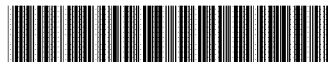




(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO



(21) Broj prijave:

HR P20030060A A2

HR P20030060A A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) Int. Cl.⁷: **C 07 J 1/00**

A 61 K 31/565

A 61 P 5/30

C 07 J 51/00

C 07 J 71/00

(22) Datum podnošenja prijave patenta u HR: 28.01.2003.

(43) Datum objave prijave patenta u HR: 30.06.2004.

(86) Broj međunarodne prijave: PCT/EP01/08535

Datum podnošenja međunarodne prijave 23.07.2001.

(87) Broj međunarodne objave: WO 02/10188

Datum međunarodne objave 07.02.2002.

(31) Broj prve prijave: 00202697.9

(32) Datum podnošenja prve prijave: 28.07.2000.

(33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: EP

(71) Podnositelj prijave:

(72) Izumitelji:

Akzo Nobel N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, NL

Jordi Mestres, New Edinburgh Road, Newhouse, Lanarkshire, ML1 5SH, Scotland, GB

Hubert Jan Jozef Loozen, Meerhoek 602, 5403 AC Uden, NL

Gerrit, Herman Veeneman, Smidse 6, 5374 AJ Schaijk, NL

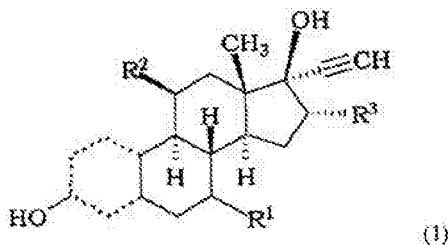
(74) Punomoćnik:

Silvije HRASTE, Zagreb, HR

(54) Naziv izuma:

16- α METIL ILI ETIL SUPSTITUIRANI ESTROGENI

(57) Sažetak:



Izum se sastoji od 16 α supstituiranog steroidnog spoja prikazanog formulom 1, u kojem istočkani prsten predstavlja potpuno zasićeni, aromatski ili zasićeni prsten s Δ^{5-10} dvostrukom vezom. R¹ je (C₁-C₃)alkil ili (C₂-C₃)alkenil, a svaka od ovih grupa može biti zamijenjena jednim ili više halogenom. R² je (C₁-C₄)alkil, (C₂-C₄)alkenil ili metilen i svaka od tih grupa može biti zamijenjena jednim ili više halogenom. R₃ je metil ili etil. Navedeni spoj može se koristiti kao predlijeak u selektivnom liječenju preko estrogenskih receptora α .

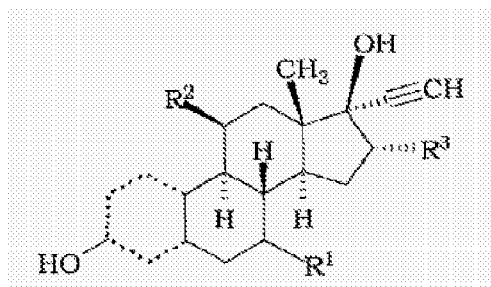
HR P20030060A A2

OPIS IZUMA

Ovaj izum odnosi se na 16 α -substituirani steroidni spoj, na metodu za aktiviranje estrogenih receptora pomoću takvog spoja te za upotrebu takvog spoja za pripravljanje lijeka za tretmane vezane uz estrogeni receptor.

Steroidni spojevi s estrogenom aktivnošću našli su dugoročnu upotrebnost u tretiranju različitih medicinskih indikacija te u režimima za sprječavanje začeća. Unatoč dugoj povijesti ovog područja još uvijek postoji potreba za učinkovitijim, sigurnijim i ekonomičnijim spojevima od onih koji već postoje. Ova potreba još je veća u pogledu napretka ostalih područja u zdravstvu koja su dovela do sve izrazitijeg produljenja životnog vijeka. To se posebice očituje kod žena kod kojih u menopauzi dolazi do drastičnog pada estrogenih hormona što, pak, ima negativne posljedice na čvrstoću kostiju i krvotokne funkcije. Za tretman estrogenima, stoje na raspolaganju veoma aktivni estrogeni 16 α -supstituirani estrogeni steroidi (Fevig i sur., Steroids 51: pp 471-497, 1988), DE 2757157, US 3,704,253 i Takikawa i sur., Res. Steroids 7: pp 292-299, 1977). Također, 7 α ,11 β -disubstituirani estrogeni, poznati su od Tedesca i suradnika (Tedesco i sur., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 7: pp 2919-2924, 1997), međutim, unapređenja su i dalje moguća u ovom području. Otkriće podtipova estrogenih receptora, - α (ER α) i β (ER β) podtipovi takvih receptora, omogućava selektivniju aktivaciju pojedinog od ta dva podtipa, imamentno rezultirajući u učinkovitijem tretmanu ili pak tretmanu s manje nuspojava. Gonzales i suradnici opisali su 16 β -metilestrogene (Steroids 40: 171-187, 1982), ali spojevi s 16 β -konfiguracijom općenito nemaju poželjan selektivni učinak kakav ima spoj iz ovog izuma.

Predmetni izum osniva se na otkriću spojeva koji su neočekivano selektivni za estrogeni receptor podtipa α . Ovaj izum omogućava dostupnost 16 α -supstituiranom steroidnog spoja prikazanog formulom 1,



Formula 1

u kojem je:

istočani prsten (nazvan prstenom A) potpuno zasićen, potpuno aromatski ili zasićen prsten s Δ^5 -10 dvostrukom vezom;

R¹ (C₁-C₄)alkil ili (C₂-C₃)alkenil, i svaka od tih grupa može biti supstituirana s jednim ili više halogena;

R² (C₁-C₄)alkil, (C₂-C₄)alkenil ili metilen, i svaka od tih grupa može biti supstituirana s jednim ili više halogena;

R³ je metil ili etil.

Veze na pozicijama 3 i 7, za koje stereokemija u formuli 1 nije specificirana, mogu neovisno biti ili u α ili u β položaju u odnosu na steroidni kostur. Očigledno, kad je R² metilen za vezu na položaju 11 nije predviđeno da bude u β konfiguraciji.

Halogen kojem se daje prednost u R² je klor ili fluor.

