

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2000 - 1888

(22) Přihlášeno: 19.05.2000

(40) Zveřejněno: 16.01.2002

(Věstník č. 1/2002)

(47) Uděleno: 18.12.2003

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 18.02.2004
(Věstník č. 2/2004)

(13) Druh dokumentu: B6

(51) Int. Cl. 7:

C 07 J 7/00

C 07 J 15/00

A 61 K 31/57

A 61 P 23/00

A 61 P 25/20

A 61 P 25/08

(73) Majitel patentu:

ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE AV
ČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

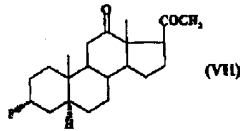
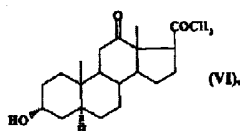
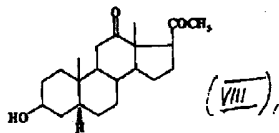
Kasal Alexander, Praha, CZ;
Slavíková Barbora, Černošice, CZ;
Křištofiková Zdenka, Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Nové neuroaktivní steroidy, způsob jejich výroby
a použití**

(57) Anotace:

Nové neuroaktivní steroidy - 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dion vzorce VI a 3 α -fluor-5 α -pregnan-12,20-dion vzorce VII. Tyto deriváty lze připavit z 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dionu vzorce VIII převedením na aktivní intermediáty, které se rozkládají s inverzí konfigurace buď na zmíněný 3 α -hydroxyderivát vzorce VI nebo na 3 α -fluorderivát vzorce VII a které jsou schopny modulovat γ -aminomáselnou kyselinu.



Nové neuroaktivní steroidy, způsob jejich výroby a použití

Oblast techniky

5

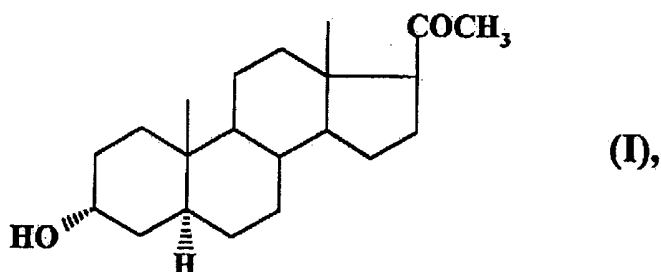
Vynález se týká nových steroidních derivátů, které modulují aktivitu nervového přenašeče – kyseliny γ -aminomáselné.

10

Dosavadní stav techniky

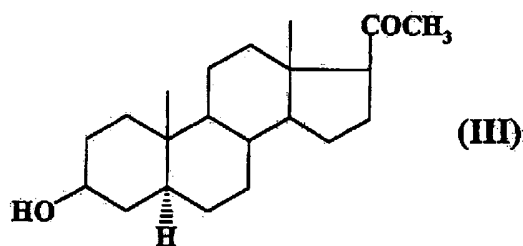
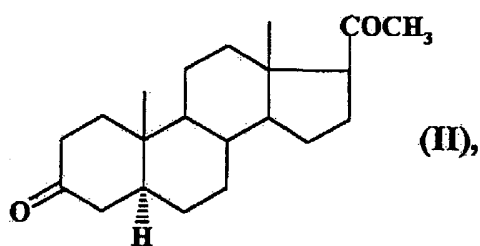
15

Neuroaktivní steroidy jsou použitelné v řadě lékařských aplikací do anestetik přes hypnotika až k antiepileptikům (Besson J. M.: *Lancet* 353, 1610, (1999)). Jejich účinek je vysvětlován tak, že svou vazbou na specifické receptorové místo allostericky zvyšují účinek nervového přenašeče na vodivost chloridového kanálu. Hlavním problémem klinického používání přirozeného neurosteroidu 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-onu vzorce I je jeho malá stabilita v těle. Poločas jeho inaktivace v



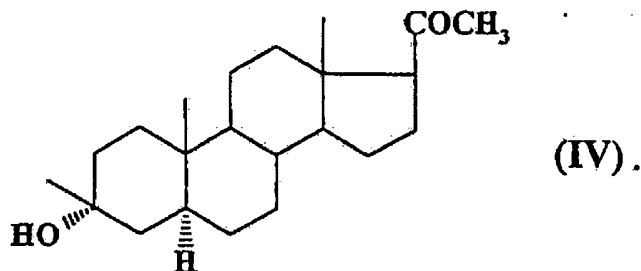
20

těle je 16 minut. Sloučenina I je totiž inaktivována oxidací na neúčinný diketon II a následnou redukcí poskytuje rovněž neúčinný 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-on vzorce III (El-Etr M., Akwa Y., Robel P., Baulieu E. E.: *Brain Res.* 790, 334–338, 1998).



