

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **2008-275**
(22) Přihlášeno: **05.05.2008**
(40) Zveřejněno: **06.05.2009**
(Věstník č. 18/2009)
(47) Uděleno: **26.03.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **06.05.2009**
(Věstník č. 18/2009)

(11) Číslo dokumentu:

300 376

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07J 17/00	(2006.01)
C07J 33/00	(2006.01)
C07J 43/00	(2006.01)
C07J 53/00	(2006.01)
C07J 75/00	(2006.01)
A61K 31/58	(2006.01)
A61P 9/12	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 25/16	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

EP 1131336 B.

Mol Endocrinol, July 2004, 18(7):1599–1609, název: Dissecting Physiological Roles of Estrogen Receptor α and β with Potent Selective Ligands from Structure-Based Design.

(73) Majitel patentu:

Přírodovědecká fakulta UK, Praha 2, CZ
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i., Praha 4, CZ
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Praha 6, CZ

(72) Původce:

Novák Petr, Havlíčkův Brod, CZ
Sedlák David, Praha 7, CZ
Bartůněk Petr, Praha 1, CZ
Kotora Martin, Praha 5, CZ

(74) Zástupce:

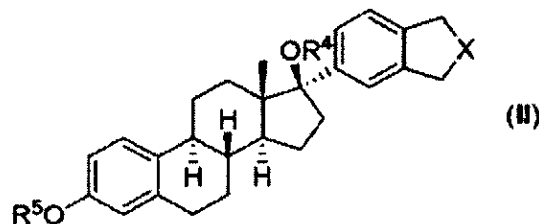
Hák Janeček & Švestka, RNDr. Roman Hák, U Průhonu
5, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**Ligandy estrogenových receptorů alfa a beta,
způsob jejich přípravy a farmaceutické
prostředky, které je obsahují**

(57) Anotace:

Jsou popsány deriváty estradiolu obecného vzorce II, kde R^5 znamená H, C_{1-8} alkyl, C_{6-14} aryl nebo skupinu $-C(O)R$, kde R je C_{1-8} alkyl nebo C_{6-14} aryl, R^4 znamená H nebo C_{1-8} alkyl a X znamená např. C, N, O. Tyto deriváty jsou ligandy estrogenových receptorů α a β a jsou účinné např. pro hormonální substituční terapii nebo pro léčení nádorových nebo zánětlivých onemocnění. Dále je popsán způsob přípravy těchto ligandů cyklotrimerizací ethynylestradiolu v organickém rozpouštědle s vhodným dijnem a farmaceutická kompozice s jejich obsahem.



CZ 300376 B6

Ligandy estrogenových receptorů α a β , způsob jejich přípravy a farmaceutické prostředky, které je obsahují

5 Oblast techniky

Vynález se týká nových ligandů estrogenových receptorů α a β , nového způsobu jejich syntézy a jejich využití *in vitro* a *in vivo*. Ligandy estrogenových receptorů α a β podle vynálezu mohou být účinnou složkou farmaceutických prostředků, například prostředků užitečných pro hormo-
10 nální substituční terapii nebo pro léčení nádorových nebo zánětlivých onemocnění.

Dosavadní stav techniky

15 Steroidní receptory a mechanismus jejich aktivace

Estrogenové receptory α (ER α) a estrogenové receptory β (ER β) spolu s ostatními členy rodiny steroidních receptorů jsou transkripční faktory vyskytující se uvnitř buňky a vázající příslušný steroidní hormon. Steroidní hormony jako estrogeny, androgeny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a progesteron jsou hydrofobní látky s malou molekulovou hmotností schopné volně difun-
20 dovat přes buněčnou membránu dovnitř buňky. Receptor pro steroidní hormon, který v danou chvíli neváže patriční ligand, se vyskytuje v cytoplazmě jako součást multiproteinového komplexu, který mu zabraňuje vstupovat do buněčného jádra. Po navázání ligandu do místa v ligand-vazebné doméně steroidního receptoru dojde ke změně konformace receptoru a rozpadu multiproteinového komplexu. Komplex steroidního receptoru s navázaným ligandem je následně
25 transportován do jádra, kde dimerizuje a váže se na specifickou sekvenci v promotorech genů (tzv. HRE, hormone response element), jejichž transkripci po vytvoření komplexu s příslušnými transkripčními koaktivátory/korepresory moduluje.

Biologické vlastnosti estrogenových receptorů α a β

30 Estrogeny podobně jako ostatní steroidní hormony vyvolávají celou řadu biologických odpovědí. Od 60. let dvacátého století byla obecně přijímána představa, že aktivita estrogenů je zprostředkována receptorem pro estrogenový receptor. V roce 1986 byl vyklonován gen kódující tento receptor^{1,2} a krátce nato byla připravena myš, u níž byl tento gen vyřazen z funkce³. Podle očekávání se projevila ztráta estrogenového receptoru řadou vážných poškození na úrovni funkce
35 mnoha orgánů⁴. Tento fenotyp byl závažný, ale plně v souladu se známými funkcemi estrogenů v těle savců. V této situaci bylo objevení druhého genu pro estrogenový receptor – estrogenový receptor β v roce 1996 velmi překvapivé⁵ a toto zjištění znamenalo, že rozsáhlé spektrum působení estrogenů do té doby přičítané aktivitě jednoho estrogenového receptoru je ve skutečnosti zprostředkováno dvěma různými receptory s jen částečně se překrývajícími biologickými
40 funkcemi.

Ligandy

V rané fázi zkoumání funkce ER β se výzkum zaměřil převážně na tkáňovou distribuci ER β a jeho schopnost vázat specificky ligand.
45

Bylo zjištěno, že 17 β -estradiol je neúčinnější endogenní ligand a váže se se stejnou afinitou k oběma receptorům⁶. Na aminokyselinové úrovni se ligand-vazebná doména obou receptorů shoduje pouze z 56 %⁷. Samotná vazebná kapsa má však homologii výrazně vyšší a liší se pouze
50 záměnou aminokyselin na dvou pozicích. Tato záměna nicméně vytváří dostatečný prostor pro přípravu ligandů vážících se s různou afinitou na jednotlivé receptory. Několik látek s rozdílnou mírou selektivity pro ER β bylo v posledních letech skutečně připraveno, nejvýznamnější z nich jsou například DPN⁸, ERB-041⁹, WAY-202196¹⁰, WAY200070⁹, 8 β -VE₂¹¹. Tyto látky nemají příbuznou strukturu, a proto též vyvolávají různé konformační změny po navázání na receptor.

Tyto změny se potom různým způsobem překládají do biologické aktivity receptoru v buňce. Dále platí, že z afinity ligandu k danému receptoru nelze vyvozovat to, do jaké míry bude ligand aktivovat receptor.

5 Využití selektivních ligandů ER β

- Přestože je ER β exprimován v celé řadě tkání a buněčných typů, jeho expresní distribuce je značně odlišná od ER α . V dnešní době existuje velké množství experimentálních dat, která ukazují, že oba receptory mají často protichůdné účinky na konkrétní tkáň¹²⁻¹⁴. Dobrým příkladem je například tkáň prsního epitelu, kde ER α je mediátor proliferativního účinku estradiolu, zatímco ER β , rovněž exprimovaný v této tkáni, podporuje diferenciaci a negativně ovlivňuje proliferaci této tkáně¹⁵. Exprese ER α při rakovině prsu je považována za důležitý diagnostický marker rozhodující o způsobu léčby¹⁶. Dále je exprese ER β spojována s lepší prognózou nemoci. Například jedna studie ukazuje, že je exprese ER β spojená s lepším přežíváním pacientů, kterým je v průběhu léčby podáván tamoxifen¹⁷. Kromě toho byla pozorována exprese tohoto receptoru v nádorech pacientů, u nichž nemoc ustoupila do bezpříznakové fáze¹⁸. Stručně řečeno, selektivní ligandy pro ER β se mohou projevovat jako látky se širokým spektrem estrogenních účinků, ale na rozdíl od estradiolu nepodporují růst prsní nádorové tkáně nebo dokonce mohou přispívat k potlačení jejího růstu.
- Jinou výhodou selektivních ligandů pro ER β je to, že neovlivňují růst děložní tkáně, který je zprostředkován výhradně ER α ^{14,15}.

Pouze částečně je zatím prozkoumána oblast využití selektivních ligandů ER β v léčbě nádorů prostaty. V této tkáni je hlavním exprimovaným estrogenním receptorem ER β . Analýza myši, u níž byl odstraněn ER β , ukázala, že tento receptor má v prostatě antiproliferativní funkci spojenou s kontrolou diferenciací několika buněčných typů^{19, 20}. Současné podávání testosteronu a estradiolu působí na prostatickou tkáň antiproliferativně a vyšší dávky estradiolu v kombinaci s testosteronem dokonce proapoptoticky¹⁴. Také další práce naznačují, že ER β zprostředkuje antiproliferativní účinek na prostatickou tkáň a chrání ji před nadměrným růstem²¹. Proto jsou selektivní ligandy pro ER β slibným terapeutickým prostředkem pro léčbu prostatických nádorů^{15, 22}.

V oblasti kardiovaskulárních onemocnění poukazují analýzy na transgenních myších, kterým byl odstraněn gen pro ER β , že selektivní ligandy pro tento receptor mohou být účinné v léčbě a prevenci infarktu myokardu^{23, 24} a hypertenze^{25, 26}.

ER β je silně exprimován v určitých částech mozku²⁷. Důležitým příspěvkem k poznání biologických projevů tohoto receptoru bylo zjištění, že estradiol zvyšuje expresi tryptofan hydroxylázy I v serotoninergních neuronech v *nucleus raphe dorsalis*²⁸, a tím pozitivně reguluje syntézu serotoninu, jehož nízká hladina v těchto částech mozku má za následek vznik depresí a stavů úzkosti. Studie chování myši, kterým byly podávány selektivní ligandy pro jeden z estrogenních receptorů ukazují, že selektivní ligandy pro ER β mají přímý blahodárny vliv na depresi a úzkost²⁹⁻³⁵. Kromě toho je stále více zřejmé, že tyto ligandy mají potenciální využití v podpoře kognitivních funkcí mozku a zvláště paměti³⁶.