Za R² prednost se daje (C₁-C₂)alkilu ili vinilu.

Naravno, izum predlaže i predlijekove sastavljene od prethodno definiranih spojeva.

Predlijek se definira kao spoj koji se u tijelu primaoca pretvara u spoj definiran formulom 1. Hidroksi grupe, kao što je označeno u gore navedenim formulama, mogu se primjerice zamijeniti s alkil*oksi, alkenil*oksi, acil*oksi, aroiloksi, alk*okikarboniloksi, sulfonilnim grupama ili fosfatnim grupama, s time da duljina ugljikovog lanca označena asteriskom(*) ne mora biti striktno ograničena, dok aroil općenito, sadrži fenil, piridinil ili pirimidil. Daje se prednost esterima karboksilne kiseline ili esterima alkiliranom na obje hidroksilne grupe, a još prihvatljiviji predlijekovi su (C₂-C₆) esteri karboksilne kiseline kao što su esteri (iso)butanske kiseline ili (C₁-C₄) alkilni esteri. Duljina alkila, alkenila ili acilnih grupa određuje se ovisno o željenim svojstvima predlijeka s time da su predlijekovi s duljim lancima, kao što su npr. laurilni ili kaproilni lanci, pogodniji za pripravke s odgođenim otpuštanjem ili depo-pripravke. Poznato je da takvi supstituenti na kosturu spoja spontano hidroliziraju ili bivaju enzimatski hidrolizirani na slobodne hidroksilne supstituente. Takvi predlijekovi imat će biološku aktivnost usporedivu sa spojevima u koje se pretvaraju u tijelu primatelja. Aktivna supstanca u koju se pretvara predlijek zovemo roditeljskim spojem. Kod ostalih tipova predlijekova hidroksilne grupe iz formule 1 trebale bi biti aktivirane uz pomoć metaboličkog sustava primatelja. Hidroksilne grupe

neophodne su za afinitet za estrogene receptore. Nadalje, spojevi definirani formulom 1, ali bez jedne ili obje hidroksilne grupe također se ubrajaju u ovaj izum i ti se spojevi isto smatraju predlijekovima.

Ostali termini koji se koriste u ovom opisu imaju sljedeća značenja:

- 5 alkil je razgranata ili nerazgranata alkilna grupa npr. metil, etil, propil, butil ili sek-butil;
- alkenil je razgranata ili nerazgranata alkenilna grupa, kao etenil, 2-butil i slično;
- halogeni su fluor, klor, brom i jod;
- aroil je arilkarbonil kao što benzojeva grupa;
- aril je mono- ili policiklički, homo- ili heterociklički aromatski prsten;
- 10 acil je alkilkarbonilna grupa;

Prefiksi (C_1 - C_4), (C_2 - C_4) i slični imaju uobičajeno značenje da ograniče značenje navedene grupe na one od 1-4, odnosno 2-4 atoma ugljika.

- 15 Selektivni afinitetni profil estrogenskog receptora spoja, prema predmetnom izumu, čini ih podobnima za upotrebu u liječenju. Spojevi bi se upotrebljavali kao poboljšani estrogenu u smislu da se mogu koristiti u medicinskim tretmanima koji se tiču estrogenskih receptora slični onima što se upotrebljavaju za sprječavanje začeca ili u sprječavanju benigne hipertrofije prostate, bolesti krvotoknog sustava, nuspajava u menopauzi, osteoporozi, kontroli tumora koja ovisi o estrogenima te bolestima središnjeg živčanog sustava kao što je to depresija ili Alzheimerova bolest.

- 20 Zbog toga, izum se odnosi na korištenje spoja za pripravljanje lijeka za selektivni tretman koji se tiče estrogenskih receptora. Selektivni tretman putem estrogenskih receptora postiže se aktivacijom α -podtipa estrogenskog receptora. Takav lijek može se koristiti za liječenje poremećaja vezanih uz estrogene receptore peri- i postmenopauzalne poteškoće kao i u svrhu hormonske nadomjesne terapije. Liječenje se sastoji u davanju spoja u skladu s predmetnim izumom
- 25 organizmu koji posjeduje receptore oba podtipa. Izum se, također, odnosi na metodu liječenja za koje je potrebna selektivna aktivacija estrogenskih receptora α -podtipa a odnosi se davanje spoja, prema predmetnom izumu, primatelju u odgovarajućoj količini. Takva metoda liječenja prikladna je za indikacije kao što su problemi vezani za pre- i postmenopauzu (klimakterij) kao i poteškoće vezane uz osteoporozu, tj. radi se o metodi liječenja iz područja hormonske nadomjesne terapije.

- 30 Primatelj selektivnog tretmana estrogenima može biti organizam (životinja ili čovjek), a najčešće je to ženka ili žena kojoj je potreban tretman estrogenima.

- 35 Doziranje spoja, prema izumu, bit će uvelike potpomognuto proizvodnjom farmaceutskih pripravaka. Predmetni izum odnosi se, zbog toga, i na farmaceutski pripravak koji sastoji od izumom opisanog spoja koji je pomiješan s farmaceutski podobnim pomoćnim tvarima.

- 40 U svom posebnom dijelu izum se odnosi na upotrebu spoja opisanog izumom za proizvodnju lijeka koji djeluje u smislu sprečavanja začeca. Izum se također odnosi i na medicinski indicirano sprečavanje začeca, tj. metodu za sprečavanje začeca koja se sastoji od davanja spoja opisanog izumom u odgovarajućoj količini za primatelja (ženu ili ženku), progesterona i estrogenu, kako je uobičajeno u praksi, gdje je estrogenu komponenta prethodno opisani spoj u farmaceutski prihvatljivoj dozi.

