

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

293 156

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1998 - 3323**

(22) Přihlášeno: **17.04.1997**

(30) Právo přednosti:
18.04.1996 FR 1996/9604845

(40) Zveřejněno: **17.11.1999**

(Věstník č. 11/1999)

(47) Uděleno: **18.12.2003**

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

(86) PCT číslo: **PCT/FR1997/000693**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1997/039018**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

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
A 61 P 29/00
A 61 P 37/06

(73) Majitel patentu:

AVENTIS PHARMA S.A., Anthony, FR;

(72) Původce vynálezu:

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:

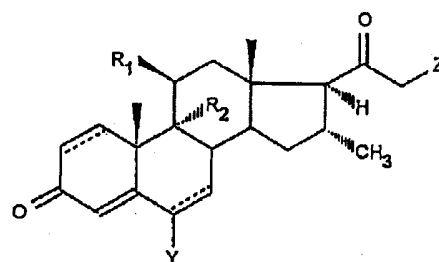
Matějka Jan JUDr., Národní 32, Praha 1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Steroidy, způsob jejich přípravy, meziprodukty
vzniklé při jejich přípravě a kompozice s
obsahem steroidů**

(57) Anotace:

Sloučeniny obecného vzorce I, ve kterém buď R_1 představuje halogen, hydroxy skupinu, C_1-C_8 alkoxy nebo (C_1-C_{12}) acyloxy skupinu a R_2 představuje halogen nebo vodík, nebo R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu, Z je zvoleno z volitelně substituovaných skupin (C_1-C_8) alkylthio, skupiny fenylothio, (C_1-C_8) alkyloxy, halogen, kyano, merkaptó, thiokyanato a $(CH_2)_{0-1}-CO_2H$ volitelně esterifikovaných, Y představuje vodík nebo methyl, tečkovaná čára v pozici 1-2 nebo 5-6 volitelně představuje druhou vazbu, zrovna tak jako jejich adiční soli; dále je popsán způsob přípravy těchto sloučenin, meziprodukty vzniklé při jejich přípravě a farmaceutické kompozice s obsahem uvedených sloučenin.



(I)

Steroidy, způsob jejich přípravy, meziprodukty vzniklé při jejich přípravě a kompozice s obsahem steroidů

5 Oblast techniky

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

10

Dosavadní stav techniky

Mezi protizánětlivými a imonosupresivními sloučeninami, které jsou v současné době známy, představují glukokortikoidy jednu z nejúčinnějších terapeutických tříd. Jejich použití je však
15 přesto omezeno, a to vzhledem k jejich četným vedlejším účinkům, mezi kterými lze uvést zejména tyto:

Zpožďující působení na osu hypothalamus–hypofýza–nadledvinky (HPA), netolerance glukózy, což může uspišit objevení diabetu, poškození svalové tkáně, zpomalování hojení, atrofie kůže, osteoporóza, zvýšená vnímavost k infekcím, nervové poruchy, hypercholesterolemie.
20

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 cílových genů (Evans, R. N., 1988 Science, 240, 8893895),
25 (Green S., Kumar V., Theulaz, I., Wahli, W. a Chambon P., 1988 EMBO J., 7, 3037–3044), (Beato M., 1989, Cell, 56, 335–344), Jonat, C. Rahmamsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C. Gebel, S., Ponta H., Herrlich, P., 1990 Cell, 62, 1189–1204), (Pfahll, M. 1993 Endocrine Reviews, 14, 651–658).

Sloučeniny s blízkou strukturou a aktivitou jako jsou deriváty pregnan–3–, 20 dionu substituované v poloze 17– α hydroxy skupinou nebo jejich estery jsou popsány v patentových spisech EP 320 253, US 5 223 493 a US 5 420 120.
30

Sloučeniny obecného vzorce II použité jako výchozí produkty v postupu přípravy sloučenin obecného vzorce I jsou obecně známy. Jde především o desoxymethason (US patent č. 3 232 839), 9 α , 11 β –dichlor–16 α –methyl–21–hydroxypregna–1,4–dien–3,20–dion (dodatková přihláška č. 2 381 065), 16 α –methyl–1,4–pregnadien–11 β ,21–diol–3,20–dion (US patent 3 354 186), 6 α ,16 α –dimethyl–1,4–pregnadien–11 β ,21–diol–3,20–dion (US patent 3 232 839).
35