25

Nízkou stabilitu sloučeniny vzorce I řeší různí autoři různě, někteří kontinuální aplikací steroidu I, jiní změnou reaktivity jejich derivátů. Např. někteří výrobci zavedením methylové skupiny do polohy 3 (Carter R. B., Wood P. L., Wieland S., Hawkinson J. E., Belelli D., Lambert J. J., White H. S., Wolf H. H., Mirsadeghi S., Tahir S. H., Bolger M. B., Lan N. C., Gee K. W.: *J. Pharmacol. Pharmacol. Exp. Ther.* 280, 1284–95 (1997) za vzniku sloučeniny vzorce IV zamezí oxidovatelnost pro aktivitu esenciální 3 α -hydroxyskupiny:

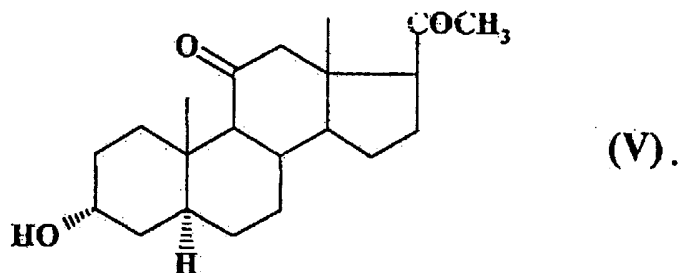


Jiným způsobem, jak zvýšit stabilitu neuroaktivních steroidů v těle, byla náhrada 3-hydroxylové skupiny fluorem (Kasal A., Slavíková B., Chodounská H., Kohout L., Křišťáková Z., Uhlířová L. a Kršiak M.: Nové neuroaktivní steroidy, způsoby jejich přípravy a použití. PV 4214/1999).

5

Nejznámějším neuroaktivním steroidem blízkým 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-onu je jeho 11-oxoderivát vzorce V, který pod názvem „alphaxolone“ (česky alfaxolon) byl používán jako anestetikum. I tento steroid trpí výše zmíněným nedostatkem – rychlým metabolismem v těle. Navíc jeho syntetická dostupnost je ztížena tím, že k přípravě je nezbytné použití ekonomicky náročné mikrobiální hydroxylace.

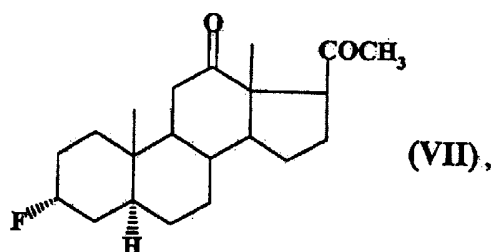
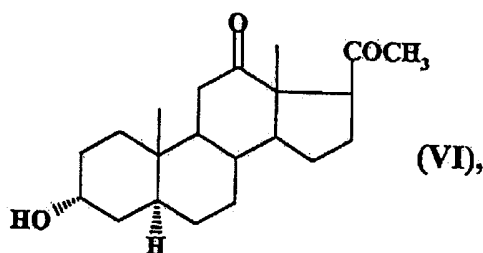
10



Podstata vynálezu

15

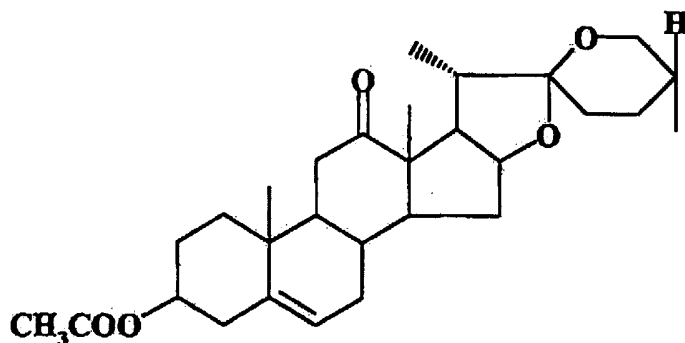
Výše zmíněné nedostatky řeší dva nové neuroaktivní steroidy, založené na 3 α -substituovaných derivátem 5 α -pregnan-12,20-dionu vzorců VI a VII