- 45 Spojevi opisani izumom mogu se proizvesti uz pomoć različitih metoda općenito poznatih u organskoj kemiji steroida. Uvođenje 16α metilnih ili etilnih grupa u steroide može se jednostavno načiniti uz pomoć metoda koje se mogu naći u literaturi iz područja organske sinteze. Općenito, na položaju C-16 može se formirati anion tretiranjem C-17-ketona potrebnim bazama kao što su alkali metalnih soli organskih sekundarnih amina. (diizopropilamin ili heksametilidisilazan). Tretiranje tih aniona alkilirajućim agensima kao što sualkilhalidi dovodi do željenih 16α -alkiliranih steroida. Moguće su i druge metode alkilacije, primjerice, pretvorba C17-karbonil steroida u
- 50 odgovarajući hidrazon iza čega slijedi formiranje C16-aniona, alkiliranje te oslobađanje karbonila cijepanjem hidrazona. Alternativno, anion na položaju 16 formira konjugiranom redukcijom $\Delta^{15-en-17}$ steroida s alkalijским metalima. Točnije, mogu se koristiti putovi sinteze kako je prikazano na shemama i opisano u primjerima.

- 55 Esterski predlijekovi mogu se načiniti esterifikacijom spojeva uz pomoć slobodnih hidroksilnih grupa u reakciji s odgovarajućim acil-kloridima u piridinu.

- 60 Metode preparacije farmaceutskog pripravka opisali su Gennaro i suradnici (Gennaro et al., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 th ed., Mack publishing Company, 1990, vidjeti Part 8: Pharmaceutical Preparations and Their Manufacture) a pomoćne tvari dostupne su u e.g. Handbook of Pharmaceutical Excipients, (2nd ed., Editors A. Wade and P. J. Weller; American Pharmaceutical Association, Washington, The Pharmaceutical Press, London 1994). Mješavina spoja prema predmetnom izumu i farmaceutski podobnih pomoćnih tvari može se prešati u krutu jediničnu dozu kao što je to pilula, tableta ili pak prirediti za kapsulu ili supozitorij. Uz pomoć farmaceutski prihvatljive tekućine,

spojevi se mogu davati i u obliku injekcije u obliku otopine, suspenzije, emulzije, u obliku spreja npr. spreja za nos. Za proizvodnju jediničnih doza, kao što su to tablete mogu se upotrebljavati standardni dodaci kao što su to punila, tvari za bojenje, polimerne tvari za vezanje i slični. Općenito, mogu se koristiti bilo koji farmaceutski dodaci koji ne ometaju funkciju aktivne tvari. Spojevi opisani izumom mogu biti uključeni u implantat, vaginalni prsten, flaster, gel ili bilo koji drugi pripravak za odgođeno otpuštanje.

Odgovarajući nosači uz koje se pripravak može davati uključuju laktozu, škrob, derivate celuloze i slično, ili mješavine navedenih tvari u prihvatljivim omjerima.

Metoda liječenja prema ovom izumu odnosi se na davanje prije opisanog spoja životinji ili čovjeku u farmaceutski prihvatljivoj dozi. Prihvatljiva jedinična doza opisanog spoja uobičajena je kao i kod drugih estrogenskih spojeva reda veličine od 0,01 do 100 mg.

Izum je nadalje ilustriran u daljnjem tekstu uz primjere na koje se ne ograničava te uz pomoć prikazanih formula.

PRIMJERI

Brojevi spojeva odnose se na strukturne formule na shemama 1 i 2.

Svi NMR spektri snimljeni su kao otopine u CDCl_3 na spektrofotometru od 400 MHz.

Spoj 2

Otopina od 13 ml tert.butildimetilsilil-klorida u 20 ml dietiletera dodaje se u kapljicama u mješavinu od 15 g 11β -metildienolona 1 i 14 g imidazola u 150 ml DMF pri 0°C . Nakon miješanja (dva sata) reakcija je završena. Dodaje se voda i produkt se ekstrahira s etil-acetatom. Tako dobiveni materijal se pročišćava propuštanjem kroz kratku silikonsku kolonu da bi se dobilo 17 g spoja 2; R_f 0,56 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 1,1 (d, 3, 11β CH_3), 0,91 (s, 3, 18-CH_3), 3,55 (m, 1, $17\alpha\text{H}$), 5,80 (m, 1, H4), 6,21 (s, 2, H6, H7)