Neurony myši, kterým byl odstraněn gen pro ER β , vykazují kratší dobu života a ve stáří dvou let lze u těchto myši a zvláště v substantia nigra nalézt známky neurodegenerace^{37, 38}. Z toho vyplývá, že selektivní ligandy pro ER β mohou být použity pro léčbu Parkinsonovy choroby nebo jiných neurodegenerativních onemocnění¹⁵.

Jedno z nejslibnějších využití selektivních ligandů pro ER β představuje krysí model chronického zánětu střeva³⁹. Tyto transgenní krysí trpí chronickým zánětem střeva, který se projevuje silným a trvalým průjemem. Podávání selektivních ligandů pro ER β potlačilo zánět ve střevě a s ním spojený průjem^{10, 40}. Navíc selektivní ligand pro ER β , WAY-169916, inhibuje transkripční

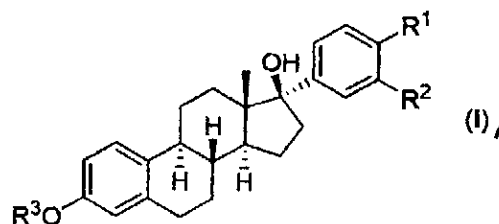
aktivitu NF- κ B⁴¹, klíčového transkripčního faktoru v procesu rané i pozdní fáze zánětlivého procesu a naznačuje širší využití selektivních ligandů pro ER β v nemocích, v nichž hraje zánět podstatnou úlohu, například trauma/sepse⁴², endometrióza⁴³, Alzheimerova choroba⁴⁴ nebo revmatoidní artritida⁴⁵. Pro toto širší použití selektivních ligandů obecně v léčbě zánětlivých onemocnění svědčí též zjištění, že selektivní ligandy pro ER β reprimují transkripci prozánětlivých genů jako je například TNF- α , IL-6 nebo CSF2 nejen cestou inhibice NF- κ B, ale též přímou represí transkripce navázáním specifického transkripčního korepresoru^{41,44}.

U myší, kterým byl odstraněn gen pro ER β , se časem vyvine myeloproliferativní onemocnění, které se podobá lidské chronické myeloidní leukemii s lymfoidní blastickou krizí⁴⁶, ER β tedy reguluje proliferaci pluripotentních hematopoetických progenitorů a selektivní ligandy pro ER β jsou potenciálně využitelné v léčbě myeloidní a lymfoidní leukemie⁴⁷.

ER β je v porovnání s ER α exprimován velmi silně v tlustém střevě. V průběhu maligní transformace dochází v mnoha případech ke ztrátě exprese tohoto receptoru nebo ke změně jeho lokalizace z jádra do cytoplazmy^{48,49}. Ve studii organizované Women's Health Initiative (WHI) mající za úkol zhodnotit využití hormonální substituční léčby (podávání estrogenu a medroxyprogesteron acetátu) u žen ve věku 50–79 let v léčbě kardiovaskulárních onemocnění se sice podle očekávání zvýšil výskyt rakoviny prsu o 26 %⁵⁰, ale zároveň se snížil výskyt rakoviny tlustého střeva o 37 %⁵¹. Vzhledem k tomu, že je v této tkáni ER α exprimovaný pouze v minimálním množství, přisuzuje se ochranný účinek ER β ⁵². Selektivní ligandy pro ER β jsou tedy potenciálně využitelné v léčbě rakoviny tlustého střeva.

Příprava 17- α -arylestradiolů

V literatuře byla dosud popsána příprava 17- α -arylestradiolů obecného vzorce I



kde R¹ je H, R² je H a R³ je Me;^{53,54}, nebo

kde R¹ je H, I, NH₂, NMe₂, N=N-Net₂, N=N-(CH₂)₄, Me, nebo OMe, R² je H a R³ je H;⁵⁵⁻⁵⁷, nebo

kde R¹ je H, R² je I a R³ je H,^{55,58}

příčemž Me je methyl a Et je ethyl.

Přitom tyto látky byly vždy připraveny reakcí příslušných aryllithných sloučenin s estronem či jeho deriváty. Tyto látky byly připraveny buď prostou nukleofilní adicí arylkovových sloučenin na karbonylovou skupinu estronu nebo byly reakce prováděny v přítomnosti BF₃·Et₂O.⁵³⁻⁵⁸

Žádné z výše zmíněných látek neprokázaly významnou selektivitu pro jeden z estrogenových receptorů, ačkoli v některých případech projevovaly vysokou afinitu k oběma receptorům.

Britská patentová přihláška GB 2 361 642 A popisuje agonisty ER β pro použití při léčení rakoviny. Příkladem vhodných agonistů jsou genistein nebo 3 β Adiol.

Mezinárodní patentová přihláška WO 00/53620 popisuje deriváty estradiolu, které účinkují jako inhibitory sulfatázy steroidů a mohou být užitečné při léčení některých nemocí závislých na estrogenech.

WO 05/048956 se týká sloučenin příbuzných estradiolu (analoga 2,3,4-substituovaný-E/Z-fenyl-vinyl-17 β -estradiolu), které jsou užitečné jako protinádorová léčiva, přičemž v podstatě nereagují s estrogenními receptory.

5

WO 05/099704 se týká léčení hypertenze, srdeční dysfunkce nebo infarktu podáváním agonistů ER β .

10

WO 2006/013196 popisuje způsob přípravy 2-substituovaných derivátů estronu a estradiolu, konkrétně 2-alkoxyderivátů, zejména methoxyestronu a methoxyestradiolu. Některé sloučeniny mohou sloužit jako intermediáty estrogenů. Např. 2-methoxyestradiol má velmi nízkou estrogenní aktivitu, zato projevuje významné biologické účinky, jako např. protinádorové nebo protizánětlivé účinky.

15

Patentová přihláška US 2007/0135400 popisuje deriváty 2-methoxyestradiolu, zejména deriváty modifikované v poloze 2, 3 a 17. Sloučeniny mají antimitotické, antiangiogenní a protinádorové účinky.

20

Evropský patent EP 1131336 popisuje specifické deriváty estradiolu, 11- β substituované estradiolové deriváty, které projevují překvapivě vysokou aktivitu vůči estrogenovým receptorům a také selektivitu. Výhodné sloučeniny působí jako agonisté ER α a antagonisté ER β . Léky obsahující tyto deriváty jsou užitečné pro léčení nemocí souvisejících s deficitem estrogenu.

Žádný z výše uvedených dokumentů nepopisuje sloučeniny, které mají strukturu nových sloučenin podle předkládaného vynálezu a překvapivě selektivní účinky na estrogenové receptory.

25

Přestože existují četné hypotézy o funkci ER a byly již publikovány prakticky tisíce článků, přesné funkce ER α a ER β nejsou dosud jasné. Hodně je také známo o možnostech léčebného využití selektivních ligandů, kde se jeví jako zajímavé zejména ligandy selektivní pro ER β . Existuje proto stále potřeba nových ligandů, které by projevovaly selektivní účinky. Takové ligandy najdou uplatnění v biologickém a farmaceutickém výzkumu a také jako léčiva.

30

Nové deriváty estradiolu popsané dále v předkládané přihlášce vykazují aktivitu jako ligandy estrogenových receptorů ER α a ER β , některé s překvapivým selektivním účinkem, zejména β selektivním účinkem.

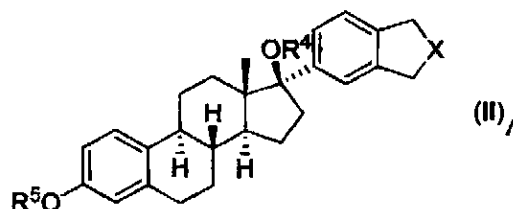
35

Podstata vynálezu

Nové sloučeniny

40

Nové možnosti ovlivnění ER α a ER β poskytují nové 17 α -indanylestradioly, z nichž některé jsou selektivními ligandy ER β , a navíc postrádají nevýhody dosavadních selektivních ligandů. Nové sloučeniny podle vynálezu jsou sloučeniny obecného vzorce II



kde

45

X je atom C nebo heteroatom vybraný ze skupiny sestávající z atomů N, O, kterýžto atom popřípadě nese jeden nebo dva substituenty nezávisle vybrané ze skupiny sestávající z C₁-C₈-alkylové skupiny, C₆-C₁₄-arylové skupiny, karboxylové skupiny, esterifikované karboxylové

skupiny vzorce $-C(O)OR$, kde R je C_1-C_8 -alkyl, C_6-C_{14} -aryl, hydrogenkarbonylové skupiny, alkykarbonylové skupiny obsahující 1 až 8 atomů uhlíku v alkylové části a nitrilové skupiny, přičemž případné neobsazené vazby atomu X nesou atom(y) H,

nebo X je p-toluensulfoamid skupina,

5 R^4 je H nebo C_1-C_8 -alkyl,

R^5 je H, C_1-C_8 -alkyl, C_6-C_{14} -aryl nebo acyl vzorce $-C(O)R$, kde R je H, C_1-C_8 -alkyl nebo C_6-C_{14} -aryl,

a jejich izomerní formy, jejich soli a jejich solváty.

10 Výhodněji se substituenty atomu X vyberou ze skupiny sestávající z H, COO-Et, COMe, CN. Obzvláště výhodně představuje X skupiny $C(COOEt)_2$, $C(COMe)_2$, $C(COOEt)COMe$, $C(COOEt)CN$, CH_2 , O, NTs, nejvýhodněji CH_2 , NTs a $C(COOEt)CN$, přičemž Et znamená ethyl, Me znamená methyl a NTs znamená skupinu p-toluensulfoamido. R^4 je nejvýhodněji H. R^5 je výhodněji H, C_1-C_8 -alkyl nebo acyl vzorce $-C(O)R$, kde R je H, C_1-C_8 -alkyl, C_6-C_{14} -aryl,
15 nejvýhodněji H nebo methyl.

Pokud není uvedeno jinak, mají následující termíny v rámci předkládaného vynálezu následující významy.