20

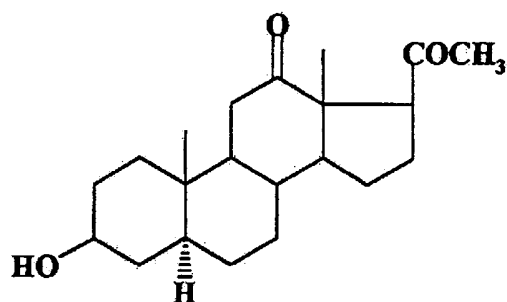
které se od alfaxolonu liší polohou oxoskupiny: ta byla přesunuta do polohy 12. Derivát vzorce VII se vyznačuje mnohem vyšší stabilitou 3-substituentu, protože v ní je 3-hydroxylová skupina nahrazena atomem fluoru.

Zavedení 12-oxoskupiny do steroidní molekuly se docílí volbou výchozí látky, např. hekogenin-acetátu vzorce



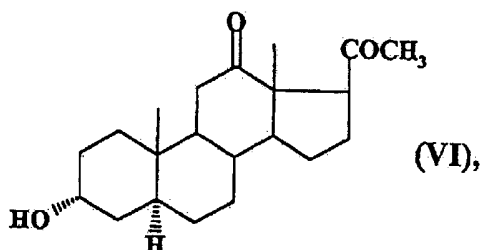
25

který je standardním postupem převeden na 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dion vzorce VIII (Callow R. K., James V. H. T.: *J. Chem. Soc.* 1956, 4744–4749).

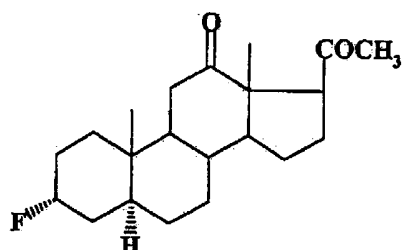


(VIII) .

Změna konfigurace hydroxylové skupiny v poloze 3β na 3α se podle vynálezu provádí tak, že působením alkyl či arylsulfonfylchloridu se docílí převedení na reaktivní intermediát (např. alkyl- či arylsulfonát), který se solvolyzuje v roztoku vodného dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu



(VI),



(VII),

při teplotách 75 až 150 °C za vzniku dosud nepopsaného 3α -hydroxy- 5β -pregnan-12,20-dionu vzorce VI. Solvolýzu je možné provádět v přítomnosti dusitanu sodného nebo draselného. Dalším možným postupem přípravy je formylace s inverzí působením roztoku kyseliny mravenčí v přítomnosti dialkylazodikarboxylátu a trifenyfosfinu a následná alkalická hydrolyza vzniklého 3α -formyloxy- 5α -pregnan-12,20-dionu.

3α -fluor- 5α -pregnan-12,20-dion vzorce VII se připraví tak, že alkyl či arylsulfonát se solvolyzuje bezvodým roztokem anorganického či organického fluoridu, s výhodou diethylaminosulfurtrifloridu ve vhodném rozpouštědle při teplotách 25 až 100 °C.

Výše popsané deriváty vzorců VI a VII jsou použitelné v lékařství v případech, kdy je třeba modulovat aktivitu γ -aminomáselné kyseliny. V příkladu provedení 5 je tato aktivita doložena pokusem *in vivo*. Takový intermediát byl za jiných podmínek opět s inverzí konfigurace podle vynálezu převeden na 3α -fluor- 5α -pregnan-12,20-dion vzorce VII, který překvapivě modulační aktivitu aminomáselné kyseliny vykazoval.

Příklady provedení

Příklad 1: Příprava receptorů γ -aminomáselné kyseliny.