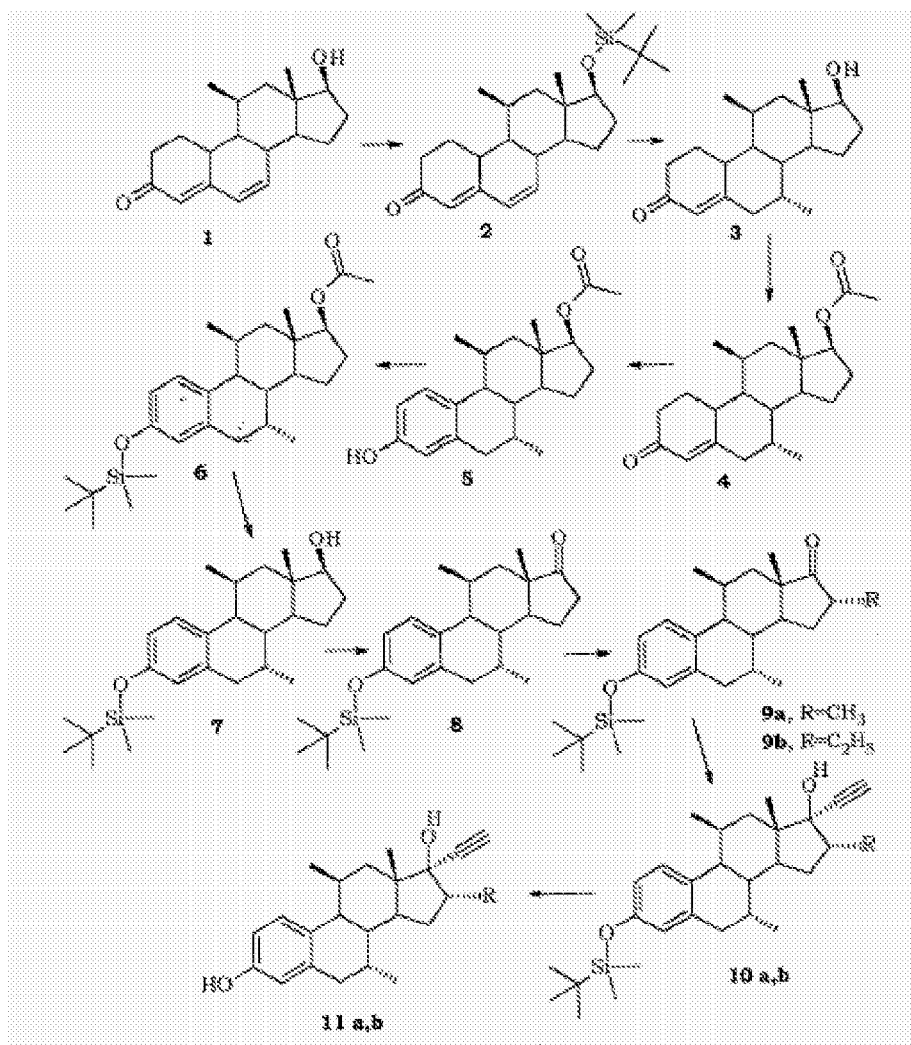
Spoj 3

U otopinu od 20,5 g steroida 2 i 2 g bakrenog acetata u 500 ml suhog THF dodaje se u kapljicama na -30°C 40 ml 22% otopine metilmagnezij-klorida u THF u periodu od 45 minuta. Reakcijska smjesa naknadno se miješa dodatnih 30 minuta te se dodaje u otopinu koja se sastoji od 30 ml koncentrirane sulfatne kiseline i 100 ml vode. Smjesa se miješa daljnjih 16 sati, a nakon toga se u nju dodaje 19 g NaOAc, a produkt se ekstrahira etil-acetatom. 7α -izomer pročišćava se na kromatografskoj silikonskoj koloni da bi se dobilo 8,5 g čistog spoja 3, R_f 0,45 (heptan/etil-acetat 1/1), 7β -izomer pri R_f 0,42; NMR δ 1,07 (d, 3, 11β CH_3), 0,88 (s, 3, 18-CH_3), 0,78 (d, 3, $7\alpha\text{-CH}_3$),

Spoj 4

Smjesa koja sadrži 5,5 g spoja 3, 15 ml piridina, 4,7 ml acetat-anhidrida i 40 mg DMAP miješa se na sobnoj temperaturi jedan sat. Tada se dodaje voda, a produkt ekstrahira s etil-acetatom. Organski sloj ispire se 2N HCl da bi se uklonio piridin, a nakon toga vodom. Ostatak nakon sušenja i koncentriranja upotrebljava se kao i u slijedećem koraku. R_f 0,59 (heptan/etil-acetat 1/1), NMR: δ 1,06 (d, 3, $11\beta\text{-CH}_3$), 0,92 (s, 3, 18-CH_3), 0,78 (d, 3, $7\alpha\text{-CH}_3$), 2,04 (s, 3, acetat), 4,56 (dd, 1, H17 α) 5,84 (široki s, 1, H4)

SHEMA 1



Svi NMR spektri snimljeni su kao otopine u CDCl_3 na spektrofotometru od 400 MHz.

Spoj **5**

U otopinu od 6,2 g spoja **4** u 180 ml suhog acetonitrila dodaje se 1,6 g LiBr, a nakon toga 8 g, CuBr_2 . Nakon miješanja od 2 sata aromatizacijska reakcija je završena. Otopina se razrjeđuje s 400 ml vode i ekstrahira s etil-acetatom. Organski sloj se ispire vodom i 5% vodenim NaHCO_3 , suši i koncentrira. Kromatografsko pročišćavanje osiguralo je 4,2 g spoja **5**, R_f 0,67 (heptan/etil-acetat 1/1), NMR: δ 0,84 (d, 3, $11\beta\text{-CH}_3$), 0,93 (s, 3, 18-CH_3), 0,81 (d, 3, $7\alpha\text{-CH}_3$), 2,05 (s, 3, acetat), 4,64 (dd, 1, $\text{H}17\alpha$) 6,52 (d, 1, H4), 6,62 (AB, 1, H2), 7,03 (AB, 1, H1).

Spoj **6**

U otopinu koja sadrži 4,2 g spoja **5** u 20 ml DMF dodaje se pri 0°C 1,7 g imidazola, a zatim 2,2 g TBDMS-Cl. Miješa se na sobnoj temperaturi nekoliko sati i nakon završetka sililacije izlijeva se u 150 ml vode. Produkt se ekstrahira etil-acetatom. Tako dobiveni produkt propušta se kroz kratku silikonsku kolonu, pri čemu se dobiva 4,5 g spoja **6**, R_f 0,77 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,84 (d, 3, $11\beta\text{-CH}_3$), 0,94 (s, 3, 18-CH_3), 0,80 (d, 3, $7\alpha\text{-CH}_3$), 0,98 (s, 9, tert. $\text{C}_4\text{H}_9\text{Si}$), 0,18 (s, 6, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$), 2,06 (s, 3, acetat), 4,64 (dd, 1, $\text{H}17\alpha$) 6,49 (d, 1, H4), 6,59 (AB, 1, H2), 7,00 (AB, 1, H1),

Spoj **7**

Otopina koja se sastoji od 5,4 g spoja **6** i 10 ml THF dodaje se u kapljicama u suspenziju od 400 mg LiAlH_4 i 20 ml THF koja uz stalno miješanje. Nakon 15 minuta miješanja redukcija je završena, a mješavina se tretira prvo s 1,1 ml zasićene otopine Na_2SO_4 , a tada s 8 g Na_2SO_4 iza kojeg slijedi filtracija na Celitu i koncentriranje kojim se dobije 4,5 g

spoja **7**, R_f 0,5 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,85 (d, 3, 11β -CH₃), 0,90 (s, 3, 18-CH₃), 0,80 (d, 3, 7α -CH₃), 0,97 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,18 (s, 6, Si(CH₃)₂), 3,70 (dd, 1, H17 α).

Spoj **8**

U otopinu koja sadrži 4,5 g spoja **7** i 3,4 g NMO u 50 ml acetona dodaje se 100 mg TPAP. Nakon 60 minuta miješanja završena je oksidacija. U reakcijsku smjesu dodaje se 5 g silikonskog gela, a nakon toga 90 ml heptana. Miješa se 15 minuta, a nakon toga slijedi filtriranje na Celitu. Filtrat se koncentrira i propušta kroz kratku silikonsku kolonu čime se dobije 3,7 g spoja **8**, R_f 0,66 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,86 (2xd, 6, $7\alpha+11\beta$ -CH₃), 1,01 (s, 3, 18-CH₃), 0,98 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,19 (s, 6, Si(CH₃)₂), 6,53 (d, 1, H4), 6,62 (AB, 1, H2), 7,01 (AB, 1, H1).