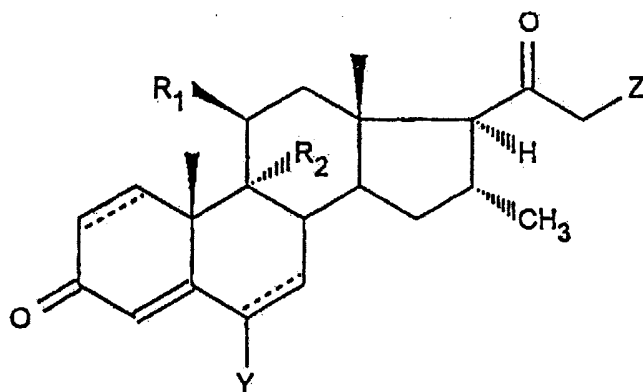
Použití mutantů glukokortikoidových receptorů umožnilo stanovit, že určité oblasti těchto receptorů působí na funkci transaktivace nebo transreprese a že tyto dvě funkce je teoreticky možno oddělit (Heck S., Kullman, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmamsdorf, H. J., Herrlich, P., a Cato, A. C. B. 1994 ENBO J., 13, 4087–4095).
40

Získání ligandů glukokortikoidového receptoru působících in vivo jako protizánětlivé prostředky zbavené transaktivační funkce by umožnilo vyvinout sloučeniny, které by pacient lépe snášel.
45

Podstata vynálezu

50

Předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I



(I),

ve kterém buď

5 R_1 představuje atom halogenu, hydroxy skupinu, alkoxy skupinu s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, acyloxy skupinu 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,

10 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, fenylthio skupiny, 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,

15 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 9α -fluor- 11β -hydroxy- 16α -methyl- 21 -chlorpregna- $1,4$ -dien- $3,20$ -dion je vyloučena a když R_1 a R_2 spolu vytvářejí druhou vazbu, Z není atom halogenu.

20

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

Alkyloxy a alkylthio skupinami s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku se především rozumí methoxy, ethoxy, propoxy, butyloxy skupiny a dále odpovídající sirné analogy.

25

Alkyl skupinou s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku se rozumí tyto skupiny: methyl, ethyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, *terc*-butyl, *n*-pentyl, *n*-hexyl, 2-methylpentyl, 2,3-dimethylbutyl, *n*-heptyl, 2-methylhexyl, 2,2-dimethylpentyl, 3,2-dimethylpentyl, 3-ethylpentyl, *n*-oktyl, 2,2-dimethylhexyl, 3,3-dimethylhexyl, 3-methyl-3-ethylpentyl. Zvláště jde o methyl, ethyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl a *terc*-butyl skupiny. Arylthio skupina je především thiofenyl.

30

Když Z je substituovaná alkylthio nebo arylthio skupina, může jít o tyto substituenty: fluor, chlor, brom, jod, alkyl skupiny jako methyl, ethyl, propyl, izopropyl, butyl, izobutyl, *terc*-butyl, alkoxy skupiny jako methoxy, ethoxy, propyloxy, izopropyloxy, butyloxy, alkylthio skupiny jako methylthio, ethylthio, propylthio, izopropylthio, butylthio, amino skupinu, alkylamino skupinu jako methylamino nebo ethylamino, dialkylamino skupinu jako dimethylamino, diethylamino, methylamino, volitelně acylovanou hydroxy skupinu, např. acetoxy skupinu vzorce: $-O-CO-(CH_2)_nCO_2H$, kde $n=2$ až 5, acyl skupinu s obsahem 2 až 8 atomů uhlíku jako acetyl, propionyl, butyryl, benzoyl, volnou karboxylovou skupinu, esterifikovanou karboxylovou skupinu, např. methoxykarbonyl nebo ethoxykarbonyl, kyano skupinu, trifluormethyl nebo fenyl skupinu. Termín alkyl znamená skupinu s obsahem od 1 do 12 atomů uhlíku.

40

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.

5

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

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

10

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

15

Dalším předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I výše definované, kde R_1 je hydroxy skupina a R_2 je atom fluoru, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.