20 Alkyl je uhlovodíkový zbytek, který vznikne po odtržení jednoho nebo více vodíkových atomů z molekuly uhlovodíku (uhlovodík je molekula, která má přímou nebo rozvětvenou uhlíkatou kostru obsahující pouze C-C a C-H vazby), a obsahuje 1 až 8 atomů uhlíku, výhodněji 1 až 4 atomy uhlíku. Typickými příklady alkylových skupin jsou např. methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sek-butyl, terc-butyl atd., přičemž nejvýhodnější je methyl a ethyl.

25

Aryl je skupina vzniklá odtržením jednoho nebo více vodíků z molekuly arenu (areny označují aromatické benzenoidní uhlovodíky, mezi něž vedle benzenu patří uhlovodíky odvozené od něho buď záměnou jednoho nebo více vodíků uhlovodíkovými zbytky, nebo připojením dalších cyklů za vzniku vícejaderných kondenzovaných uhlovodíků, přičemž sousední kruhy mají v nich společně vždy dva uhlíkové atomy). V rámci předkládaného vynálezu obsahuje arylová skupina 6 až
30 14 atomů uhlíku. Typickými příklady arylových skupin jsou např. fenyl, naftyl, indenyl, anthracen, fenanthren atd., přičemž nejvýhodnější je fenyl nebo naftyl.

35 Acyl je organický zbytek vzniklý odtržením hydroxylové skupiny z karboxylu karboxylových kyselin, s výhodou alkykarboxylových nebo arykarboxylových kyselin, tj. skupina vzorce $-C(O)R$, kde R je H, alkyl nebo aryl, kde alkyl a aryl je definován stejně jako výše. Typickými příklady acylových skupin jsou benzoyl, formyl nebo acetyl.

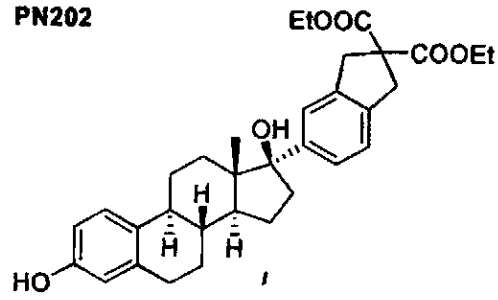
40 Karbonylová skupina se skládá z uhlíkového atomu navázaného dvojnou vazbou ke kyslíkovému atomu, tj. má vzorec $-C(O)-$. Ve sloučenině podle vynálezu je jedna z jejích volných vazeb navázána na atom X a druhá z nich nese atom vodíku (hydrogenkarbonylová skupina) nebo alkylovou skupinu (alkylkarbonylová skupina), jak je definována výše.

45 Karboxylová skupina se skládá z karbonylové skupiny, ve které je na atom uhlíku navázána hydroxylová skupina, tj. je to skupina vzorce $-C(O)OH$. Esterifikovaná karboxylová skupina je skupina vzorce $-C(O)OR$, kde R je alkyl nebo aryl, jak jsou definovány výše.

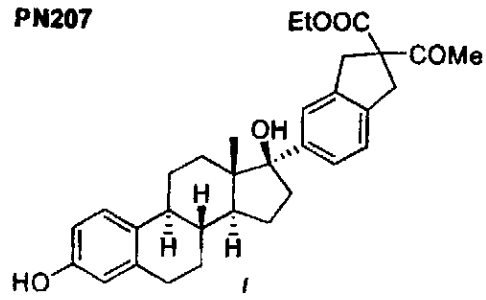
Nitrilová skupina se skládá z atomu uhlíku, na který je navázán atom dusíku trojnou vazbou.

50 Výhodné sloučeniny podle vynálezu jsou sloučeniny označené PN202, PN207, PN214, PN228, PN229, PN232 a PN233, jejichž strukturální vzorce jsou uvedeny dále.

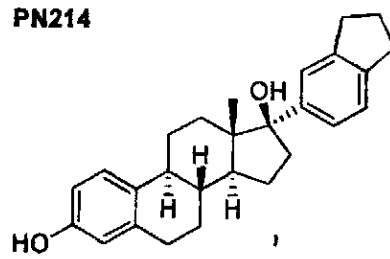
PN202



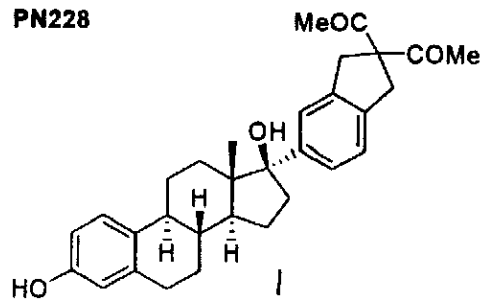
PN207



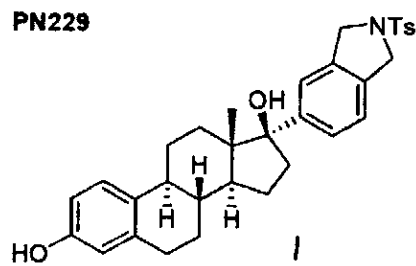
PN214

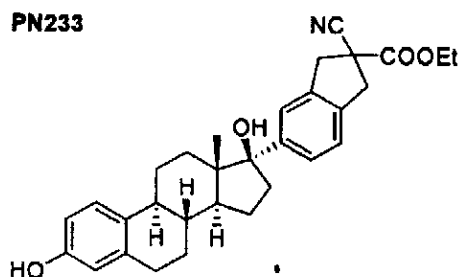
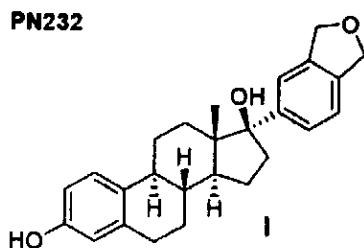


PN228



PN229





Na základě testování aktivity výše uvedených sloučenin v reportérových studiích na tkáňových kulturách s buňkami COS-7 (viz příklad 13) lze shrnout, že nové látky jsou vysoce účinné ligandy obou estrogenových receptorů a jejich účinnost je srovnatelná s estradiolem. To je důležitá vlastnost z hlediska léčebného využití těchto látek, protože takové látky jsou účinné v nízkých koncentracích a jejich aplikace není spojena s vedlejšími účinky jako je např. nespecifická vazba a stimulace ostatních členů rodiny jaderných receptorů, interference s metabolismem steroidních látek nebo obecná toxicita látek v těle. Jako výhodné ligandy se jeví látky PN202, PN207, PN214, PN229, PN232 a PN233 a jako nejvýhodnější ligandy se pak jeví látky PN214 a PN233.

Kromě toho vykazují nové látky různou selektivitu vůči jednomu z estrogenových receptorů. Zde se jako výhodné selektivní ligandy jeví látky PN229 a PN233 pro ER α a látka PN214 pro ER β .

Jako nejvýhodnější selektivní ligand se jeví látka PN214 pro ER β , přičemž selektivita tohoto ligandu je srovnatelná s nejlepšími známými selektivními ligandy pro tento receptor.

Proliferační studie provedené se stejnými sloučeninami (viz příklad 14) podporují předchozí zjištění, že látka PN214 je vysoce selektivním ligandem ER β .

Výše definované sloučeniny obecného vzorce II nebyly v literatuře dosud popsány. Žádné z těchto látek tedy nebyly testovány na afinitu k ER α nebo ER β .

Předkládaný vynález zahrnuje také sloučeniny obecného vzorce II uvedené výše ve všech jejich isomerních formách, a rovněž jejich soli a jejich solváty. Odborník zná způsoby, jak připravit směsi či izolované enantiomery sloučenin podle vynálezu⁵³⁻⁵⁸, a je tedy schopen je rutinním způsobem realizovat. Vynález zahrnuje rovněž profarmaka sloučenin podle vynálezu, tj. látky, které jsou po podání metabolizovány *in vivo* na vlastní účinnou sloučeninu. Pro všechny tyto sloučeniny ve všech těchto formách se v rámci předloženého popisu užívá termín „sloučenina(y) podle vynálezu“.

Předkládaný vynález zahrnuje také každou ze sloučenin výše uvedeného obecného vzorce II jednotlivě.

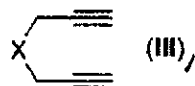
Nový způsob přípravy sloučenin podle vynálezu

Výše definované sloučeniny podle vynálezu byly připraveny novým způsobem, který spočívá v cyklotrimerizaci derivátů ethynylestradiolu s příslušnými diiny za katalýzy komplexu přechodných kovů v organických rozpouštědlech.

5

V souladu s tím je předmětem vynálezu rovněž způsob přípravy sloučeniny obecného vzorce II definované výše, zahrnující

cyklotrimerizaci ethynylestradiolu v organickém rozpouštědle, s diinem obecného vzorce III



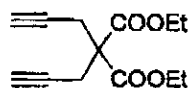
10

ve kterém má X významy uvedené výše pro obecný vzorec II, za přidání katalyzátoru v podobě komplexu přechodného kovu. Poté se případně obvyklým způsobem, např. odpařením, odstraní rozpouštědla a zbytek se případně známými způsoby přečistí, např. chromatografií na silikagelu.

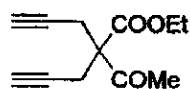
15

Jako ethynylestradiol se výhodně použije 17 α -ethynylestradiol.

Výhodnými diiny použitými v rámci způsobu podle vynálezu jsou diiny obecného vzorce III, ve kterých má X výhodné významy uvedené výše pro obecný vzorec II. Nejvýhodněji se jako diiny obecného vzorce III použijí následující sloučeniny:



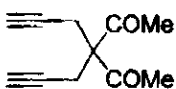
diethyl 2,2-(diprop-2-ynyl)-1,3-propandioát ,



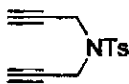
ethyl 2-acetyl-2-(prop-2-ynyl)pent-4-ynoát ,



1,6-heptadiyn ,



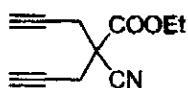
3,3-(diprop-2-ynyl)-2,4-pentadion ,



N,N-di(prop-2-ynyl)-4-methylbenzensulfonamid ,



dipropargylether ,



2-kyano-2-(prop-2-ynyl)pent-4-ynoát .