Spoj **9a**

U otopinu koja sadrži 1 g steroida **8** i 0,64 ml DMPU u 20 ml suhog THF u kapljicama pri -45°C dodaje se otopina koja sadrži 2,66 ml 1M LiHMDS u 10 ml THF. Nakon miješanja dodatnih pola sata pri temperaturi od -45°C dodaje se 0,2ml metil-jodida te dalje miješa pri -20°C dok ne završi alkilacija (oko pola sata). Tada se dodaje 200 ml 10% vodenog amonij-klorida, a produkt se ekstrahira etil-acetatom. Daljnjim pročišćavanjem materijala uz pomoć kromatografije dobije se 0,88 g 16 α alkilirane tvari **9a**, R_f 0,70 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,86 (2xd, 6, $7\alpha+11\beta$ -CH₃), 1,05 (s, 3, 18-CH₃), 0,97 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,19 (s, 6, Si(CH₃)₂), 1,14 (d, 3, 16 α CH₃), 6,53 (d, 1, H4), 6,62 (AB, 1, H2), 7,01 (AB, 1, H1).

Spoj **9b**

Pripravlja se isto kao i **9a** s time da se za alkilaciju koristi 0,25 ml etil-jodida. Reakcija se miješa nekoliko sati pri sobnoj temperaturi. Nakon kromatografije dobije se 0,84 g **9b**, R_f 0,75 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,86 (2xd, 6, $7\alpha+11\beta$ -CH₃), 1,05 (s, 3, 19-CH₃), 0,97 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,96 (t, 3, 16 α CH₃CH₂-), 0,19 (s, 6, Si(CH₃)₂), 6,53 (d, 1, H4), 6,62 (AB, 1, H2), 7,01 (AB, 1, H1).

Spoj **10a**

Otopina Li-acetilida priprema se dodavanjem 10,3 ml 1,6 M BuLi/hexana u kapljicama u otopinu koja se sastoji od 0,67 ml 1,2-dibromoetena u 20 ml suhog THF na -60°C. Nakon 30 minuta miješanja u reakcijsku smjesu dodaje se 0,88 g spoja **9a** u 5 ml THF, a smjesa se postepeno zagrijava na sobnu temperaturu. Nakon miješanja od jednog sata reakcija je završena, a smjesa se izlijeva u 10% vodenu otopinu amonij-klorida. Produkt se ekstrahira etil-acetatom i pročišćava kromatografski da bi se dobilo 790 mg spoja **10a**, R_f 0,23 (heptan/etil-acetat 9/1), NMR δ 0,80 (d, 3, 7α CH₃), 0,87 (d, 3, 11β -CH₃), 1,05 (s, 3, 19-CH₃), 0,97 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,19 (s, 6, Si(CH₃)₂), 1,20 (d, 3, 16 α CH₃), 2,68 (s, 1, acetilen).

Spoj **10b**

Reakcija se odvija na isti način kako je opisano za **10a**, koristeći 0,84 g spoja **9a**, da bi se dobilo 710 mg spoja **10b**, R_f 0,24 (heptan/etil-acetat 9/1), NMR δ 0,79 (d, 3, 7α -CH₃), 0,88 (d, 3, 11β -CH₃), 0,98 (t, 3, 16 α CH₃CH₂-), 0,96 (s, 9, tert.C₄H₉Si), 0,19 (s, 6, Si(CH₃)₂), 2,65 (s, 1, acetilen).

Spoj **11a**

U otopinu koja sadrži 790 mg spoja **10a** u 1 ml THF dodaje se 2,5 ml 1 M TBAF u THF. Nakon miješanja od 10 minuta završena je deprotekcija. Dodaje se voda, a produkt se ekstrahira etilacetatom te pročišćava propuštanjem kroz silikonsku podlogu. Tako dobiveni materijal miješa se s heptan-diizopropil eterom (1/1) da bi se dobilo 480 mg u suštini čistog spoj **11a** R_f 0,31 (heptan/etil-acetat 7/3), Mp 204-205°C NMR δ 0,81(d, 3, 7α CH₃), 0,88(d, 3, 11β -CH₃), 1,05(s, 3, 18-CH₃), 1,20 (d, 3, 16 α CH₃), 2,69 (s, 1, acetilen)

Spoj **11b**

Spoj **11b** priprema se slično kao i **11a** upotrebom 710 mg spoja **10b**. Taloženje krajnjeg produkta iz mješavine etanola i vode dobije se 430 mg u biti čistog **11b**, R_f 0,30 (heptan/etil-acetat 7/3), NMR δ 0,80 (d, 3, 7α CH₃), 0,88 (d, 3, 11β CH₃), 1,00 (t, 3, 16 α CH₃CH₂-), 1,06 (s, 3, 18-CH₃), 2,65 (s, 1, acetilen).

PRIMJER 2

Sinteza spoja (3 α , 11 β , 16 α , 17 β)-16-metil-11-(2 propenil)-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3,17-diol (spoj **27**) opisana je shemom 2.

5

Spoj 13

U otopinu koja sadrži 17,3 g CuI i 3,84 g LiCl u 250 ml u suhog THF dodaje se, pri -70°C 90,6 ml 1 M otopine alil-magnezij bromida u dietil-eteru. Nakon miješanja od 20 minuta dodaje se 11,4 ml trimetilklorosilana, a nakon toga 7,5 g steroida **12** otopljenog u 100 ml THF. Reakcijska smjesa drži se cijelo vrijeme ispod -60°C. Nakon miješanja tijekom jednog sata reakcija se zaustavlja lijevanjem u zasićenu vodenu otopinu amonij-klorida. Produkt se ekstrahira etil-acetatom i pročišćava na kromatografskoj koloni da bi se dobilo 6,25 g spoja **13** u obliku bezbojnog ulja. NMR 5,20 (m, CH alil); 5,0 (CH₂, alil); 3,04 (m, H11).