20

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

25

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

30

Mezi výhodné sloučeniny podle vynálezu lze uvést následující sloučeniny:

9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,

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

21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion,

35

21-thio-(2-hydroxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion,

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

9 α ,11 β -dichlor-21-fluor-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion

a zejména

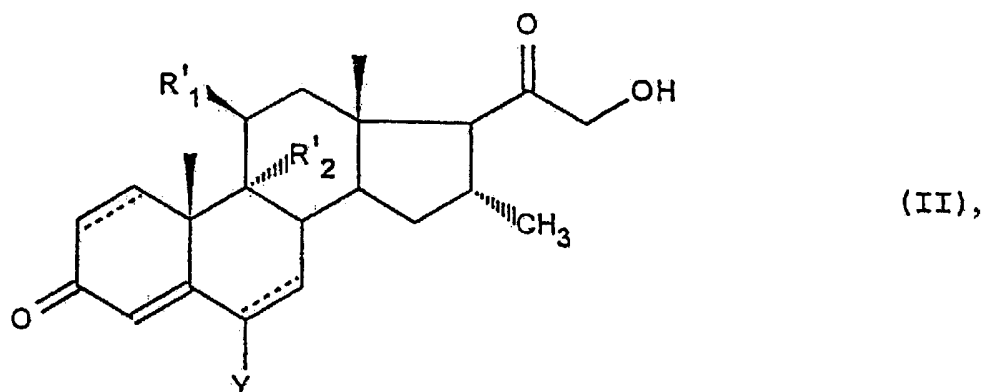
40

9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,

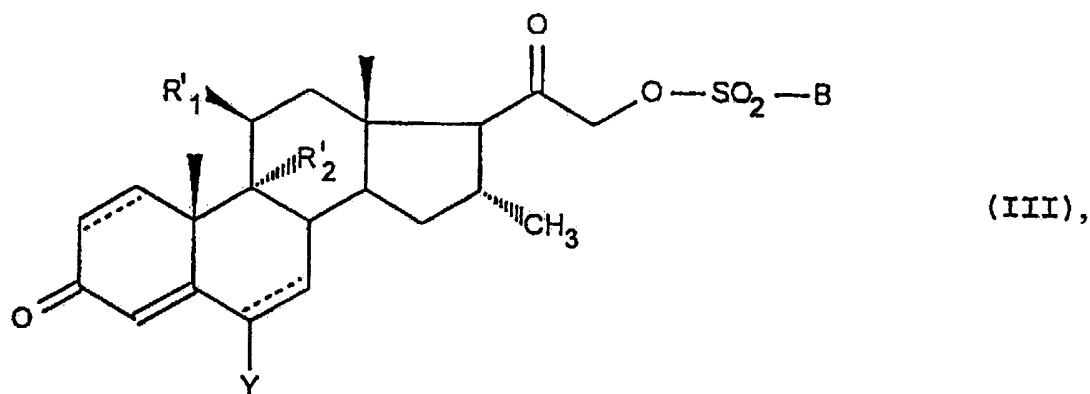
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethylpregna-1,4-dien-3,20-dion.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I, vyznačený tím, že sloučenina obecného vzorce II

45



- ve kterém buď R'_1 je hydroxy skupina 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 $\text{Hal-SO}_2\text{-B}$, kde Hal je atom bromu nebo atom chloru a B je alkyl skupina s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaná nebo substituovaná 1 až 5 atomy halogenu nebo fenylní nebo naftyl skupina nesubstituovaná nebo substituovaná 1 až 5 alkyl skupinami s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku pro přípravu sloučeniny obecného vzorce III



- načež je sloučenina obecného vzorce III případně podrobena jedné nebo více následných reakcí ve vhodném pořadí pro přípravu sloučeniny obecného vzorce 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 NMaSCN,
 působení alkoholu nebo alkoholátu,
 acylace v pozici 11,
 alkylace v pozici 11,
 redukce dvojné vazby v pozici 1-2,
 vytvoření dvojné vazby v pozici 1-2,
 dehydratace pro vytvoření dvojné vazby v pozici 9-11,
 tvorba solí.
- B představuje především $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$ -PhMe skupiny.