20

Organickým rozpouštědlem použitým při způsobu podle vynálezu může být jakékoliv vhodné, odborníkovi známé organické rozpouštědlo, např. vybrané z toluenu, benzenu, THF, dichloromethanu, acetonitrilu atd. nebo jejich směsí, výhodněji toluen nebo acetonitril, nejvýhodněji je použitým rozpouštědlem směs suchého toluenu a acetonitrilu.

- 5 Katalyzátor použitý při způsobu podle vynálezu se vybere z komplexů přechodných kovů, např. Ru, Rh, Co, Ni, atd., nebo jejich kombinací, výhodněji $\text{Ni}(\text{cod})_2/\text{PPh}_3$ nebo $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$, nejvýhodněji $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ ($\text{Ni}(\text{cod})_2/\text{PPh}_3$ je bis(hapto4-cyklookta-1,5-dien)nikl/trifenylfosfan, $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ označuje chlorido-tris(trifenylfosfan)rhodný komplex).

- 10 Reakce se výhodně provádí za míchání, výhodně při teplotě 15 až 100 °C, výhodněji při teplotě 15 až 60 °C, nejvýhodněji při 20 °C, výhodně po dobu 8 až 72 hodin, výhodněji po dobu 24 až 48 hodin, nejvýhodněji do úplného zreagování výchozích látek, což lze snadno zkontrolovat, např. chromatografií na tenké vrstvě (TLC).

Vzájemný výhodný molární poměr ethynylestradiolu a diynů obecného vzorce III je přibližně 2:1 až 1:5, výhodně přibližně 1:1 až 1:2, nejvýhodněji přibližně 1:1,2.

- 15 Ve výhodném provedení způsobu podle vynálezu se k roztoku 17α -ethynylestradiolu (0,5 mmol, 150 mg) ve směsi suchého toluenu (6 ml) acetonitrilu (1 ml) přidá $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (0,05 mmol, 46 mg) a diyn obecného vzorce III (0,6 mmol). Reakční směs se míchá při 20 °C po dobu 48 hodin do úplného zreagování výchozích látek (kontrolováno TLC). Poté se odpaří rozpouštědlo a zbytek se podrobí chromatografii na silikagelu.

- 20 Odborník si je vědom toho, že uvedený způsob může být modifikován (změna některého parametru, např. teploty či rozpouštědla či směsi rozpouštědel) a doplňován dalšími v podstatě rutinními kroky (např. čištění), které nemění podstatu způsobu. Takové případně změny a doplnění jsou rutinního charakteru a spadají též do rozsahu předkládaného vynálezu.

- 25 Farmaceutické prostředky obsahující sloučeniny podle vynálezu

- V současnosti nejvíce používané nové syntetické ligandy pro estrogenové receptory nemají steroidní charakter a jejich používání jako léčiv v medicíně s sebou přináší celou řadu problémů, jako je například genotoxicita, nízká stabilita ligandů v tělech pacientů, neznámý a potenciálně problematický metabolismus těchto látek a v neposlední řadě též problémy s transportem těchto látek v těle na místo určení. Vzhledem k tomu, že nové ligandy pro estrogenové receptory podle předkládaného vynálezu jsou deriváty estradiolu, lze očekávat podobný farmakologický a toxikologický profil jako u ostatních steroidních hormonů.

- 35 Jak bylo již uvedeno výše (viz Dosavadní stav techniky) ligandy ER mají významné farmakologické účinky. Ligandy podle předloženého vynálezu mohou být proto použity jako léčiva nebo účinné složky léků. Ligandy podle vynálezu mohou být účinnou látkou farmaceutických prostředků vhodných pro hormonální substituční terapii nebo k léčení nemocí, které mohou být léčeny ovlivněním ER, zejména pak ERS, např. nádorových či zánětlivých onemocnění, jak bylo již uvedeno.

- 40 Léčením je přitom míněno podávání léčiva jak pro kurativní tak i profylaktické účely. Ovlivněním ER či působením na ER je míněno to, že sloučenina podle vynálezu může působit jako agonista/antagonista, parciální agonista/antagonista nebo selektivní agonista/antagonista estradiolu.

Předmětem vynálezu je proto též farmaceutická kompozice obsahující jako účinnou látku sloučeninu podle vynálezu.

- 45 Farmaceutické prostředky (kompozice, léčiva, přípravky) podle vynálezu jsou určeny k léčbě rakoviny, např. rakoviny prostaty, rakoviny tlustého střeva, myeloidní a lymfoidní leukemie, k léčení zánětlivých onemocnění, jako např. střevních zánětlivých onemocnění a dalších zánětlivých onemocnění, nebo onemocnění, v nichž zánětlivá reakce hraje důležitou roli, jako je např. trauma/sepse, endometrióza, Alzheimerova choroba nebo revmatoidní artritida, dále k léčení psychiatrických a neurologických onemocnění, jako např. k léčbě deprese, úzkosti, poruch

paměti a procesu učení, léčbě neurodegenerativních onemocnění jako je např. Parkinsonova choroba, dále k léčbě nemocí srdce a oběhového systému, jako např. k léčbě infarktu myokardu, hypertenze. Dále lze sloučeniny podle vynálezu využít jako specifické léčivo, které poskytuje řadu estrogenních účinků a zároveň není uterotrofní a nepodporuje růst prsní epiteliální tkáně ani prsních nádorů.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu obsahují jako účinnou látku sloučeninu podle vynálezu ve farmaceuticky účinném množství. Způsob stanovení farmaceuticky účinného množství je běžným postupem, který je odborníkovi znám.

Ve farmaceutickém přípravku mohou být sloučeniny podle vynálezu přítomny také ve formě farmaceuticky přijatelných solí (netoxických, fyziologicky přijatelných), anorganické či organické povahy. Příkladem vhodných solí je hydrochlorid nebo methansulfonát, přičemž odborník zná a je schopen připravit vhodné soli.

Sloučeniny mohou být ve farmaceutických prostředcích podle vynálezu přítomny rovněž v podobě profarmak.

Farmaceutické prostředky podle vynálezu jsou určeny zejména k léčbě lidí, ale mohou najít uplatnění i při léčbě jiných savců, jako např. hospodářských nebo domácích zvířat.

Farmaceutické přípravky obsahující sloučeniny podle vynálezu, jejich izomery, soli mohou být formulovány pro systémové podávání, např. enterální podávání, jako např. perorální podávání, např. ve formě tablet nebo tobolek, pro rektální podávání, např. ve formě čípků, pro nasální podávání či inhalaci, např. ve formě spreje nebo kapek. Dále mohou být formulovány pro topické nebo lokální podávání, např. ve formě buklálních tablet nebo masti nebo náplasti nebo složitějších transdermálních systémů. Přípravky podle vynálezu mohou být formulovány také pro parenterální podávání, jako např. injekcí (i.v., i.m., s.c.), infúzí nebo pomocí implantovatelného zásobníkového systému. Odborníkovi je zřejmé, že tento výčet není vyčerpávající, a odborník zná další vhodné způsoby.

Účinná látka je ve farmaceutickém přípravku zpravidla společně s pomocnými látkami jako jsou např. plnidla, rozvolňovadla, ředidla, pojidla, emulgátory, pufrý, stabilizující činidla, konzervanty a barviva. Odborníkovi jsou známy pomocné farmaceutické látky a jejich použití při formulaci přípravku.

Sloučenina podle vynálezu může být ve farmaceutickém přípravku také v kombinaci s jinou účinnou látkou, např. s účinnou látkou projevující synergický účinek.

Stanovení dávky účinné látky obsažené v jednotkové lékové formě např. v případě tobolek nebo např. vhodné koncentrace v případě injekčního nebo infúzního roztoku je také běžným postupem odborníkovi známým.

Výše zmíněné znalosti odborníka týkající se farmaceutických přípravků, lékových forem, pomocných látek a pod. jsou shrnuty v odborných příručkách⁵⁹⁻⁶⁰, které jsou odborníkovi snadno dostupné, případně také v Českém lékopisu (ČL 2005, 2007), v Evropském lékopisu (Ph.Eur.) a/nebo lékopisu Spojených států (USP).

Popis obrázků

Na obrázcích jsou použity následující označení/zkratky: ICI 182780 je 13-methyl-7-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-dekahydro-6H-cyklopenta-[a]-fenanthren-3,17-diol a E2 je estradiol.

Obrázek 1: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN202.

Obrázek 2: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN207.

5 Obrázek 3: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN214.

Obrázek 4: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN228.

10 Obrázek 5: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN229.

Obrázek 6: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN232.

Obrázek 7: Závislost transkripční aktivity estrogenového receptoru α a β na koncentraci ligandu PN233.

15 Obrázek 8: Růst buněk MCF-7 v závislosti na koncentraci testovaných látek

Obrázek 9: Růst buněk MCF-7 v přítomnosti 1nM testované látky

Provedení vynálezu je dále demonstrováno na následujících příkladech, které slouží jen pro ilustraci provedení vynálezu a rozsah vynálezu žádným způsobem neomezují.

20

Příklady provedení vynálezu

Obecný způsob přípravy sloučenin podle vynálezu

25 Nové sloučeniny podle vynálezu byly připraveny způsobem podle vynálezu, tj. cyklotrimerizací, jak byla výše popsána. Konkrétně byl použit výhodný způsob, kdy k roztoku 17 α -ethynylestradiolu (0,5 mmol, 150 mg) ve směsi suchého toluenu (6 ml) acetonitrilu (1 ml) byl přidán RhCl(PPh₃)₃ (0,05 mmol, 46 mg) a příslušný diyen obecného vzorce III (0,6 mmol). Reakční směs byla míchána při 20 °C po dobu 48 hodin nebo do úplného zreagování výchozích látek (kontrolováno TLC). Poté byla odpařena rozpouštědla a zbytek byl chromatografován na silikagelu. Tímto způsobem se získala zpravidla bezbarvá látka, která byla dále charakterizována ¹H a ¹³C NMR spektroskopii, infračervenou spektroskopii a hmotovou spektroskopii.