10

Spoj 14

U otopinu koja sadrži 9,6 g spoja **13** u mješavini od 100 ml metanola i 30 ml metilen-klorida u kojoj se nalazi i 800 mg NaOH, dodaje se 0,4 g natrij-borohidrida na temperaturi od 0-5°C. Nakon miješanja od jednog i pol sata reakcija je završena, a smjesa se tretira pola sata s 20 ml acetona. Reakcija se, nakon toga, izlije u vodu i ekstrahira etil-acetatom da bi se dobilo 9,5 g spoja **14**. NMR 3,59 (t, CHOH); 2,98 (m, H11), 0,92 (s, CH₃).

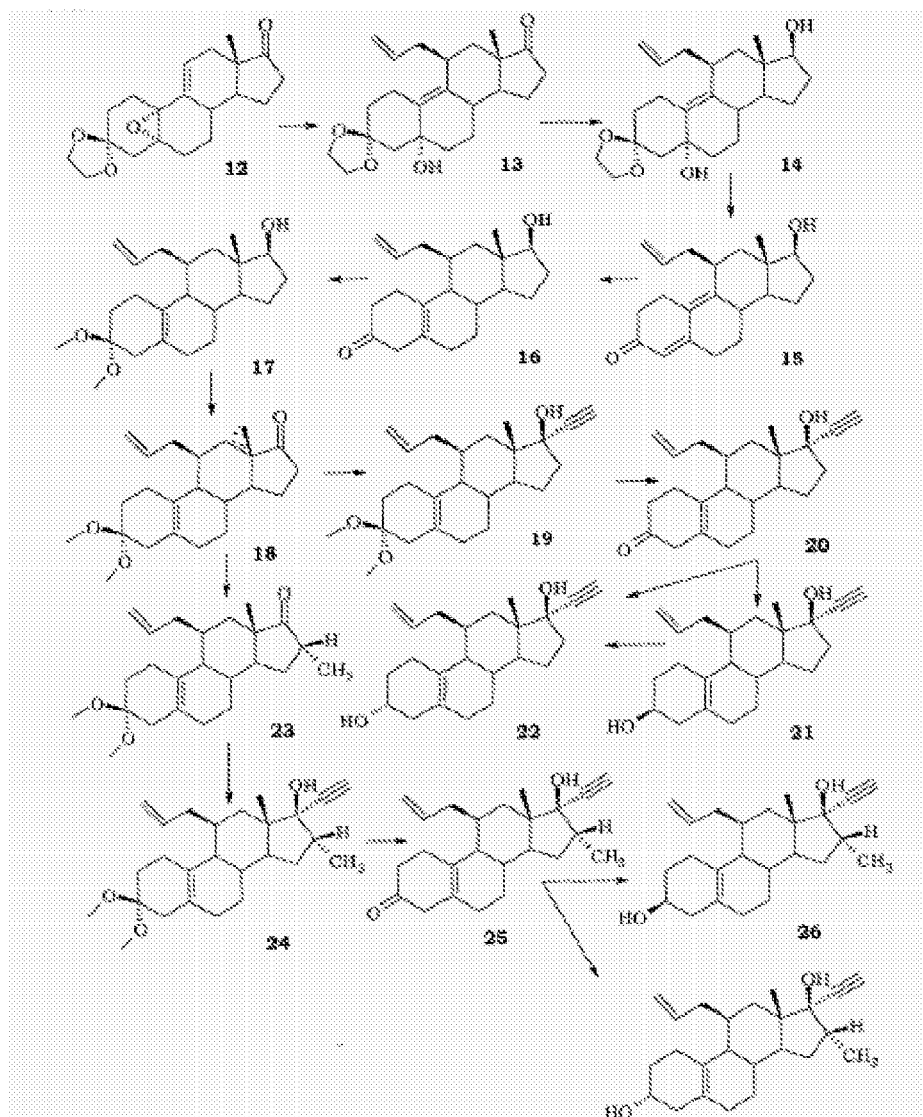
20

Spoj 15

U otopinu koja sadrži 9,5 g spoja **14** u 100 ml acetona dodaje se 8 ml 6 N HCl i miješa 2 sata. Otopina se neutralizira s NaHCO₃ i koncentrira u mali volumen, razrijedi vodom i ekstrahira etil-acetatom. Tako se dobilo 8,2 g spoja **15** u obliku bezbojne amorfnе tvari. NMR 5,68 (m, H4); 3,10 (m, H11); 3,65 (m, CHOH).

25

SHEMA 2

5 Spoj **16**

U 500 ml tekućeg amonijaka na -70°C dodaje se otopina koja sadrži 8,2 g spoja **15** u 100 ml suhog THF. Ova mješavina tretira se s određenom količinom litija (oko 500 mg) dok plava boja koja nastaje reakcijom ne traje barem 15 minuta. Reakcija se zaustavlja dodatkom određene količine amonij-klorida. Ostatak nakon evaporacije amonijaka razrjeđuje se u vodi i ekstrahira etil-acetatom. Kromatografskim pročišćavanjem dobiva se 4,0 g spoja **16** u obliku bezbojnog spoja; R_f 0,55 (heptan/etilacetat 1/1 v/v).
NMR 2,80 (ab, CH_2 pri C4); 0,93 (s, CH_3).

15 Spoj **17**

U otopinu koja sadrži 4,0 g spoja **16** u 80 ml metanola dodaje se 6 ml trimetilortoformata, a zatim 0,8 g toluensulfonske kiseline. Nakon miješanja od 2 sata završena je ketalizacija. Mješavina se tretira piridinom i ukoncentrira na mali volumen. Ostatak se otopi u vodi i ekstrahira etil-acetatom. Ostatak od 4,7 g smatra se gotovo čistim spojem **17**; tcl, R_f 0,78 (heptan/etilacetat 1/1 v/v).
NMR 3,22, 3,25 (2x s, OCH_3).