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

- 5 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 nebo draselného.

10

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

- 15 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.

- 20 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.

25

Vytvoření odpovídající thiolu se především provádí nepřímou metodou jako je působení thioamidu nebo thiomocoviny s následnou hydrolyzou.

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

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

35

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 $21-CH(COOEt)_2$ se především provádí za přítomnosti silné zásady jako je hydrid sodný v aprotickém polárním rozpouštědle jako je HMPT.

40

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

45

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

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

50

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.

- 5 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.

- 10 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.

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

- 20 Alkylace hydroxylu na pozici 11 se provádí např. působením alkyl jodidu za přítomnosti zásady jako je *tert*-butylát draselný v rozpouštědle jako je tetrahydrofuran.

Předmětem vynálezu jsou také nové průmyslové produkty, a to sloučeniny obecného vzorce III s výjimkou níže uváděných sloučenin:

25

- 21-(methansulfonyloxy)-16 α -methylpregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dion,
21-(methansulfonyloxy)-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion.
21-(4-methylfenylsulfonyloxy)-16 α -methylpregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dion.

- 30 Sloučeniny obecného vzorce I podle vynálezu mají užitečné farmakologické vlastnosti:

1) Glukokortikoidní aktivita

- 35 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

40

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

- 45 Sloučeniny podle vynálezu byly testovány na modelech HELA buněk naočkovaných GRE-tk-CAT plazmidem (transaktivace) nebo pColl-CAT plazmidem (transreprese) (Cf, TEST 1).

- 50 Sloučeniny 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, dermatózy, 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 obecného vzorce I, jejich adiční soli s farmaceuticky přijatelnými kyselinami nebo zásadami užitá jako léčiva s glukokortikoidní aktivitou.

Zvláštním předmětem vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce I, jejich adiční soli s farmaceuticky přijatelnými kyselinami nebo zásadami užitá 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 -methylpregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-3,20-dioxopregn-4-en-21-karbonitril
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-methylthio-pregna-1,4-dien-3,20-dion,
methyl-3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-norcholan-1,4-dien-24-oát,
21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion.

Dále lze jako léčiva podle vynálezu uvést zejména tyto sloučeniny:

9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion-21-karbonitril,
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-methylthio-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 obecného vzorce 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 sloka (složky) může být zapracována do excipientů obvykle používaných v těchto farmaceutických kompozicích jako je talek, arabská guma, laktóza, škrob, stearát hořečnatý, kakaové máslo, vodná nebo i bezvodá vehikula, tukové látky jak zvířecího, tak i rostlinného původu, deriváty parafinu, glykoly a rovněž různá zvlhčující, disperzí nebo emulzifikační 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 popsáných sloučenin.

Příklady

Sloučeniny obecného vzorce I

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

10 Po rozpuštění 6 g deoxymethasonu 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 médium 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.

Teplota tání = 185 °C.

15

Infračervené spektrum

C=O 1726 a 1707 cm⁻¹.

20

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

25 Po rozpuštění 1,86 g 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 médium se přelije do vody, separuje se, surový produkt se promyje a vyčistí rekrystalizací ze směsi methylenchloridu (CH₂Cl₂) a izopropyléteru. Získá se 1,477 g očekávaného čistého produktu.

Teplota tání = 166 °C.

30

Infračervené spektrum (CHCl₃)

OH 3620 cm⁻¹ + asociované

C=O 1715 (rameno), 1694, 1666 cm⁻¹

35 C=C 1627, 1611 cm⁻¹.

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

40 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.

45

Teplota tání = 250 °C.

Infračervené spektrum (CHCl₃)

50 OH 3615 cm⁻¹ + asociované

C=O 1723, 1664 cm⁻¹

Δ 1-4 1627, 1608 cm⁻¹

C $\equiv$ N 2260 cm⁻¹.

Příklad 3: 21-chlor-9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregn-4-en-3,20-dion

Postupuje se jako u přípravy 1 s 8 g 16 α -methyl-9 α -fluorpregn-4-en-11 β ,21-dion (FR 1315629). Získá se 4,95 g očekávaného čistého produktu po rekrytalizaci z 2,2-dimethoxypropanu.

