



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

258498

(11) (82)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 07 J 1/00

(22) Přihlášeno 09 07 86  
(21) PV 3216-87.V  
(32) (31) (33) Právo přednosti od 09 07 85  
(8517360) Velká Británie

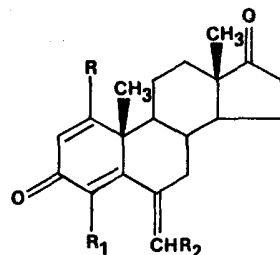
(40) Zveřejněno 17 12 87

(45) Vydáno 14 04 89

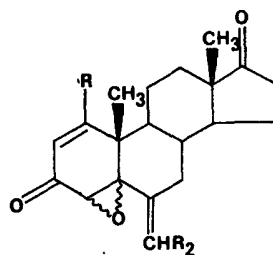
(72) Autor vynálezu BUZZETTI FRANCO, MONZA, BARBUGIAN NATALE, LOMBARDI PAOLO,  
DI SALLE ENRICO, MILAN (Itálie)  
(73) Majitel patentu FARMITALIA CARLO ERBA S.P.A. MILAN (Itálie)

(54) Způsob výroby androsta-1,4-dien-3,17-dionů

Způsob přípravy androsta 1,4-dien-3,17-dionů, obecného vzorce I, kde R a R<sub>2</sub> nezávisle na sobě znamenají vodík nebo alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku a R<sub>1</sub> znamená halogen, se provádí reakcí sloučeniny obecného vzorce II s hydrohalogenačním činidlem. Připravené sloučeniny jsou terapeuticky účinné, zejména při léčení určitých typů rakovin.



(I)



(II)

Vynález se týká způsobu výroby nových androsta-1,4-dien-3,17-dionů. Základní a klinické údaje udávají, že aromatizované metabolity androgenů, to je estrogeny, jsou hormony postižitelné ve změněných patogenních buňkách ve spojitosti s růstem určitých rakovin závislých na hormonech, jako jsou rakovina prsu, endometrické a ovariální karcinomy.

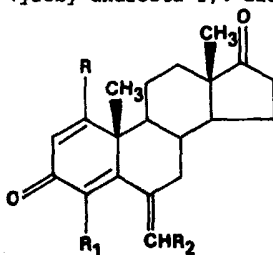
**Estrogeny jsou také zapojeny do patogeneze na začátku prostatické hyperplasie.**

Endogenní estrogeny se konečně také tvoří buď z androstendionu nebo testosteronu jako imediárních prekurzorů. Reakce hlavní důležitosti je aromatizace steroidního kruhu A, která se provádí enzymem aromatázou. Protože aromatizace je zvláštní reakce a poslední v sérii stupňů při biosyntéze estrogenů, počítalo se s tím, že účinná inhibice aromatázy vyplývající ze sloučenin schopných interakce s aromatizačními stupni, se může výhodně aplikovat při kontrole množství cirkulujících estrogenů, procesů závislých na estrogenu v reprodukci a zhubných nádorů závislých na estrogenu.

Známé steroidní sloučeniny, které byly popsány jako látky projevující účinek inhibující aromatázu, jsou například  $\Delta^1$ -testololakton /US patent č. 2 744 120/, 4-hydroxy-androst-4-en-3,17-dion a jeho estery /viz např. US patent č. 4 235 893, 10-/1,2-propadienyl/estr-4-en-3,17-dion /US patent č. 4 289 762/, 10-/2-propinyl/estr-4-en-3,17-dion /J. Am. Chem. Soc., 103, 3 221 /1981/ a US patent č. 4 322 416/, 19-thioandrostenové deriváty /evropská patentová přihláška č. 100 566/, androsta-4,6-dien-3,17-dion, androsta-1,4,6-trien-3,17-dion /britská zveřejněná patentová přihláška č. 2 100 601 A/ a androsta-1,4-dien-3,17-dion /Cancer Res./Suppl./42, 3 327 /1982//.

Nové sloučeniny podle tohoto vynálezu vedle toho, že vykazují silnou inhibici aromatázy in vitro, se projevují lepší účinností in vivo, zřejmou ze schopnosti jejich lepší metabolické stability, v porovnání se sloučeninami podle dosavadního stavu techniky.