30

Tímto obecným postupem, za použití výchozích látek uvedených níže, byly připraveny následující výhodné sloučeniny:

35

Příklad 1

PN202: 17 α -[2,2-Bis(ethoxykarbonyl)-1,3-dihydro-2H-inden-5-yl]-estradiol

40 17 α -Ethynylestradiol (0,25 mmol, 74 mg), diethyl 2,2-(diprop-2-ynyl)-1,3-propandioát (0,3 mmol, 70,8 mg), RhCl(PPh₃)₃ (0,025 mmol, 23 mg). Po sloupcové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 75 mg (56%) bezbarvé látky.

45 T.t. 164 °C; [α]_D = +35° (c 0,022 g/ml, aceton); ¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ 0,71–0,79 (m, 1H), 0,87 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H), 0,88 (t, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,06 (s, 3H), 1,03–1,12 (m, 1H), 1,29–1,42 (m, 4H), 1,61–1,75 (m, 4H), 1,88–2,00 (m, 2H), 2,18–2,23 (m, 1H), 2,58–2,70 (m, 2H), 3,73–3,85 (m, 4H), 3,91 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 3,92 (q, *J* = 6,8 Hz, 2H), 5,14 (s, 1H), 6,47 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,57 (dd, *J* = 8, 2,8 Hz, 1H), 6,94 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7,04 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7,164 (s, 1H)

signál překryt, 7,37 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6) δ 14,60 (2x), 15,74, 25,05, 27,33, 28,46, 30,62, 34,67, 39,63, 40,46, 41,37, 41,76, 44,20, 47,83, 49,15, 61,66, 62,35(2x), 86,64, 113,73, 116,23, 123,90, 124,49, 127,40, 129,23, 133,05, 138,56, 139,50, 140,19, 146,60, 155,06, 172,47 (2x); IR (ATR ZnSe) v 3398, 2958, 2927, 2870, 1727, 1711, 1610, 1502, 1442, 1283, 1249, 1185, 1068, 1049, 1008 cm^{-1} ; MS (EI) 532 (8), 514 (72), 499 (17), 425 (17), 314 (12), 213 (56), 149 (77); HRMS (EI) vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_6$ 532,282 489, nalezeno 532,283 226.

Příklad 2

PN207: 17α -[2-Acetyl-2-(ethoxykarbonyl)-1,3-dihydro-2H-inden-5-yl]-estradiol.

17α -Ethynelestradiol (0,5 mmol, 150 mg), ethyl 2-acetyl-2-(prop-2-ynyl)pent-4-ynoát (0,6 mmol, 106 mg), $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (0,05 mmol, 46 mg). Po sloupcové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 103 mg (41%) směsi diastereoizomerů jako bezbarvé látky.

T.t. 113 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = +28,7^\circ$ (*c* 0,023 g/ml, aceton); ^1H NMR (400 MHz, C_6D_6) δ 0,58–0,64 (m, 2x1H), 0,96 (s, 3H), 1,05 (s, 3H), 1,22 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,23 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,28–1,39 (m, 2x5H), 1,52–1,74 (m, 2x2H), 1,84–1,93 (m, 2x2H), 1,99–2,07 (m, 2x2H), 2,20 (s, 3H), 2,21 (s, 3H), 2,31–2,39 (m, 2x1H), 2,70–2,80 (m, 2x2H), 3,41–3,51 (m, 2x4H), 4,18 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,19 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,85 (bs, 2x1H), 6,43 (d, *J* = 2,4 Hz, 2x1H), 6,47 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Hz, 2x1H), 6,92 (d, *J* = 8 Hz, 2x1H), 7,12 (d, *J* = 8 Hz, 2x1H), 7,16–7,17 (m, 2x1H), 7,25 (s, 2x1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 14,31, 14,50, 15,57, 15,72, 25,07, 25,08, 26,31, 26,38, 27,36, 27,54, 28,47, 28,72, 30,62, 30,70, 34,71, 34,90, 38,91, 39,65, 39,69, 40,05, 40,12, 40,49 (2x), 41,15, 44,23, 44,81, 47,85, 47,99, 49,18, signál je překryt, 62,27, 62,90, 68,04, 68,34, 86,55, 86,84, 113,62, 113,69, 115,97, 116,19, 123,76, 123,94, 124,53, 127,11, 127,39, 127,59, 128,24, 129,24, 132,54, 133,06, 138,54, 138,72, 139,37, 139,46, 140,09, 140,10, 146,64, 146,75, 155,00, 155,82, 173,15, 173,87, 202,26, 204,79; IR (ATR ZnSe) v 3398, 2955, 2923, 2870, 1711, 1692, 1610, 1502, 1442, 1353, 1283, 1242, 1182, 1154, 1078, 1011 cm^{-1} ; MS (EI) 502 (<1), 314 (10), 213 (16), 149 (40), 43 (100); HRMS (EI) vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_5$ 502,271 125, nalezeno 502,269 356.

Příklad 3

PN214: 17α -(1,3-Dihydro-2H-inden-5-yl)-estradiol

17α -Ethynelestradiol (0,25 mmol, 74 mg), 1,6-heptadiyn (0,3 mmol, 35 μl), $\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$ (0,025 mmol, 23 mg). Po kolonové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 56 mg (58%) bezbarvé látky.

T.t. 226 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}} = +57,2^\circ$ (*c* 0,009 g/ml, aceton); ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 0,50–0,53 (m, 1H), 0,96 (s, 3H), 1,13–1,33 (m, 4H), 1,43–1,49 (m, 2H), 1,64–1,67 (m, 1H), 1,75–1,85 (m, 2H), 1,96–2,06 (m, 4H), 2,16–2,22 (m, 1H), 2,60–2,72 (m, 2H), 2,80–2,87 (m, 4H), 4,93 (s, 1H), 6,396 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,45 (dd, *J* = 8,4, 2,8 Hz, 1H), 6,91 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H), 7,24 (s, 1H), 8,93 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 14,96, 23,82, 25,14, 26,01, 27,19, 29,18, 31,88, 32,44, 33,31, 37,84, 43,10, 46,39 (2x), 47,61, 84,40, 112,59, 114,81, 122,41, 123,45, 125,33, 125,90, 130,40, 137,05, 141,16, 141,96, 145,27, 154,83; IR (CCl_4) v 3609, 3259, 2913, 2869, 2855, 1722, 1612, 1499, 1287, 1249, 1068, 1053, 1029, 1011, 820 cm^{-1} ; MS (EI) 388 (5), 370 (4), 228 (6), 173 (7), 149 (10), 111 (8), 84 (98), 66 (100); HRMS (EI) vypočteno pro $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 388,240 231, nalezeno 388,239 602.

Příklad 4

PN228: 17α -(2,2-Diacetyl-1,3-dihydro-2H-inden-5-yl)-estradiol

17 α -Ethynelestradiol (0,5 mmol, 150 mg), 3,3-(diprop-2-ynyl)-2,4-pentadion (0,6 mmol, 105,6 mg), RhCl(PPh₃)₃ (0,05 mmol, 46 mg). Po kolonové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 119 mg (50%) bezbarvé látky.

5 Bezbarvá tuhá látka. T.t. 158 °C; [α]_D = +40,90 (*c* 0,0055 g/ml, aceton); ¹H NMR (400 MHz, C₆D₆) δ 0,71–0,78 (m, 1H), 1,04 (s, 3H), 1,05–1,19 (m, 1H), 1,30–1,40 (m, 4H), 1,62–1,65 (m, 2H), 1,69 (s, 3H), 1,70 (s, 3H), 1,72–1,77 (m, 2H), 1,90–1,96 (m, 2H), 2,21–2,27 (m, 1H), 2,60–2,70 (m, 2H), 3,22–3,34 (m, 4H), 4,46 (s, 1H), 6,39 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,47 (dd, *J* = 8 Hz, 2,4 Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7,18 (s, 1H) signál překryt, 7,32 (s, 1H);
 10 ¹³C NMR (100 MHz, C₆D₆) δ 15,71, 25,08, 26,60, 26,66, 27,38, 28,50, 30,61, 34,74, 38,01, 38,39, 39,75, 40,52, 44,31, 47,87, 49,20, 75,75, 86,55, 113,69, 116,18, 124,00, 124,59, 127,37, 128,25, 129,24, 133,01, 138,53, 139,30, 140,03, 146,59, 154,96, 204,48 (2x); IR (ATR ZnSe) ν 3427, 2927, 2870, 1692, 1610, 1498, 1359, 1249, 1150 cm⁻¹; MS (EI) 472 (9), 454 (12), 411 (100), 228 (14), 213 (13), 159 (17); HRMS (EI) vypočteno pro C₃₁H₃₆O₄ 472,261 360, nalezeno
 15 472,261 119.

Příklad 5

PN229: 17 α -(1,3-Dihydro-2-tosyl-2H-indol-5-yl)-estradiol

20

17 α -Ethynelestradiol (0,5 mmol, 150 mg), *N,N*-di(prop-2-ynyl)-4-methylbenzensulfonylamid (0,6 mmol, 148 mg), RhCl(PPh₃)₃ (0,05 mmol, 46 mg). Po sloupcové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno (27%) bezbarvé látky.

25

T.t. 178 °C; [α]_D = +18,20 (*c* 0,00825 g/ml, aceton); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0,42–0,47 (m, 1H), 1,02 (s, 3H), 1,14–1,37 (m, 5H), 1,45–1,67 (m, 3H), 1,83–1,95 (m, 3H), 2,27–2,40 (m, 1H), 2,31 (s, 3H), 2,62–2,73 (m, 2H), 4,56–4,60 (m, 4H), 6,41 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 6,46 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 6,87 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 8 Hz, 1H), 7,23–7,32 (m, 2H), 7,72–7,75 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 15,51, 21,46, 24,99, 27,41, 28,67, 30,64, 34,87, 38,86, 41,08, 44,76, 48,02, 54,67, 54,97, 55,68, 86,72, 113,60, 115,98, 122,16, 122,82, 127,10, 128,47, 128,74 (2x), 130,93 (2x), 132,40, 134,74, 135,59, 136,31, 138,71, 145,35, 147,93, 155,86; IR (ATR ZnSe) ν 3452, 3281, 2927, 2870, 1613, 1502, 1347, 1166, 1099, 818, 666 cm⁻¹; MS (FAB) C₃₃H₃₇NO₄S molekulový peak je příliš slabý pro HRMS, FAB+ 544 (25), 526 (23), 456 (23), 443 (27), 401 (31), 339 (44), 211 (57), 165 (71), 91 (100).