Přední mozek byl homogenizován v 10 objemech ledové 0,32 M sacharózy. Homogenát byl 10 min centrifugován při 1000 g a vzniklý supernatant opět stočen při 20 000 g (20 min). Pelety byly resuspendovány v 10 objemech ledové redestilované vody a centrifugovány při 8000 g (20 min). Vzniklý supernatant byl stočen při 24 000 g (20 min). Pro dokonalé odstranění γ -aminomáselné kyseliny byly pelety zamrazeny na 40 min, po rozmrazení byly synaptické membrány resuspendovány v 10 objemech pufru (pH = 7,4; 20 mM KH_2PO_4 + 200 mM KCl) a opět centrifugovány při 24 000 g (20 min). Tato operace byla opakována třikrát.

Příklad 2: 3 α -Hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dion (VI)

Z roztoku 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dionu (120 mg, 0,38 mmol, ref. Callow R. K., James V. H. T.: *J. Chem. Soc.* **1956**, 4744 – 4749), trifenyfosfinu (300 mg, 1,14 mmol) ve směsi toluenu (10 ml) a benzenu (20 ml) byla rychle oddestilována azeotropická směs (10 ml). Směs byla míchána magnetickým míchadlem v ledové lázni a po 3 minutách byl za míchání přidán diethylazodikarboxylát (10 kapek, 1,43 mmol). Po dalších 8 min byla do žlutého roztoku přikapána bezvodá kyselina mravenčí (3 kapky, 1,43 mmol). Po 3 hod byla směs protřepána roztokem hydrogenuhlčitanu draselného (7%, 5 ml) a vodou, vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena ve vakuu k suchu. Odparek byl nanesen na tenkou vrstvu silikagelu (3 desky, 200 x 200 x 1 mm), která byla vyvíjena roztokem benzenu v etheru (50 %). Detekce produktu byla provedena inspekci v UV světle (234 nm) po postřiku morinem (0,02 % v methanolu). Eluce lipofilního pásu etherem poskytla 106 mg (78 %) 3 α -formiátu. T.t. 195 až 197 °C (aceton); $[\alpha]_D^{+178}$ (chloroform, c = 0,95). ^1H NMR spektrum: 0,89 s, 3H (H-19); 0,95 s, 3H (H-18); 2,26 s, 3H (H-21); 3,32 t, 1H (J = 9,0 Hz, H-3, 3,2 t, 1H (J = 9,0 Hz, H-11); 5,18 m, 1H (W = 16 Hz, H-3); 8,05 s, 1H (HCOO). Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$ (360,5) vypočteno: 73,30 % C, 8,95 % H; nalezeno: 73,23 % C, 9,0 % H.

Formiát (96 mg, 0,26 mmol) a hydrogenuhlčitan draselný (50 mg, 0,36 mmol) byly zahřívány v roztoku methanolu (9 ml) a vody (1 ml) k varu. Po 10 min byla směs zahuštěna ve vakuu na čtvrtinu objemu a produkt byl vysrážen vodou. Krystalizace sraženiny ze směsi acetonu a heptanu poskytla derivát VI (71 mg, 80 %) o t.t. 199 až 201 °C, $[\alpha]_D^{+170}$ (c = 0,9). ^1H NMR spektrum: 0,87 s, 3H (H-19); 0,95 s, 3H (H-18); 2,27 s, 3H (H-21); 2,46 t, 1H (J = 8 Hz, H-17); 3,31 t, 1H (J = 9,0 Hz, H-11); 4,07 m, 1H (W = 16 Hz, H-3). Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_3$ (332,5) vypočteno: 75,86 % C, 9,70 % H; nalezeno: 75,86 % C, 9,65 % H.