Teplota tání = 196 °C.

Infračervené spektrum (CHCl₃)

OH	3616 ⁻¹
C=O	1725, 1706 cm ⁻¹
Δ 4	1663, 1624 cm ⁻¹ .

Příklad 4: 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-3,20-dioxopregn-4-en-21-karbonitril

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

Teplota tání = 224 °C.

Infračervené spektrum (CHCl₃)

OH	3610 cm ⁻¹ + asociované
C=O	1722 cm ⁻¹
Δ 4	1667, 1625 cm ⁻¹
C $\equiv$ N	2260 cm ⁻¹ .

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

Stupeň A: 21-chlor-16 α -methylpregna-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 16 α -methyl-21-hydroxypregna-1,4,9(11)-trien-3,20-dionu 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 očekávaného čistého produktu.

Teplota tání = 154 °C.

Stupeň B: ethyl-3,20-dioxo-23-ethoxykarbonyl-16 α -methyl-21-norchola-1,4,9(11)trien-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 60 ml ethylmalonátu a míchá se při okolní teplotě do 4 h. Reakční médium 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)-trien-24-ová kyselina.

5 16,4 g diesteru připraveného v předchozím stupni, 200 ml ethanolu a 100 ml 2N vody 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.

Teplota tání = 170 °C.

10

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

Směs sestávající z 14,6 g dikyseliny získané v předchozím stupni v 250 ml HMPT se ohřívá po 4 min v kovové lázni přehřáté na 180 °C, poté se směs přelije do 1500 ml směsi voda-led. 15 Vysrážený monoacid se zfiltruje, promyje se a vysuší. Získá se 11,9 g očekávaného produktu.

Teplota tání = 208 °C.

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

25 Teplota tání = 98 °C.

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

30 7,3 g A-bromosukcinimidu, 7,3 ml 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 médium přelije do 500 ml vody, provede se filtrace a vysuší sraženina. Získá se 12,8 g očekávaného produktu.

35 Teplota tání = 230 °C.

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

40 18 g octanu chromnatého se přidá v inertní atmosféře ke směsi 12,8 g bromhydrinu připraveného v předchozím stupni v 50 ml dimethylsulfoxidu a 6 ml thiofenolu; směs se míchá po dobu 1 h při teplotě místnosti. Reakční 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 45 produktu.

Teplota tání = 166 °C.

Infračervené spektrum (CHCl₃)

50

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.

55

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.

5

Produkt z příkladu 1

50 mg

Excipient (talek, škrob, stearat hořečnatý)

10 Farmakologická studie produktů podle vynálezu

I) Studie regulace transkripce do transfektovaných Hela buněk

15 Hela buňky (ATCC ref: CCL-2) byly rozděleny na desce s šesti prohlubněmi do nutričního média s hustotou 4×10^5 buněk/ml 24 h před transfekcí a inkubovány při 37 °C. Tranzitní transfekce byly produkovány srážecí metodou za použití fosforečnanu vápenatého. V případě studie transaktivace byly buňky transfektovány 1 µg GRE-tk-CAT plazmidem, 1 µg polyII-β-GAL plazmidem a KS plazmidem (Stratagene), s.q.f. 5 µg. V případě studie transreprese byly buňky transfektovány 3 µg Coll (-517/+63)CAT plazmidem, 250 ng pSV-cjun

20 plazmidem, 1 µg polyII β-GAL plazmidem a KS plazmidem (Stratagene), s.q.f. 5 µg. Sraženina se ponechala v kontaktu s buňkami po 16 h. Buňky se poté promyly a pokryly nutričním médiem 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

25 (Boehringer Mannheim).

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

30 Závěr:

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

	Koncentrace (M)	aktivace GRE-tk (%)	inhibice 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

35 2) Protizánětlivá aktivita

Nádorový (granuloma) test – Thymolytická aktivita

40 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. Hmotnost nádoru se vypočítala odečtením počáteční hmotnosti bavlny.