Předmětem vynálezu je způsob výroby androsta-1,4-dien-3,17-dionů obecného vzorce I



[1]

kde každý ze substituentů  $R$  a  $R_2$  znamená nezávisle na druhém vodík nebo alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku a  $R_1$  znamená halogen.

Vzorec uvedený výše pro sloučeniny podle vynálezu zahrnuje všechny možné isomery, zvláště isomery E a Z jak samostatně, tak jako směsi sloučenin obecného vzorce I, kde R<sub>2</sub> znamená alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku. Ve vzorcích uvedených v tomto popisu přerušované čáry /~~~~~ / znamenají, že substituenty jsou v alfa-konfiguraci, to jest pod rovinou kruhu, zatímco čáry tvaru trojúhelníku /▲/ znamenají, že substituenty jsou v beta-konfiguraci, to jest nad rovinou kruhu a vlnovky /~~~ / označují, že skupiny mohou být jak v alfa-konfiguraci, tak v beta-konfiguraci.

Alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku je s výhodou alkylová skupina obsahující 1 až 4 atomy uhlíku, zvláště methyl, propyl, ethyl nebo terc.butyl, zvláště výhodně methyl nebo ethyl. Z těchto případů je zřejmé, že alkylová skupina může mít rozvětvený řetězec nebo může jít o skupinu s přímým řetězcem.

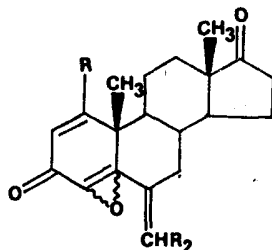
Halogenem je například atom chloru, fluoru nebo bromu, zvláště atom chloru a bromu a obzvláště výhodně atom fluoru.

Výhodné sloučeniny podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I, kde R znamená vodík nebo alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku, R<sub>1</sub> znamená fluor nebo chlor a R<sub>2</sub> znamená vodík nebo alkyl s 1 až 4 atomy uhlíku.

Výhodnější sloučeniny podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I, kde R znamená vodík, methyl nebo ethyl,  $R_1$  znamená fluor nebo chlor a  $R_2$  znamená vodík.

Příklady charakteristických sloučenin podle vynálezu jsou 4-fluor-6-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, 4-chlor-6-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, 4-fluor-1-methyl-6-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion, 4-chlor-1-methyl-6-methyl-androsta-1,4-dien-3,17-dion a 4-fluor-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion.

Sloučeniny podle vynálezu -androsta-1,4-dien-3,17-diony výše uvedeného obecného vzorce I, je možno připravit tak, že se sloučenina obecného vzorce II



(II)

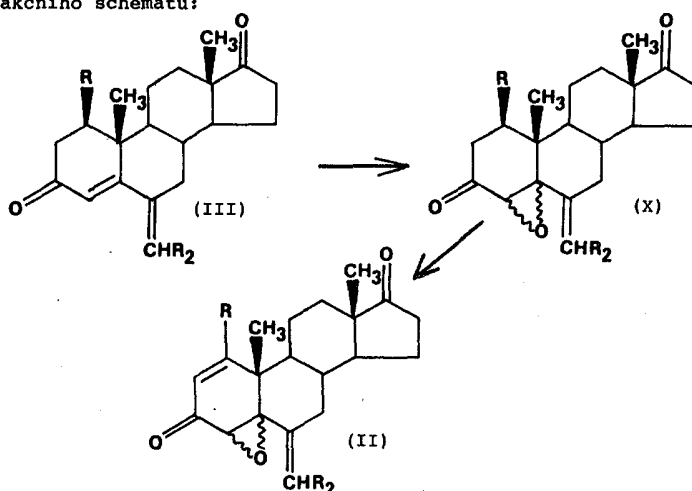
kde R a  $R_2$  mají výše uvedený význam s hydrohalogenačním činidlem a je-li to žádoucí rozdělí se směs isomerů sloučenin obecného vzorce I na jednotlivé isomery.