35

Příklad 6

PN232: 17 α -(1,3-Dihydroisobenzofuran-5-yl)-estradiol

40

17 α -Ethynelestradiol (0,5 mmol, 150 mg), dipropargylether (0,6 mmol, 62 μ l), RhCl(PPh₃)₃ (0,05 mmol, 46 mg). Po kolonové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 28 mg (14%) bezbarvé látky.

45

T.t. 195 °C; [α]_D = +44,8° (*c* 0,0125 g/ml, aceton); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0,54–0,64 (m, 1H), 1,07 (s, 3H), 1,21–1,54 (m, 4H), 1,55–1,80 (m, 3H), 1,89–2,07 (m, 3H), 2,15–2,22 (m, 1H), 2,34–2,39 (m, 1H), 2,71–2,77 (m, 2H), 5,07 (m, 4H), 6,43 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,47 (dd, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,93 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,30 (s, 1H), 7,32 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 15,56, 25,05, 27,53, 28,74, 30,69, 34,94, 38,98, 41,16, 44,86, 48,06, 55,68, 74,20, 74,45, 86,87, 113,63, 115,98, 120,47, 121,18, 127,09, 128,11, 132,50, 138,38, 138,73, 139,10, 147,42, 155,86; IR (ATR ZnSe) ν 3417, 2930, 2866, 1723, 1613, 1502, 1287, 1252, 1027 cm⁻¹; MS (EI) 390 (2), 372 (3), 357 (2), 314 (7), 213 (20), 149 (50), 57 (63), 43 (100); HRMS (EI) vypočteno pro C₂₆H₃₀O₃ 390,219 495, nalezeno 390,217 671.

50

Příklad 7

PN233: 17 α -[2-Kyano-2-(ethoxykarbonyl)-1,3-dihydro-2H-inden-5-yl]-estradiol

5 17 α -Ethynelestradiol (0,5 mmol, 150 mg), ethyl 2-kyano-2-(prop-2-ynyl)pent-4-ynoát (0,6 mmol, 114 mg), RhCl(PPh₃)₃ (0,05 mmol, 46 mg). Po kolonové chromatografii na silikagelu (2/1 hexan/EtOAc) bylo získáno 110 mg (45%) směsi diastereoizomerů jako bezbarvé látky.

T.t. 138 °C; [α]_D = +21,4° (c 0,0055 g/ml, aceton); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 0,58–0,67 (m, 2x1H), 0,97 (s, 3H), 1,08 (s, 3H), 1,31 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,32 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,34–1,48 (m, 2x4H), 1,55–1,78 (m, 2x3H), 1,81–1,99 (m, 2x2H), 2,12–2,28 (m, 2x2H), 2,07 (s, 1H), 2,24 (s, 1H), 2,32–2,41 (m, 2x1H), 2,74–2,79 (m, 2x2H), 3,52–3,74 (m, 2x4H), 4,28 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,30 (q, *J* = 7,2 Hz, 2H), 4,85 (bs, 2x1H), 6,44 (d, *J* = 2,8 Hz, 1H), 6,47 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 6,48 (dd, *J* = 8,4, 2,8 Hz, 1H), 6,51 (dd, *J* = 8,4, 2,8 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,06–7,12 (m, 2H), 7,21–7,35 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 14,24, 14,54, 14,71, 15,54, 24,57 (2x), 27,60, 28,59, 28,74, 28,79 (2x), 30,73 (2x), 34,94 (2x), 35,68 (2x), 38,96 (2x), 40,86, 41,21, 43,89, 44,24 (2x), 44,88, 44,92 (2x), 46,45 (2x), 48,06, 64,15 (2x), 86,79,86,84,92,02 (2x), 113,66, 113,72, 115,98, 116,05, 121,90 (2x), 123,96, 124,72, 124,82, 127,11 (2x), 128,27, 128,40, 132,30, 132,52, 138,00 (2x), 138,68, 138,74, 138,79, 147,77 (2x), 155,88, 155,98, 169,92 (2x); IR (ATR ZnSe) ν 3376, 2927, 2866, 2249, 1736, 1727, 1499, 1442, 1283, 1226, 1059, 1011, 818 cm⁻¹; HRMS (FAB) vypočteno pro C₃₁H₃₅NO₄ 485,256 609, nalezeno 485,258 821.

25 Příklady 8 až 12

Další sloučeniny podle vynálezu

Způsobem podle vynálezu se připraví rovněž sloučeniny uvedené v následujícím přehledu:

Příklad č.	X	R ⁴	R ⁵	m.h.
8	CH ₂	H	Me	402,57
9	C(COOEt) ₂	H	Me	546,69
10	O	H	Me	404,54
11	C(Me) ₂	H	H	416,59
12	C(Me) ₂	H	Me	430,62

30 Příklad 13

Testování selektivity a účinnosti vybraných nových ligandů v *in vitro* reportérových studiích

Aktivita některých vybraných nových ligandů pro estrogenové receptory byla testována v reportérových studiích na tkáňových kulturách s COS-7 buňkami. Reportérové studie jsou vhodnějším typem experimentu než běžné vazebné studie, protože v případě estrogenových receptorů se vysoká afinita ligandu k receptoru vždy nutně neprojevuje vysokou aktivitou receptoru jako transkripčního faktoru po navázání ligandu, COS-7 buněčná linie poskytuje významnou výhodu pro tento typ experimentu, jelikož neexprimuje endogenní ER α ani ER β a je proto vhodná pro testování selektivity ligandů. Kromě toho byly tyto látky testovány také v reportérových studiích na tkáňových kulturách s HEK293 buňkami.

Buňky COS-7 byly transfekovány expresním vektorem kódujícím ER α nebo ER β a reportérovým vektorem obsahujícím jeden estrogenový responsivní element následovaný minimálním promotorem tymidin kinázy z herpes simplex viru. Jako reportérový gen byla použita luciferáza. Buňky byly po transfekci vysety na bílé 96jamkové kultivační destičky a byly dále kultivovány v médiu DMEM bez fenolové červeně obsahujícím 2mM glutamin, 20mM HEPES, pH 7,5, 5 μ g/ml inzulin, 5 μ g/ml lidský transferin, 100 μ g/ml hovězí sérový albumin (BSA). 24 h po transfekci byly k buňkám přidány testované látky připravené v různých koncentracích sériovým ředěním v DMSO a po dalších 24 h byla pomocí komerčního kitu Steady-Glo[®] Luciferase Assay Kit (Promega) stanovena aktivita luciferázy podle přiloženého návodu. Luminiscence byla změřena pomocí kombinovaného spektrofotometru EnVision[™] (PerkinElmer) s 1s integrací signálu. Data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism a pomocí regresní funkce (dose response, variable slope) byly stanoveny hodnoty EC50, které ukazuje tabulka 1. Selektivita ligandu pro daný receptor byla vypočítána jako podíl relativních aktivit ER α a ER β pro daný ligand. Hodnoty selektivity jsou uvedeny v tabulce 2 a závislosti transkripčních aktivit na koncentracích ligandů jsou znázorněny na obrázcích 1–7.

Tabulka 1: EC50 [nM] testovaných ligandů v reportérových studiích

Ligand	ER α	ER β
E2	0,66	1,80
PN202	3,85	19,30
PN207	2,49	14,50
PN214	21,10	1,08
PN228	18,97	60,39
PN229	5,37	62,71
PN232	5,14	12,09
PN233	0,80	12,79

Tabulka 2: Selektivita ligandů pro ER α a ER β v reportérových studiích

Ligand	ER α	ER β
E2	1,00	1,00
PN202	1,83	0,55
PN207	2,13	0,47
PN214	0,02	53,44
PN228	1,16	0,86
PN229	4,27	0,23
PN232	0,86	1,16
PN233	5,87	0,17

Z naměřených hodnot EC50 je patrné, že nové látky jsou vysoce účinné ligandy obou estrogenových receptorů a jejich účinnost je srovnatelná nebo velice podobná estradiolu. To je důležitá vlastnost, protože takové látky jsou účinné v nízkých koncentracích a jejich aplikace není spojená s vedlejšími účinky jako je např. nespecifická vazba a stimulace ostatních členů rodiny jaderných receptorů, interference s metabolismem steroidních látek nebo obecná toxicita látek v těle. Jako výhodné ligandy se jeví látky PN202, PN207, PN214, PN229, PN232 a PN233 a jako nejvýhodnější ligandy se pak jeví látky PN214 a PN233.

Kromě toho vykazují nové látky různou selektivitu vůči jednomu z estrogenových receptorů. Zde se jako výhodné selektivní ligandy jeví látky PN229 a PN233 pro ER α a látka PN214 pro ER β . Jako nejvýhodnější selektivní ligand se jeví látka PN214 pro ER β a selektivita tohoto ligandu je srovnatelná s nejlepšími známými selektivními ligandy pro tento receptor.

15 Příklad 14

Testování aktivity vybraných nových ligandů v proliferačních studiích.

Buněčná linie MCF-7 byla odvozena z adenokarcinomu prsu a vzhledem ke své proliferační závislosti na estrogenu je vhodná pro testování estrogenních vlastností chemických látek. Buňky MCF-7 exprimují pouze ER α a proto je proliferativní účinek testovaných látek zprostředkován hlavně tímto receptorem.