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

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 hmotnosti 18 až 22 g krotonovým olejem (2% objem/objem) v roztoku pyridin–voda–éter v poměru 4:1:14,6 (obj.). Zvířata byla usmrcena po 6 h, ucha byla vyjmuta a zvážena. Rozdíly v hmotnosti 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
Prednisolon	4
Příklad 1	10
Příklad 2	2

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

3) Imunosupresivní aktivita

Imunosupresivní aktivita byla zkoumána podle testu zpožděné hypersenzitivity popsané v článku publikovaném Hambleton et al. (Agents and Actions, 1990, 29, 328). Krysím samečkům Wistar vážícím od 150 do 160 g byla ke dni 0 aplikována subkutánní injekcí do zadečku suspenze Mycobacterium Tuberculosis 4 mg/ml v parafínovém oleji (0,1 ml/zvíře).

Produkty byly podávány orální cestou do čtvrtého do sedmého dne.

Sedmého dne, hodinu po poslední dávce, byla zvířatům injekčně podána rozpustná frakce antigenu stimulující hypersenzitivní 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.

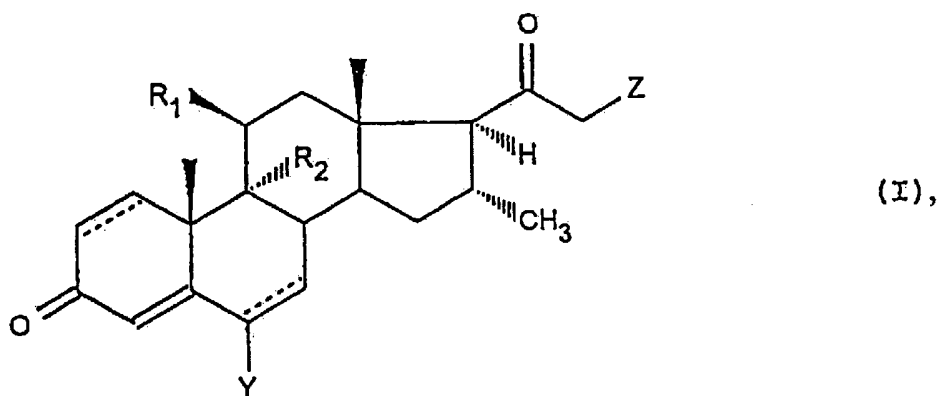
Produkt z příkladu	Zpožděná hypersenzitivita (M. Tuberculosis, krysa) ED 50 (mg/kg)
dexamethason	0,05
prednisolon	5–20
příklad 1	2,3
příklad 2	1,5

Závěr:

5 Prednisolon vykazuje hodnoty ED 50 desky mezi 5 a 20 mg/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 10 mg/kg.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Steroidy obecného vzorce I



ve kterém bud'

R₁ představuje atom halogenu, hydroxy skupinu, alkoxy skupinu s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku, acyloxy skupinu s obsahem 1 až 12 atomů uhlíku a

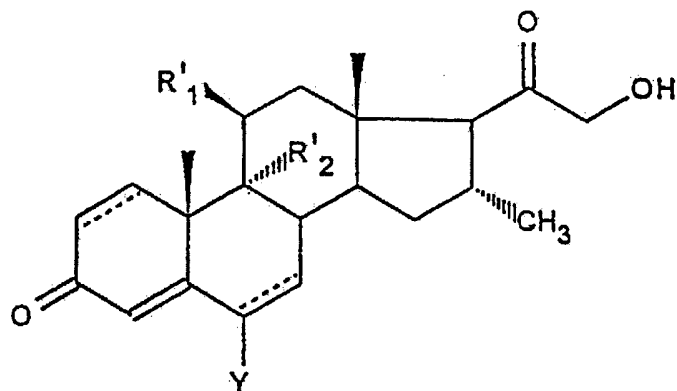
R₂ představuje atom halogenu nebo atom vodíku nebo R₁ a R₂ spolu vytvářejí druhou vazbu,

25 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, fenylothio skupiny, 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.