20 Spoj **18**

U otopinu koja sadrži 33 g spoja **17** u 50 ml acetona dodaje se 6 g molekularnog sita (4A), a potom 3,2 g N-metilmorfolin-N-oksida i 150 mg tetrapropilamonij-perutenata. Smjesa se miješa 1 sat. U reakcijsku smjesu dodaje se 5 g silikonskog gela, a potom 50 ml heptana te se miješa, dodatno, 5 minuta. Mješavina se filtrira kroz uz visoki protok,

a nakon djelomičnog koncentriranja ekstrahira se etil-acetatom, ispere vodom i koncentrira. Ostatak se propusti kroz kratku silikonsku kolonu čime se dobije 2,9 g spoja **18**. R_f 0,52 (heptan/etil-acetat 7/3). NMR 1,02 (s, CH_3).

Spoj **19**

Za potrebe etinilacije litij-acetilid priprema se od dibromoetana i butilitiuma.

U otopinu koja se sastoji od 0,74 ml 1,2-dibromoetana u 20 ml THF dodaje se 1,6 M otopina BuLi u heksanu pri -70°C . Nakon miješanja od 15 minuta u tu se otopinu dodaje otopina koja sadrži 800 mg spoja **18** i 2 ml THF. Smjesa nakon 15 minuta poprima sobnu temperaturu, te se nakon dodatnih 15 minuta reakcija zaustavlja uz dodatak vode, a produkt se ekstrahira etil-acetatom. Nakon koncentriranja produkt se propusti kroz kratku kolonu od silikonskog gela čime se dobije 810 mg spoja **19** u obliku bijele amorfnе tvari. R_f 0,48 (heptan/etil-acetat 7/3). R_f početnog materijala 0,52. NMR 2,61 (s, acetilen).

Spoj **20**

U suspenziju koja se sastoji od 3,2 g spoja **19** u 60 ml etanola dodaje se 0,16 g oksalne kiseline u 6 ml vode. Smjesa se miješa dva i pol sata te polako postaje homogena. Reakcijska smjesa tretira se NaHCO_3 i ukoncentrira u manji volumen. Dodaje se voda, a produkt se ekstrahira etil-acetatom. Tako izoliran, nepročišćen produkt propušta se kroz kratku kolonu od silikonskog gela i kristalizira iz diizopropiletera čime se dobije 2,3 g spoja **20**, Mp 136°C . R_f 0,66 (heptan/etil-acetat 1/1). NMR 2,78 (ab, 2, H4); 2,61 (s, acetilen).

Spojevi **21** i **22**

U otopinu koja sadrži 1 g spoja **20** u 12 ml THF dodaje se 1,6 g litij-3-t-butoksi-aluminijhidrida. Nakon miješanja od jednog sata pri sobnoj temperaturi smjesa se tretira vodom i neutralizira 2N HCl. Produkt se ekstrahira etil-acetatom i propušta kroz kromatografsku kolonu od silikonskog gela (heptan/etil-acetat 8/2 kao eluens). Time se dobiva 0,56 g 3β alkohol **21** (Mp $121-123^\circ\text{C}$) i 0,24 g 3α alkohola **22** (Mp $84-87^\circ\text{C}$). R_f 0,53 (**21**) i 0,45 (**22**) (heptan/etil-acetat 1/1). NMR ($3\alpha\text{OH}$) 3,82 (m, CHOH); ($3\beta\text{OH}$) 4,08 (m, CHOH).

Spoj **23**

U otopinu litij-heksametilidisilazida (pripremljenog od 1,9 ml 1,6 M BuLi-heksana i 0,71 ml heksametildisilazana u 4 ml suhog THF) dodaje se 1 g spoja **18** i 0,7 ml DMPU u 5 ml THF pri -40°C . Smjesa se miješa pola sata pri -40°C , a nakon toga se dodaje 225 $\text{Cl CH}_3\text{I}$ uz pomoć injekcijske igle. Nakon daljnjih pola sata miješanja na -40°C reakcija je završena. Smjesa se razrjeđuje u vodi i ekstrahira etil-acetatom. Kromatografijom nečistog produkta proizvode se 1,3 g spoja **23**. R_f 0,43 (heptan/etil-acetat 8/2). NMR 1,10 (d, 3, $16\alpha\text{CH}_3$), 1,06 (s, 3, CH_3), 3,23 (2x s, 6, OCH_3), 5,0 (m, 2, alil CH_2), 5,78 (m, 1, alil CH).

Spoj **24**

Kako je to opisano u postupku dobivanja spoja **19**, 1,3 g spoja **23** pretvara se u spoj **24**, da bi se dobilo 1,2 g. R_f 0,46 (heptan/etil-acetat 7/3), R_f (23) 0,55. NMR 2,66 (s, 1, acetilen), 1,06 (s, 3, CH_3), 1,17 (d, 3, $16\alpha\text{CH}_3$).

Spoj **25**

U otopinu koja se sastoji od 800 mg spoja **24** u 20 ml etanola dodaje se otopina koja sadrži 80 mg oksalne kiseline otoplјene u 5 ml vode. Smjesa se miješa jedan sat, a nakon toga neutralizira dodatkom NaHCO_3 . Nakon razrjeđivanja vodom i ekstrakcije etil-acetatom preostalo je 0,7 g spoja **25** u kristalnoj formi. R_f 0,47 (heptan/etil-acetat 7/3). NMR 2,78 (AB, 2, H4), 1,08 (s, 3, CH_3), 1,18 (d, 3, $16\alpha\text{CH}_3$), 2,67 (s, 1, acetilen).

Spojevi **26**, **27**

U otopinu koja sadrži 725 mg spoja **25** u 20 ml mješavine etanola i THF u omjeru 1/1 dodaje se 130 mg natrijborhidrida. Nakon miješanja od jednog sata 2 ml dodaje se 2 ml acetona da bi se uništio višak reagensa. Nakon 15 smjesa se prelijeva u vodu, a produkt ekstrahira etil-acetatom. Tako dobiven matrijal pročišćava se kromatografski na silikonskom gelu, koristeći kao eluense metilenklorid-aceton ili heksan-etil-acetat. Tako se dobije 300 mg spoja **27** ($3\alpha\text{-OH}$) i 75 mg spoja **26** ($3\beta\text{-OH}$). R_f (**26**) 0,47 (metilenklorid/aceton 95/5). R_f (**27**) 0,54 (metilenklorid/aceton 95/5). NMR (**27**) 3,82(m, 1, $3\beta\text{H}$), 2,75 (s, 1, acetilen), 1,06 (s, 3, CH_3), 1,17 (d, 3, $16\alpha\text{CH}_3$); (**26**) 4,07 (m, 1, $3\beta\text{H}$), 2,76 (s, 1, acetilen), 5,01 (m, 2, CH_2 alil), 5,78 (m, 1, CH-alil).