Hydrohalogenační činidlo, které reaguje se sloučeninou obecného vzorce II je například kyselina halogenovodíková nebo trihalogenboran. Reakce sloučeniny obecného vzorce II s kyselinou halogenovodíkovou nebo trihalogenboranem se může provádět podle známých metod, například podle Camerina a spol., *Il Farmaco* 11, 586 /1956/ a A. Bowerse a spol., *Tetrahedron* 3, 14 /1958/.

Když se jako kyseliny halogenovodíkové použije kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny bromovodíkové, provádí se reakce s výhodou v kyselině octové nebo ethanolu za teploty od asi 0 do 100 °C. Použije-li se trihalogenboranu, například fluoridu boritého, provádí se reakce s výhodou v inertním rozpouštědle jako diethyletheru, benzenu nebo dichlormethanu, za teploty asi od -30 do 50 °C.

Oddělování sloučeniny obecného vzorce I ze směsi isomerů se může provádět podle běžných metod, které jsou známy. Například separace ze směsi geometrických isomerů se může provádět frakční krystalizací nebo dělením sloupcovou chromatografií.

Sloučeniny obecného vzorce II se mohou získat podle známých postupů, například podle následujícího reakčního schématu:



Epoxidace sloučeniny obecného vzorce II, umožňující získat sloučeninu obecného vzorce X, se může provádět působením vhodného oxidačního prostředku, který je s výhodou v koncentrované formě, jako je například 36% peroxid vodíku, v alkoholickém roztoku hydroxidu alkalického kovu, s výhodou v methanolovém roztoku hydroxidu draselného nebo hydroxidu sodného, za teploty od 0 do 25 °C po dobu asi 2 hodin až několika dnů.

Dehydrogenace sloučeniny obecného vzorce X na sloučeninu obecného vzorce II se může provádět působením vhodného dehydrogenačního prostředku, například dichlordikyanbenzochinonu při refluxování rozpouštědla, jak je popsáno výše.

Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu jsou inhibitory biotransformací endogenní androgenů, to jest jsou inhibitory steroidní aromatázy. Proto sloučeniny podle vynálezu mohou být vhodné jako alternativa k endokrinní ablaci, například vynětí vaječníku, podvěsku mozkového nebo k adrenalectomii, při ošetřování pokročilých rakovin závislých na hormonech u prsu, pankreasu, endometrické a ovariální rakoviny.

Inhibitory aromatázy obecného vzorce I nalézají také použití při řízení rozmnožování, protože snížení hladiny estrogenu in vivo způsobuje účinek inhibující činnost pohlavních žláz a nedostatečnost vývoje dělohy; inhibitory aromatázy mohou být současně inhibitory implantace.

Jiná aplikace sloučenin podle vynálezu spočívá v ošetřování hypertrofie nebo hyperplasie prostaty spojené s nadměrnou produkcí estrogenu a s posunem poměru estrogen/androgen k vyšším hodnotám.

Inhibice aromatázy u sloučenin podle vynálezu se může stanovit například jak in vitro /lidská placentální aromatáza/, tak in vivo /ovariální účinek aromatázy/ u krys, následujícími postupy:

#### Inhibice aromatázy in vitro

Z mikrosomní frakce lidské placentální tkáně se standardním postupem izoluje enzymatický systém. Použije se údaj z publikace Thompsona-Siiteria /E. A. Thompson a P. K. Siiteri, J. Biol. Chem. 249, 5 364 /1974//, kde se stanoví rychlost aromatizace měřením uvolňování  $^3\text{H}_2\text{O}$  z /4-/1-beta,2-beta- $^3\text{H}$ -androsten-3,17-dionu. Veškeré inkubace se provádějí na protřepávané vodní lázni za teploty 37 °C na vzduchu v 10 mM pufru fosforečnanu draselného o pH 7,5, který obsahuje 100 mM chloridu draselného, 1 mM EDA a 1 mM dithiothreitolu.

