Eksempel 1

6,01 g 17β-hydroxy-1-methyl-androsta-1,4-dien-3-on opløses i 100 ml acetone. Til denne opløsning dryppes 22 ml af en chromsyreopløsning (fremstillet af 6,67 g CrO_3, 6 ml koncentreret H_2SO_4 og opfyldning med vand til 100 ml) ved stuetemperatur. Der efterrøres 1 time og udfældes derpå i isvand, produktet frasuges og tørres. Efter omkrystallisation af acetone/hexan fås 5,25 g 1-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 165°-166°C.

Eksempel 2

30 g 1α,7α-dimethyl-4-androsten-3,17-dion opvarmes under tilbagesvaling i 8 timer i 700 ml dioxan sammen med 30 g dichlordicyanobenzoquinon. Efter afkøling suges fra uopløst stof, vaskes med dioxan og filtratet inddampes i vakuum. Remanensen kromatograferes på silica gel og omkrystalliseres af acetone/hexan. Man får 18 g 1,7α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 148°-151°C.

Analogt fremstilles:

1,7β-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 196-197°C, af 1α,7β-dimethyl-4-androsten-3,17-dion,

1,6α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 234-235°C, af 1α,6α-dimethyl-4-androsten-3,17-dion,

1-ethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 175-176°C, af 1α-ethyl-4-androsten-3,17-dion.

Eksempel 3

9,1 g 1α-acetoxymethyl-17β-acetoxy-5α-androstan-3-on, (smp. 193°-194°C)[fremstillet af 3,3-ethylen-dioxy-1-methylen-5α-androstan-17β-ol (Naturwissenschaften 51, 86 (1963)) ved hydroborering, acetylering og ketalspaltning], opløses i 90 ml iseddike. Til denne opløsning dryppes 3,2 ml brom i 25 ml iseddike, og der efterrøres i 10 minutter. Efter fældning i natriumsulfitholdigt isvand frasuges produktet, vaskes med vand og tørres. 16,5 g råt dibromid omrøres i 100 ml dimethylformamid med 10 g lithiumbromid og 20 g calciumcarbonat i 3,5 time ved en badtemperatur på 120°C. Efter afkøling frasuges de uorganiske salte og eftervaskes med 150 ml methanol. Til filtratet sættes 6 g kaliumhydroxid i 20 ml vand, og der omrøres i 16 timer ved stuetemperatur. Reaktionsopløsningen indhældes i isvand, produktet frasuges og tørres. Den rå 1-hydroxymethyl-17β-hydroxy-androsta-1,4-dien-3-on (7,5 g) opløses i 100 ml dimethylformamid, der tilsættes 1 g blydiacetat og 15 ml eddikesyreanhydrid og omrøres i 6,5 time ved stuetemperatur. Efter fældning i vand og frasugning af produktet oxideres med chromsyre som beskrevet i eksempel 1. Man får efter omkrystallisation af acetone/hexan 2,3 g 1-acetoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 121°-123°C.

Eksempel 4

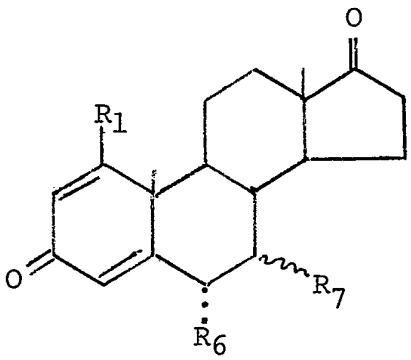
2,2 g 1-acetoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion omrøres ved 0°-5°C, under en argongas i 5 timer, i 20 ml methylenchlorid og 25 ml methanol sammen med 250 mg kaliumhydroxid. Derefter neutraliseres med eddikesyre, inddampes og fældes i vand. Produktet frasuges, vaskes med vand og tørres. Efter omkrystallisation af acetone/hexan får man 1,7g 1-hydroxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 201°-202°C.

Eksempel 5

500 mg 1-hydroxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion opløses i 5 ml pyridin afkøles til 0°C, og der tilsættes 350 mg p-toluensulfonylchlorid og omrøres i 3 timer ved stuetemperatur. Efter fældning af produktet i vand, frasugning, vask med vand og tørring, fås 700 mg råt tosylat. Dette råprodukt omrøres i 5 timer ved 20°C i 5 ml toluen med 500 mg kaliummethylat. Derefter fortyndes med ether, vaskes med fortyndet saltsyre og med vand og inddampes i vakuum. Efter kromatografi på silicagel og omkrystallisation af hexan/acetone får man 325 mg 1-ethoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, smp. 95°-98°C.

P a t e n t k r a v .

1. 1-substituerede androsta-1,4-dien-3,17-dioner med den almene formel I:



(I)

hvor R_1 er en methyl-, ethyl-, hydroxymethyl-, C_1-C_3-alkoxymethyl- eller C_1-C_4-alkanoyloxymethylgruppe,
R_6 er et hydrogenatom eller en methylgruppe og
R_7 er et hydrogenatom eller en methylgruppe i 7α- eller 7β-stilling.

2. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

3. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1,7α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion eller 1,7β-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

4. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1,6α-dimethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

5. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1-ethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

6. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1-acetoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

7. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1-hydroxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

8. Forbindelse ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er 1-ethoxymethyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion.

9. Farmaceutiske præparater, k e n d e t e g n e t ved, at de indeholder en forbindelse ifølge krav 1-8.