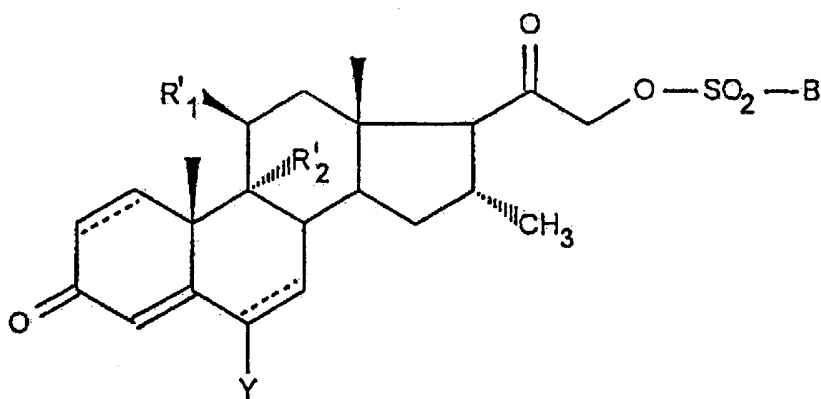
zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami za předpokladu, že sloučenina 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-chlorpregna-1,4-dien-3,20-dion je vyloučena a když R₁ a R₂ spolu vytvářejí druhou vazbu, Z není atom halogenu.

2. Sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I, kde R_1 je hydroxy skupina, R_2 je atom fluoru, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.
3. Sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 obecného vzorce I, kde kruh B je nasycen a Y je atom vodíku, zrovna tak jako jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami.
4. Sloučeniny podle jednoho z nároků 1 až 3 obecného vzorce I, kde Z je zvoleno z kyano a alkylthio skupin s obsahem 1 až 8 atomů uhlíku.
5. Sloučeniny podle nároku 1, kterými jsou
- 9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
methyl-3,20-dioxo-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-norcholan-1,4-dien-24-oát,
21-fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion,
21-thio-(2-hydroxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion,
21-thio-(2-acetyloxyethylen)-9 α ,11 β -dichlor-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion,
9 α ,11 β -dichlor-21-fluor-16 α -methylpregna-1,4-dien-3,20-dion
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methylpregna-4-dien-3,20-dioxo-21-karbonitril,
9 α -fluor-11 β -hydroxy-16 α -methyl-21-thiomethylpregna-1,4-dien-3,20-dion.
6. Způsob přípravy sloučenin obecného vzorce I podle nároku 1, vyznačený tím, že sloučenina obecného vzorce II



(II),

- ve kterém buď R'_1 je hydroxy skupina 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 $\text{Hal-SO}_2\text{-B}$, kde Hal je atom bromu nebo atom chloru a B je alkyl skupina s obsahem 1 až 6 atomů uhlíku, nesubstituovaná nebo substituovaná 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 pro přípravu sloučeniny obecného vzorce III



(III),

kde R'_1 , R'_2 , Y a B mají shora uvedený význam,

- 5 načež je sloučenina obecného vzorce III případně podrobena jedné nebo více následných reakcí ve vhodném pořadí pro přípravu sloučeniny obecného vzorce I:

- působení chloračního, jodačního, bromačního nebo fluoračního činidla,
 působení volitelně substituovaného alkylthiolu nebo arylthiolu,
 10 působení thioamidu nebo thiomočoviny s následnou hydrolyzou,
 působení KCN,
 hydrolyza kyano skupiny v kyselém prostředí, poté volitelně
 esterifikace nebo tvorba solí, postupné působení $\text{CH}_2(\text{COOEt})_2$ a zmýdelnění,
 poté
 15 dekarboxylace volitelně následovaná esterifikací,
 působení KSCN nebo NMaSCN,
 působení alkoholu nebo alkoholátu,
 acylace v pozici 11,
 alkylace v pozici 11,
 20 redukce dvojné vazby v pozici 1 – 2,
 vytvoření dvojné vazby v pozici 1 – 2,
 dehydratace pro vytvoření dvojné vazby v pozici 9–11,
 tvorba solí.
- 25 7. Sloučeniny podle nároku 1 obecného vzorce I, jakož i jejich adiční soli s kyselinami nebo zásadami, jako léčiva.
8. Sloučeniny podle jednoho z nároků 2 až 4, jakož i jejich adiční soli s kyselinami nebo
 30 zásadami, jako léčiva.
9. Sloučeniny podle nároku 5 obecného vzorce I jako léčiva.
10. Farmaceutické kompozice, vyznačující se tím, že obsahují léčiva podle
 35 nároků 7 až 9.