Pokusy se provádějí v inkubačním objemu 1 ml s obsahem 50 nmol 4-/ $^3\text{H}$ -androstendionu, proměnlivé koncentrace inhibitorů, 100  $\mu\text{mol}$  NADPH a 0,05 mg mikrosomních proteinů. Po 15 minutách inkubace se reakce zastaví tím, že se přidá 5 ml chloroformu. Po odstředování při 1 500 g po dobu 5 minut se pro stanovení vzniklé  $^3\text{H}_2\text{O}$  odebere z vodní fáze alikvotní podíl /0,5 ml/.

Koncentrace každé sloučeniny vyžadované ke snížení řízení tvorby aromatázy na 50 % / $\text{IC}_{50}$ / se stanoví vymezením procenta inhibice proti logaritmu koncentrace inhibitoru. Relativní účinek každé sloučeniny proti 4 OH-A se vypočítá podle vztahu:

$$\text{relativní účinek} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ 4 OH-A}}{\text{IC}_{50} \text{ testované sloučeniny}}$$

#### b/ Inhibice aromatázy in vivo u krys

Dospělé samice krys se subkutánně dvakrát ošetří 100 mezinárodními jednotkami gonadotropinového séra březích klisen, /PMSG/ ve čtyřdenním intervalu, za účelem zvýšení účinku aromatázy na vaječník podle Brodieovy metody /A. M. H. Brodie a spol., Steroids 38, 693 /1981//. Tři dny po druhém ošetření gonadotropinovým sérem březích klisen, skupiny vždy šesti zvířat obdrží orálně vehikulum (0,5% methocel/ nebo inhibitor v dávce 30 mg/kg. O 24 hodin

později se zvířata usmrtí a z vaječníků se izolují mikrosomy a jejich aromatázová aktivita se stanoví za použití stejné metody popsané výše ad a/.

S ohledem na vysoký terapeutický index se sloučeniny vyrobitelné podle vynálezu mohou bezpečně používat v medicíně. Tak například přibližná akutní toxicita  $/LD_{50}/$  sloučenin podle vynálezu u myši, stanovená jediným podáním vzrůstajících dávek a měřením sedmého dne po ošetření, byla nepatrná. Sloučeniny podle vynálezu se mohou podávat v různých dávkových formách, například orálně ve formě tablet, kapslí, tablet povlečených cukrem nebo filmem, kapalných roztoků nebo suspenzí, rektálně ve formě čípků, parenterálně například intramuskulárně nebo intravenózními injekcemi nebo infúzí.

Dávka závisí na věku, hmotnosti, stavu pacienta a způsobu podání.

Farmaceutické prostředky obsahují sloučeninu vyrobitelnou podle vynálezu společně s farmaceuticky přijatelným excipientem, kterým může být nosič nebo ředidlo.

Farmaceutické prostředky obsahující sloučeniny podle vynálezu se obvykle připravují běžnými metodami a podávají se ve farmaceuticky vhodné formě.

Pevné orální formy například mohou obsahovat společně s účinnou látkou ředidla, jako například laktózu, dextrózu, sacharózu, celulózu, kukuřičný a bramborový škrob, kluzné látky, například oxid křemičitý, mastek, kyselinu stearovou, stearat hořečnatý nebo vápenatý a/nebo polyethylenglykoly, pojiva, například škroby, arabskou gumu, želatinu, methylcelulózu, karboxymethylcelulózu nebo polyvinylpyrrolidon, prostředky usnadňující rozpad, například škrob, kyselinu alginovou, algináty nebo natriumglykolát škrobu, šumivé směsi, barviva, sladidla, smáčecí prostředky jako lecitin, polysorbáty, laurylsulfáty a obecně netoxické a farmakologicky neúčinné látky používané ve farmaceutických prostředcích. Tyto farmaceutické prostředky se mohou vyrábět známým způsobem, například mísením, granulováním, tabletačí nebo postupy pro povlékání cukrem nebo filmem.

Kapalné disperze pro orální podání mohou být například sirupy, emulze a suspenze.

Sirupy mohou jako nosič obsahovat například sacharózu nebo sacharózu s glycerinem a/nebo mannitolem a/nebo sorbitolem.

Suspenze a emulze mohou jako nosič obsahovat například přírodní gumu, agar, alginát sodný, pektin, methylcelulózu, karboxymethylcelulózu nebo polyvinylalkoholy.