Příklad 3: 3 α -Fluor-5 α -pregnan-12,20-dion (VII)

Diethylaminosulfur-trifluor (96,7 mg, 0,60 mmol) byl přidán k roztoku 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dionu (100 mg, 0,3 mmol) v dichlormethanu (1 ml) při 20 °C. Po dvou hodinách byla reakční směs nalita do 5% roztoku hydrogenuhlčitanu draselného, produkt byl extrahován dichlormethanem, promyt vodou a sušen bezvodým síranem sodným. Zbytek po odpaření rozpouštědla byl chromatografován na dvou preparativních deskách silikagelu, eluce petrolether-ether (7:3) poskytla 3 α -fluor-5 α -pregnan-12,20-dion (36 mg, 36 %). T.t. 146 až 149 °C (aceton-heptan), $[\alpha]_D^{+166}$ (c 1,08). IČ spektrum: 1 702 (C=O), 992 (C-F). ^1H NMR spektrum: 0,87 s, 3H (H-19); 0,95 s, 3H (H-18); 2,27 s, 3H (H-21), 2,48 t, 1H (J = 8 Hz, H-17); 3,32 t, 1H (J = 9 Hz, H-11); 4,82 dm, 1H ($J(F, H-3)$ = 49 Hz, H-3). Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{FO}_2$ (334,5) vypočteno: 75,41 % C, 9,34 % H, 5,68 % F; nalezeno: 75,29 % C, 9,36 % H, 5,49 % F.

Příklad 4: 3 α -Fluor-5 α -pregnan-12,20-dion (VII)

K roztoku 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dionu (100 mg, 0,3 mmol) v pyridinu (1 ml) byl přidán 4-toluensulfonylchlorid (100 mg, 0,52 mmol) při 20 °C. Po 24 hodinách byla reakční směs nalita do vody, produkt byl extrahován chloroformem, promyt vodou, zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (5%), vodou, roztokem hydrogenuhlčitanu draselného (5%) a vodou. Po vysušení bezvodým síranem sodným, bylo rozpouštědlo oddestilováno. K odparku byl přidán roztok tetrabutylamoniumfluoridu v tetrahydrofuranu (1M, 1,3 ml) a reakční směs byla ponechána v termostatu při 50 °C po dobu 4 dnů. Pak byla reakční směs nalita do vody, produkt byl extrahován etherem, organická vrstva byla promyta vodou, vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno. Zbytek byl chromatografován na 4 preparativních deskách silikagelu (petrolether:ether, 9:1) a bylo získáno 28 mg (28 %) 3 α -fluor-5 α -pregnan-12,20-

dionu. T.t. 147 až 149 °C (aceton–heptan). Vzorek byl identický s produktem připraveným v předchozím příkladu.

5 Příklad provedení 5

Synaptické membrány z předního mozku 3měsíčního potkana samce kmene Wistar byly inkubovány s (^3H)muscimolem (5 nM) nebo s (^{35}S)TBPS (2 nM). Nespecifická vazba byla stanovena pomocí 1 mM kyseliny γ -aminomáselné (40 % z totální vazby (^3H)muscimolu) nebo 200 μM pikrotoxinu (33 % z totální vazby (^{35}S)TBPS). Steroidy byly rozpuštěny v koncentrovaném dimethylsulfoxidu, zředěny redestilovanou vodou a sonifikovány (konečná koncentrace rozpouštědla byla 3 %).

Výsledky stimulace vazby muscimolu (EC(50)):

10 nM pro derivát VI, 114 nM pro derivát VII.

Výsledky inhibice vazby TBPS (vazba při 100 nM koncentraci steroidu):

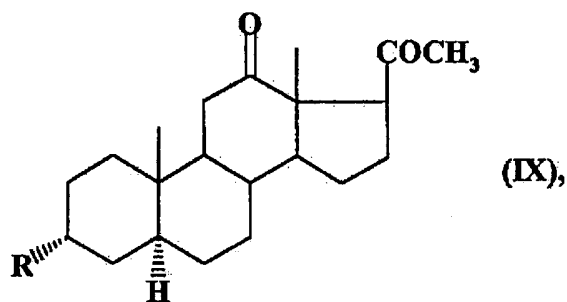
53,1 % pro derivát VI, 64,3 % pro derivát VII.