Buňky MCF-7 byly kultivovány 6 dní v médiu DMEM bez fenolové červeně obsahujícím 8% fetální telecí sérum zbavené steroidních látek na aktivním uhlí a 2mM glutamin. Po této době buňky přestaly proliferovat a do média byly přidány různé koncentrace testovaných látek v DMSO. Buňky byly dále kultivovány ve výše popsaném médiu v přítomnosti testovaných látek a po 3 dnech jim bylo vyměněno médium a znovu byly do média přidány testované látky v DMSO. Po dalších 3 dnech bylo v kultuře stanoveno množství živých buněk za pomoci kitu CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (promega) podle přiloženého návodu. Fluorescenční měření bylo provedeno pomocí kombinovaného spektrofotometru EnVision[™] (PerkinElmer) a data z měření jsou uvedena na obrázku 8 a 9.

Z naměřených dat je patrný toxický efekt vysokých koncentrací (1–10 μ M) přirozeného ligandu estradiolu jakož i nově připravených látek. Naopak v oblasti koncentrací od 0,5nM do 100nM, tedy v oblasti nízkých koncentrací, v nichž se estradiol vyskytuje v živém těle, podporují nově připravené látky proliferaci MCF-7 buněk, v koncentračním rozsahu 10 až 100nM je proliferativní účinek všech testovaných látek srovnatelný s estradiolem. V koncentraci 1nM je proliferativní účinek látky PN202 srovnatelný s estradiolem zatímco látka PN214 je v této koncentraci neaktivní. Toto zjištění je v souladu s daty z reportérových studií, kde je 1nM PN214 selektivní pro ER β a v této koncentraci ER α nestimuluje. Jak bylo výše uvedeno, proliferativní účinek vyvolaný estrogeny na buňkách MCF-7 je zprostředkován hlavně ER α a nízká proliferace buněk MCF-7 v přítomnosti 1nm PN214 podporuje pozorování, že je tato látka vysoce selektivním ligandem.

Obsah všech citovaných publikací, jejichž seznam je uveden dále, je v celém rozsahu zahrnut v předložené přihlášce formou odkazu.

Citovaná patentová literatura

- GB 2 361 642 A
- 50 – WO 00/53620
- WO 05/048956
- WO 05/099704

- WO 2006/013196
- US 2007/0135400 A1
- EP 1131336

5 Cítovaná nepatentová literatura

1. Greene, G.L. et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1 150–4 (1986).
2. Green, S. et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to verb-A. *Nature* 320, 134–9 (1986).
- 10 3. Lubahn, D.B. et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl. Acad Sci USA* 90, 11 162–6 (1993).
4. Hewitt, S.C. & Korach, K.S. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 125, 143–9 (2003).
- 15 5. Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5 925–30 (1996).
6. Gustafsson, J.A. Estrogen receptor beta—a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163, 379–83 (1999).
- 20 7. Ogawa, S. et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 122–6 (1998).
8. Meyers, M.J. et al. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem* 44, 4 230–51 (2001).
- 25 9. Malamas, M.S. et al. Design and synthesis of aryl diphenolic azoles as potent and selective estrogen receptor-beta ligands. *J Med Chem* 47, 5 021–40 (2004).
10. Mewshaw, R.E. et al. ERbeta ligands. 3. Exploiting two binding orientations of the 2-phenylnaphthalene scaffold to achieve ERbeta selectivity. *J Med Chem* 48, 3 953–79 (2005).
- 30 11. Hillisch, A. et al. Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selectiveligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 18, 1 599–609 (2004).
12. Couse, J.F. & Korach, K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20, 358–417 (1999).
- 35 13. Gustafsson, J.A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 24, 479–85 (2003).
14. Harris, H.A. Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 21, 1–13 (2007).
- 40 15. Koehler, K.F., Helguero, L.A., Haldosen, L.A., Warner, M. & Gustafsson, J.A. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* 26, 465–78 (2005).
16. Palmieri, C. et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Concer* 9, 1–13 (2002).

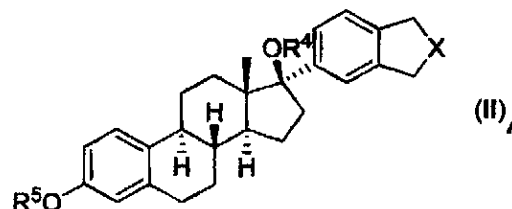
17. Mann, S. et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 32, 113–8 (2001).
18. Omoto, Y. et al. Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett* 163, 207–12 (2001).
- 5 19. Weihua, Z. et al. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6 330–5 (2001).
20. Imamov, O. et al. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 9 375–80 (2004).
- 10 21. Neubauer, B.L. et al. The selective estrogen receptor modulator trioxifene (LY133314) inhibits metastasis and extends survival in the PAIII rat prostatic carcinoma model. *Cancer Res* 63, 6 056–62 (2003).
22. Pearce, S.T & Jordan, V.C. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 50, 3–22 (2004).
- 15 23. Korte, T. et al. Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction. *Circulation* 111, 2 282–90 (2005).
24. Pelzer, T. et al. Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation* 111, 1 492–8 (2005).
- 20 25. Zhu, Y. et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295, 505–8 (2002).
26. Skavdahl, M. et al. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H469–76 (2005).
- 25 27. Shughrue, P.J., Lane, M.V. & Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388, 507–25 (1997).
28. Gundlah, C. et al. Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biol Psychiatry* 57, 938–42 (2005).
- 30 29. Walf, A.A., Rhodes, M.E. & Frye, C.A. Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 78, 523–9 (2004).
- 30 30. Shively, C.A., Mirkes, S.J., Lu, N.Z., Henderson, J.A. & Bethea, C.L. Soy and social stress affect serotonin neurotransmission in primates. *Pharmacogenomics J* 3, 114–21 (2003).
- 35 31. Rocha, B.A., Fleischer, R., Schaeffer, J.M., Rohrer, S.P. & Hickey, G.J. 17 Beta-estradiol-induced antidepressant-like effect in the forced swim test is absent in estrogen receptor-beta knockout (BERKO) mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179, 637–43 (2005).
32. Krezel, W., Dupont, S., Krust, A., Chambon, P. & Chapman, P.F. Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor beta -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12 278–82 (2001).
- 40 33. Imwalle, D.B., Gustafsson, J.A. & Rissman, E.F. Lack of functional estrogen receptor beta influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol Behav* 84, 157–63 (2005).

34. Walf, A.A. & Frye, C.A. ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* 30, 1 598–609 (2005).
- 5 35. Lund, T.D., Rovis, T., Chung, W.C. & Handa, R.J. Novel actions of estrogen receptor-beta on anxiety-related behaviors. *Endocrinology* 146, 797–807 (2005).
36. Day, M., Sung, A., Logue, S., Bowlby, M. & Arias, R. Beta estrogen receptor knockout (BERKO) mice present attenuated hippocampal CA1 long-term potentiation and related memory deficits in contextual fear conditioning. *Behav Brain Res* 164, 128–31 (2005).
- 10 37. Wang, L., Andersson, S., Warner, M. & Gustafsson, J.A. Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2 792–6 (2001).
38. Wang, L., Andersson, S., Warner, M. & Gustafsson, J.A. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 703–8 (2003).
- 15 39. Taurog, J.D. et al. Inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *Immunol Rev* 169, 209–23 (1999).
40. Harris, HA et al. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 144, 4 241–9 (2003).
41. Chadwick, C.C. et al. Identification of pathway-selective estrogen receptor ligands that inhibit NF-kappaB transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2 543–8 (2005).
- 20 42. Cristofaro, P.A. et al. WAY-202196, a selective estrogen receptor-beta agonist, protects against death in experimental septic shock. *Crit Care Med* 34, 2 188–93 (2006).
43. Harris, HA, Bruner-Tran, K.L., Zhang, X., Osteen, K.G. & Lyttle, C.R. A selective estrogen receptor-beta agonist causes lesion regression in an experimentally induced model of endometriosis. *Hum Reprod* 20, 936–41 (2005).
- 25 44. Cvorovic, A. et al. Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of pro-inflammatory genes. *J Immunol* 180, 630–6 (2008).
45. Follettie, M.T. et al. Organ messenger ribonucleic acid and plasma proteome changes in the adjuvant-induced arthritis model: responses to disease induction and therapy with the estrogen receptor-beta selective agonist ERB-041. *Endocrinology* 147, 714–23 (2006).
- 30 46. Shim, G.J. et al. Disruption of the estrogen receptor beta gene in mice causes myeloproliferative disease resembling chronic myeloid leukemia with lymphoid blast crisis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6 694–9 (2003).
47. Imamov, O., Shim, G.J., Warner, M. & Gustafsson, J.A. Estrogen receptor beta in health and disease. *Biol Reprod* 73, 866–71 (2005).
- 35 48. Witte, D., Chirala, M., Younes, A., Li, Y. & Younes, M. Estrogen receptor beta is expressed in human colorectal adenocarcinoma. *Hum Pathol* 32, 940–4 (2001).
49. Foley, E.F., Jazaeri, A.A., Shupnik, MA, Jazaeri, O. & Rice, L.W. Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res* 60, 245–8 (2000).
- 40 50. Hulley, S. et al. Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 288, 58–66 (2002).
51. Grodstein, F., Newcomb, P.A. & Stampfer, M.J. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 106, 574–82 (1999).