Suspenze nebo roztoky pro intramuskulární injekce mohou obsahovat společně s účinnou sloučeninou farmaceuticky přijatelný nosič, například sterilní vodu, olivový olej, ethyl-oleát, glykoly, například propylenglykol a jestliže je to žádoucí, vhodné množství hydrochloridu lidokainu. Roztoky pro intravenózní injekce nebo infúze mohou obsahovat nosič, například sterilní vodu, nebo s výhodou mohou být ve formě sterilních vodných isotonických roztoků chloridu sodného.

Čípky mohou obsahovat společně s účinnou sloučeninou farmaceuticky přijatelný nosič, například kakaové máslo, polyethylenglykol, estery mastných kyselin s polyoxyethylensorbitanem jako povrchově aktivní látku nebo lecitin. Následující příklady vynálezu ilustrují, avšak jej žádným způsobem neomezují.

#### P ř í k l a d 1

Na roztok 1,0 g 4,5-epoxy-6-methylenandrosta-1-en-3,17-dionu v 10 ml ledové kyseliny octové se působí plynným chlorovodíkem po dobu 30 minut za teploty místnosti. Sraženina se odfiltruje, promyje se diethyletherem, vysuší a chromatografuje na silikagelu za použití systému hexan-ethylacetát. Získá se 0,8 g čistého 4-chlor-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dionu, t.t. 148 až 150 °C.

Analýza pro  $C_{20}H_{23}ClO_2$ :

Vypočteno: 72,61 % C, 7,01 % H, 10,72 % Cl

nalezeno : 72,60 % C, 6,91 % H, 10,53 % Cl

NMR  $\delta$  ppm: 0,84 /3H, s/, 1,24 /3H, s/, 5,13 /1H, s/, 5,43 /1H, s/, 6,37 /1H, d/, 7,08 /1H, d/,  
hmotnostn

hmotnostní spektrum MS /m/z/: 330.

Sloučeniny uvedené dále se získají, jestliže se postupuje podle výše uvedeného postupu, vychází se z příslušných 4,5-epoxyderivátů a použije se vhodné halogenovodíkové kyseliny v plynné fázi.

4-brom-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,

Analýza pro  $C_{20}H_{23}BrO_2$ :

vypočteno: 64,00 % C, 6,18 % H, 21,29 % Br,

nalezeno : 63,90 % C, 6,30 % H, 21,15 % Br.

4-fluor-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,

analýza pro  $C_{20}H_{23}FO_2$ :

vypočteno: 76,41 % C, 7,37 % H, 6,04 % F

nalezeno : 76,35 % C, 7,34 % H, 6,01 % F.

4-chlor-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion

4-brom-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,

4-fluor-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,

analýza pro  $C_{21}H_{25}FO_2$ :

vypočteno: 76,80 % C, 7,67 % H, 5,79 % F,

nalezeno : 76,75 % C, 7,62 % H, 5,71 % F.

4-chlor-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,

4-brom-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion a

4-fluor-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion.

## P ř í k l a d 2

Na roztok 1,0 g 4,5-epoxy-6-methylenandrosta-1-en-3,17-dionu ve 100 ml diethyletheru se působí 1,4 ml bortrifluoridetherátu po dobu 3 hodin za teploty místnosti. Roztok se potom promyje 5% roztokem uhlíčitanu sodného, vodou, vysuší síranem sodným a odpaří za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí ve 20 ml pyridinu a za teploty 0 °C se přidá 0,4 ml thionylchloridu. Po 5 minutách se přidá voda a produkt se izoluje vytřepáním etherem. Etherové extrakty se promyjí 2N kyselinou chlorovodíkovou, vodou, suší síranem sodným a odpaří. Výsledná surová látka se chromatografuje na silikagelu za použití systému hexan-ethylacetát jako eluentu. Získá se 0,6 g čistého 4-fluor-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17 dionu.

Analýza pro  $C_{20}H_{23}FO_2$ :

vypočteno: 76,40 % C, 7,37 % H, 6,04 % F,

nalezeno : 76,30 % C, 7,35 % H, 5,91 % F.