PRIMJER 3

Spojivi su testirani pokusima vezivanja i pokusima transaktivacije na sposobnost vezanja za estrogene receptore.

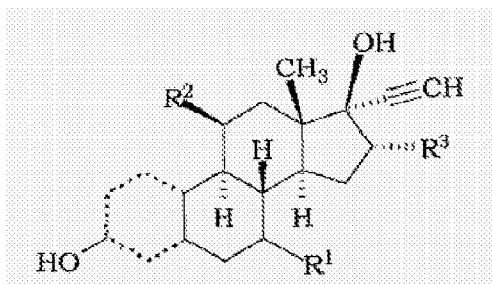
- 5 Određivanje kompetitivnog vezanja za citoplazmatske estrogenske receptore α i β iz rekombinantnih CHO (Chinese hamster ovary cells, stanice jajnika kineskog hrčka) stanica upotrebljen je da bi se procijenio relativan afinitet (omjer jačine) probnog spoja u usporedbi s estradiolom (E_2) za navedeni estrogenski receptor. CHO stanice stabilno su transfecirane ljudskim estrogenskim receptorom α (hER α) ili β (hER β).
- 10 Estrogenska i antiestrogenska aktivnost spojeva određena je u *in vitro* pokusu s rekombinantnim stanicama jajnika kineskog hrčka (CHO) koje su stabilno kotransfecirane ljudskim estrogenskim receptorom α ili β , promotorom za oksitocin u štakora i reporterskim genom za luciferazu. Estrogenska aktivnost (omjer jačine) probnog spoja da stimulira transaktivaciju enzima luciferaze preko estrogenskih receptora hER α i hER β u usporedbi s standardnim estrogenom estradiolom. Antiestrogenska aktivnost (omjer jačine) probnog spoja da inhibira transaktivaciju enzima luciferaze preko estrogenskih receptora hER α i hER β uz pomoć estrogena estradiola uspoređuje se sa standardom ICI 164,384 (= (7 α ,17 β)-N-butil-3,17-dihidroksi-N-metilestra-1,3,5(10)-trien-7-undekanamid).

REZULTATI

- 20 Kvantativni parametar za selektivnost agonista dobiva se dijeljenjem aktivnosti agonista za ER α u postotku i ER β u postotku. Spoj **11a** selektivni je agonist za receptor α u odnosu na receptor β više od 86 puta. Spoj 26 selektivni je agonist za ER α u odnosu na ER β za faktor 59. Spoj 27 ima selektivnost agonista 88,3 puta.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. 16 α -supstituirani steroidni spoj koji ima formulu 1



formula 1

naznačen time, da je:

istočkani prsten potpuno zasićen, potpuno aromatski ili zasićen prsten s Δ^{5-10} dvostrukom vezom;

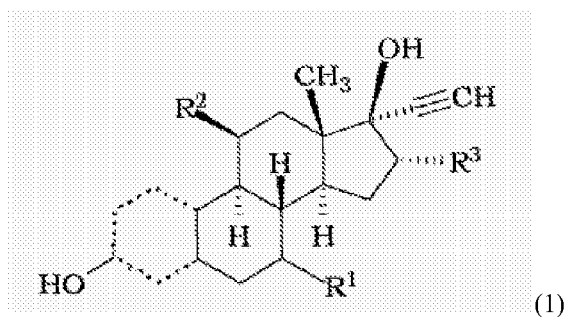
R^1 (C_1 - C_4)alkil ili (C_2 - C_3)alkenil, i svaka od tih grupa može biti supstituirana s jednim ili više halogena;

R^2 (C_1 - C_4)alkil, (C_2 - C_4)alkenil ili metilen, i svaka od tih grupa može biti supstituirana s jednim ili više halogena;

R^3 je metil ili etil.

2. 16 α -supstituirani steroidni spoj prema zahtjevu 1, **naznačen time**, da su halogeni u R^1 i R^2 klor ili fluor.
3. 16 α -supstituirani steroidni spoj prema zahtjevu 1 i 2 **naznačen time**, da je R^2 (C_1 - C_2)alkil ili vinil.
4. Spoj prema zahtjevu 1 **naznačen time**, da se koristi u liječenju.
5. Upotreba spoja prema zahtjevu 4 za pripravljanje lijeka za postupak liječenja putem estrogenih receptora, **naznačena time** da je liječenje selektivni tretman estrogenskog receptora α .
6. Upotreba u skladu s zahtjevom 4 za pripravljanje spoja za tretman putem estrogenih receptora, **naznačena time**, da je liječenje hormonska nadomjesna terapija ili sprječavanje začeća.
7. Postupak liječenja koja se odnosi na selektivnu aktivaciju estrogenskih receptora podtipa α **naznačen time**, da se spoj prema zahtjevu 1 daje u odgovarajućoj koncentraciji.
8. Postupak liječenja za hormonsku nadomjesnu terapiju ili sprječavanje začeća **naznačen time**, da se spoj prema zahtjevu 1 daje u odgovarajućoj koncentraciji.
9. Farmaceutski pripravak **naznačen time**, da se sastoji od spoja prema zahtjevu 1, pomiješanog s farmaceutski prihvatljivim dodacima.

SAŽETAK



- 5 Izum se sastoji od 16α supstituiranog steroidnog spoja prikazanog formulom 1, u kojem istočkani prsten predstavlja potpuno zasićeni, aromatski ili zasićeni prsten s Δ^{5-10} dvostrukom vezom. R^1 je (C_1-C_3) alkil ili (C_2-C_3) alkenil, a svaka od ovih grupa može biti zamijenjena jednim ili više halogenom. R^2 je (C_1-C_4) alkil, (C_2-C_4) alkenil ili metilen i svaka od tih grupa može biti zamijenjena jednim ili više halogenom. R^3 je metil ili etil. Navedeni spoj može se koristiti kao predlijeak u selektivnom liječenju preko estrogenskih receptora α .