Průmyslová využitelnost

25 Steroidní deriváty podle vynálezu jsou využitelné pro výrobu léčiv.

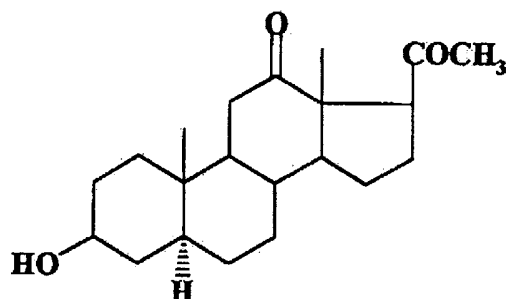
PATENTOVÉ NÁROKY

1. 3α -Substituované deriváty 5α -pregnan-12,20-dionu obecného vzorce IX



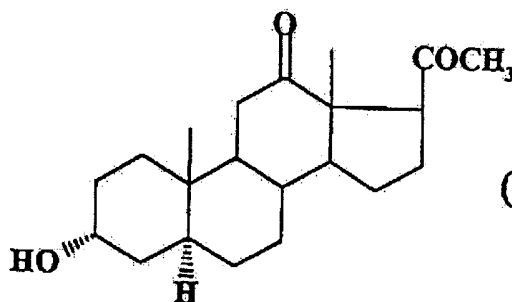
35 kde R znamená hydroxyl nebo fluor.

2. Způsob výroby derivátu podle nároku 1 obecného vzorce IX, kde R znamená hydroxyl, vyznačující se tím, že na sloučeninu vzorce VIII



(VIII)

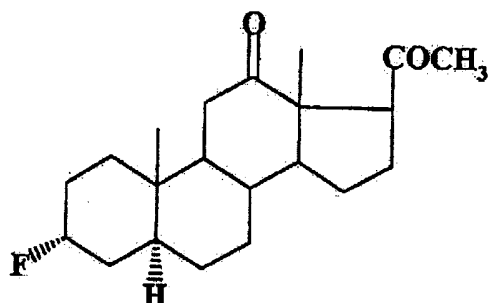
se působí alkyl či arylsulfonfylchloridem a vzniklý alkyl či arylsulfonát se solvolyzuje v roztoku vodného dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu při teplotách 75 až 150 °C za vzniku 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dionu vzorce VI



(VI).

5

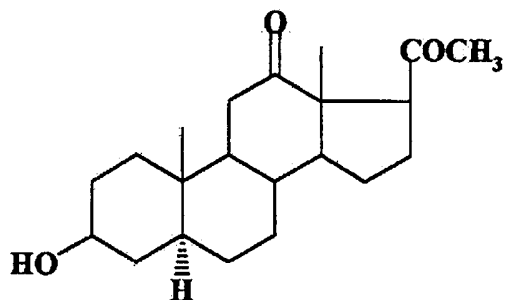
3. Způsob výroby podle nároku 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že solvolýza se provádí v přítomnosti dusitanu sodného nebo draselného.
- 10 4. Způsob přípravy derivátu podle nároku 1 obecného vzorce IX, kde R znamená hydroxyl, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že sloučenina shora uvedeného vzorce VIII se formyluje s inverzí působením roztoku kyseliny mravenčí v přítomnosti dialkylazodikarboxylátu a trifenyfosfinu a vzniklý 3 α -formyloxy-5 α -pregnan-12,20-dion se alkalicky hydrolyzuje na 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-12,20-dion shora uvedeného vzorce VI.
- 15 5. Způsob přípravy derivátu podle nároku 1 obecného vzorce IX, kde R znamená fluor, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že na sloučeninu shora uvedeného vzorce VIII se působí alkyl či arylsulfonfylchloridem a vzniklý alkyl či arylsulfonát se solvolyzuje bezvodým roztokem anorganického či organického fluoridu ve vhodném rozpouštědle při teplotách 25 až 100 °C za vzniku 3 α -fluor-5 α -pregnan-12,20-dionu vzorce VII



(VII).

20

6. Způsob přípravy derivátu podle nároku 1 obecného vzorce IX, v němž R znamená fluor, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že na sloučeninu vzorce VIII



(VIII)

se působí fluoračním činidlem, které nahradí 3β-hydroxylovou skupinu atomem fluoru za vzniku 3α-fluor-5α-pregnan-12,20-dionu výše uvedeného vzorce VII.

- 5 7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že fluoračním činidlem je diethyl-aminosulfurtrifluorid.

8. 3α-Substituované deriváty 5α-pregnan-12,20-dionu obecného vzorce IX, kde R znamená hydroxyl nebo fluor, pro použití jako neuroaktivních látek modulujících účinek kyseliny
10 γ-aminomáselné.

15

Konec dokumentu