Za použití výše uvedené metody se vyrobí tyto sloučeniny:

4-fluor-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion, 4-fluor-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion.

## P ř í k l a d 3

5 g 6-methylenandrosta-4-en-3,17-dionu se rozpustí ve 200 ml methanolu a ochladí na

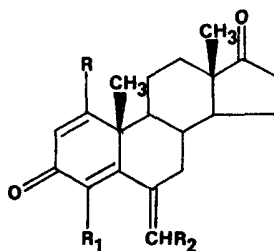
teplotu 0 °C. K roztoku se potom přidá 17 ml ledové chladné 36% peroxidu vodíku a 9 ml 2% hydroxidu sodného. Směs se míchá jednu hodinu, nechá stát 20 hodin za teploty 5 °C a poté se vylíje do 1 400 ml ledové vody za intenzivního míchání. Produkt se odfiltruje, promyje vodou a suší. Získá se 4,2 g /80 %/ 4,5-epoxy-6-methylenandrosta-3,17-dionu /směs alfa/beta-epoxidů/, NMR  $\delta$  ppm: 0,90 /3H, s/, 0,97 /3H, s/, 3,52 /1H, s/, 4,92 /1H, široký/, 5,06 /1H, široký/.

3 g 4,5-epoxy-6-methylenandrosta-3,17-dionu a 1,7 g dichlordikyanobenzochinonu se rozpustí v 60 ml bezvodého dioxanu a zahřívá se pod zpětným chladičem asi 15 hodin. Studený roztok se filtruje přes oxid hlinitý a rozpouštědlo se odpaří za sníženého tlaku. Odparek se vyjme ethylacetátem, organická vrstva promyje vodou, suší a rozpouštědlo se odstraní za sníženého tlaku. Surový produkt se chromatografuje na silikagelu za použití systému hexan-10 až 40% ethylacetát. Dostane se 1,5 g čistého 4,5-epoxy-6-methylenandrosta-1-en-3,17-dionu, NMR  $\delta$  ppm: 0,93 /3H, s/, 1,13 /3H, s/, 3,71 /1H, d/, 5,03 /2H, m/ 5,86 /1H, d/, 6,78 /1H, d/.

Podle výše uvedeného postupu a za použití příslušného 6-alkylidenandrosta-4-en-3,17-dionu se vyrobí tyto sloučeniny: 1-methyl-4,5-epoxy-6-methylenandrosta-1-en-3,17-dion, 1-ethyl-4,5-epoxy-6-methylenandrosta-1-en-3,17-dion, 4,5-epoxy-6-ethylidenandrosta-1-en-3,17-dion, 1-methyl-4,5-epoxy-6-ethylidenandrosta-1-en-3,17-dion a 1-ethyl-4,5-epoxy-6-ethylidenandrosta-1-en-3,17-dion.

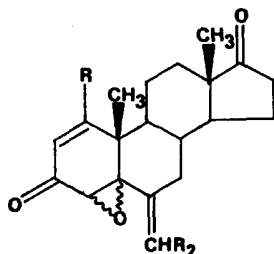
#### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

##### 1. Způsob přípravy androsta-1,4-dien-3,17-dionů obecného vzorce I



/I/

kde R a R<sub>2</sub> nezávisle na sobě znamenají vodík nebo alkyl s 1 až 6 atomy uhlíku a R<sub>1</sub> znamená halogen, vyznačující se tím, že se nechá reagovat sloučenina obecného vzorce II



/II/

kde R a R<sub>2</sub> mají výše uvedený význam, s hydrohalogenačním činidlem a je-li to žádoucí, rozdělí se směs isomerů sloučeniny obecného vzorce I na jednotlivé isomery.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se za použití příslušně substituovaných výchozích sloučenin obecného vzorce II a příslušného halogenačního činidla, připraví

- 4-fluor-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,
- 4-chlor-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,
- 4-fluor-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion,
- 4-chlor-1-methyl-6-methylenandrosta-1,4-dien-3,17-dion a
- 4-fluor-6-ethylidenandrosta-1,4-dien-3,17-dion.