52. Campbell–Thompson, M., Lynch, U. & Bhardwaj, B. Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61, 632–40 (2001).
53. Peters, R.H., Crowe, O.F., Avery, MA, Chong, W.K. & Tanabe, M. 11 beta–nitrate estrane analogues: potent estrogens. *J Med Chem* 32, 2 306–10 (1989).
54. Jaouen, G. & Vessiers, A. in Eur. Pat. Appl. (1989).
55. Foy, N., Stéphan, E. & Jaouen, G. Soft cleavage of THP protected estradiols mediated by TMSI. *Journal of Chemical Research (Synopses)* 2001, 518–519 (2001).
56. Stéphan, E., Affergan, T., Weber, P. & Jaouen, G. *Tetrahedron Lett.* 39, 9 427–9 430 (1998).
57. Foy, N., Stéphan, E. & Jaouen, G. *Tetrahedron Lett.* 41, 8 089–8 092 (2000).
58. Foy, N. et al. Synthesis, receptor binding, molecular modeling, and proliferative assays of a series of 17alpha–arylestradiols. *Chembiochem* 4, 494–503 (2003).
59. Gennaro, A.R. et al. Remington: The Science and Practice in Pharmacy. 20. vydání. Lippincot Williams & Wilkins, Baltimore, MO, 2000.
60. Chalabala, M. et al. Technologie Léků. Galén, Praha, 2001.
61. Kibbe, A.H. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Pharmaceutical Press, London, 2000.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Steroidní sloučenina obecného vzorce II



kde

X je atom C nebo heteroatom vybraný ze skupiny sestávající z atomů N, O, kterýžto atom popřípadě nese jeden nebo dva substituenty nezávisle vybrané ze skupiny sestávající z C₁–C₈–alkylové skupiny, C₆–C₁₄–arylové skupiny, karboxylové skupiny, esterifikované karboxylové skupiny vzorce –C(O)OR, kde R je C₁–C₈–alkyl nebo C₆–C₁₄–aryl, hydrogenkarbonylové skupiny, alkylkarbonylové skupiny obsahující 1 až 8 atomů uhlíku v alkylové části a nitrilové skupiny, přičemž případné neobsazené vazby atomu X nesou atom(y) H,

nebo X je p–toluensulfoamid skupina,

R⁴ je H nebo C₁–C₈–alkyl,

R⁵ je H, C₁–C₈–alkyl, C₆–C₁₄–aryl nebo skupina –C(O)R, kde R je C₁–C₈–alkyl nebo C₆–C₁₄–aryl,

a její izomerní formy, jejich soli a jejich solváty.

2. Steroidní sloučenina podle nároku 1 obecného vzorce II, kde

X je atom C nebo heteroatom vybraný ze skupiny sestávající z atomů N, O, kterýžto atom popřípadě nese jeden nebo dva substituenty nezávisle vybrané ze skupiny sestávající z H, COO–ethyl, CO–methyl, CN, přičemž případné neobsazené vazby atomu X nesou atom(y) H,

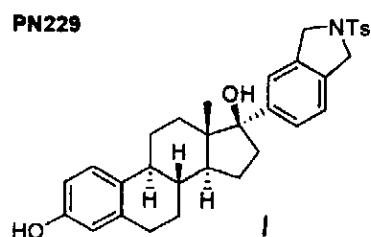
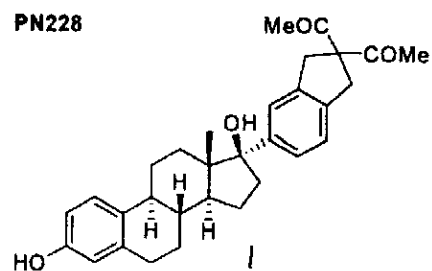
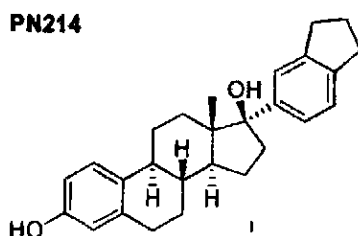
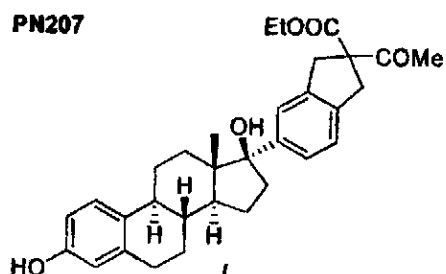
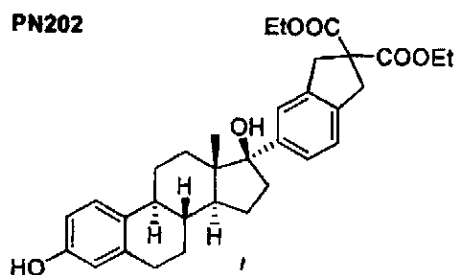
nebo X je p-toluensulfoamidogrupina,

R^4 je H nebo C_1-C_8 -alkyl,

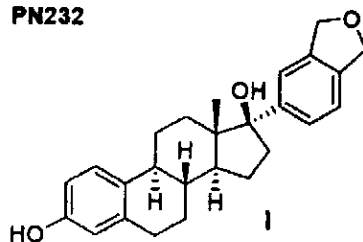
R^5 je H, C_1-C_4 -alkyl, C_6-C_{14} -aryl nebo acyl vzorce $-C(O)R$, kde R je H, C_1-C_8 -alkyl nebo C_6-C_{14} -aryl,

5 a její izomerní formy, jejich soli a jejich solváty.

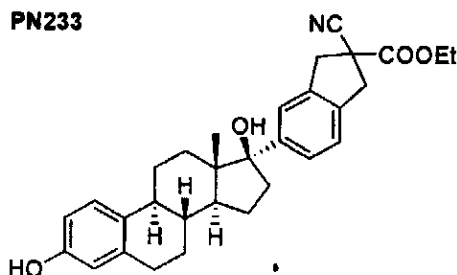
3. Steroidní sloučenina podle nároku 1 vybraná z následujících sloučenin



PN232

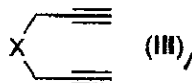


PN233



kde Et znamená ethyl, Me znamená methyl a NTs znamená p-toluensulfoamidorskupinu.

4. Steroidní sloučenina podle nároku 3 vybraná ze sloučenin vzorců PN214, PN229 a PN233
 5 uvedených v nároku 3.
5. Způsob přípravy steroidní sloučeniny podle libovolného z nároků 1 až 4, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že zahrnuje krok, při němž se cyklotrimerizuje ethynylestradiol v organickém rozpouštědle s diynem obecného vzorce III



10

ve kterém má X významy uvedené v příslušném z nároků 1 až 4, za přidání katalyzátoru v podobě komplexu přechodného kovu, a případně další kroky, při nichž se odstraní rozpouštědlo a produkt se přečistí.

6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že jako ethynylestradiol se použije 17 α -ethynylestradiol, a/nebo jako organické rozpouštědlo se použije rozpouštědlo vybrané z toluenu, benzenu, THF, dichlormethanu, acetonitrilu nebo jejich směsí, výhodněji toluen nebo acetonitril, nejvýhodněji směs suchého toluenu a acetonitrilu, a/nebo
- 20 jako katalyzátor se použije katalyzátor vybraný z komplexů přechodných kovů, výhodně Ru, Rh, Co, Ni, nebo jejich kombinací, výhodněji Ni(cod)₂/PPh₃ nebo RhCl(PPh₃)₃, nejvýhodněji RhCl(PPh₃)₃.
7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že
- 25 vzájemný výhodný molární poměr ethynylestradiolu a diynů vzorce III je 2:1 až 1:5, výhodněji 1:1 až 1:2, nejvýhodněji 1:1,2, a/nebo reakce se provádí za míchání, výhodně při teplotě 15 až 100 °C, výhodněji při teplotě 15 až 60 °C, nejvýhodněji při 20 °C, a/nebo

reakce se provádí po dobu 8 až 72 hodin, výhodněji po dobu 24 až 48 hodin, nejvýhodněji do úplného zreagování výchozích látek.

5

8. Steroidní sloučenina podle libovolného z nároků 1 až 4 pro použití jako léčivo.

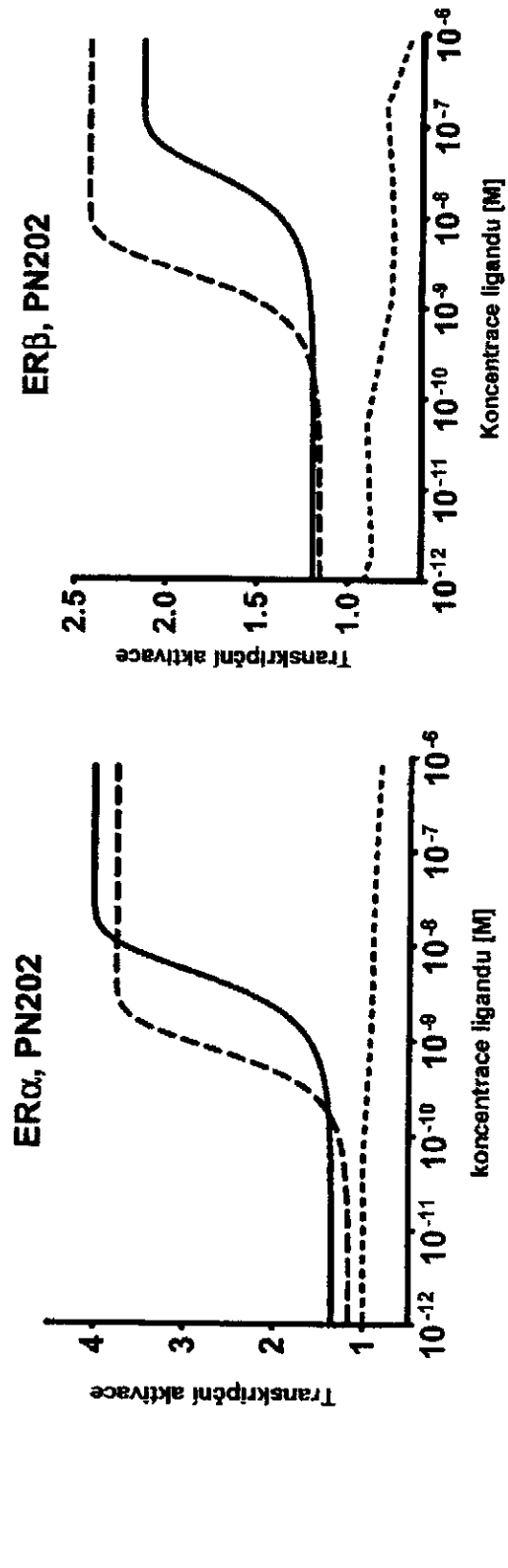
9. Farmaceutická kompozice vyznačující se tím, že obsahuje steroidní sloučeninu podle libovolného z nároků 1 až 4 a případně farmaceuticky přijatelné pomocné látky.

10

10. Použití steroidní sloučeniny podle libovolného z nároků 1 až 4 pro výrobu léku.

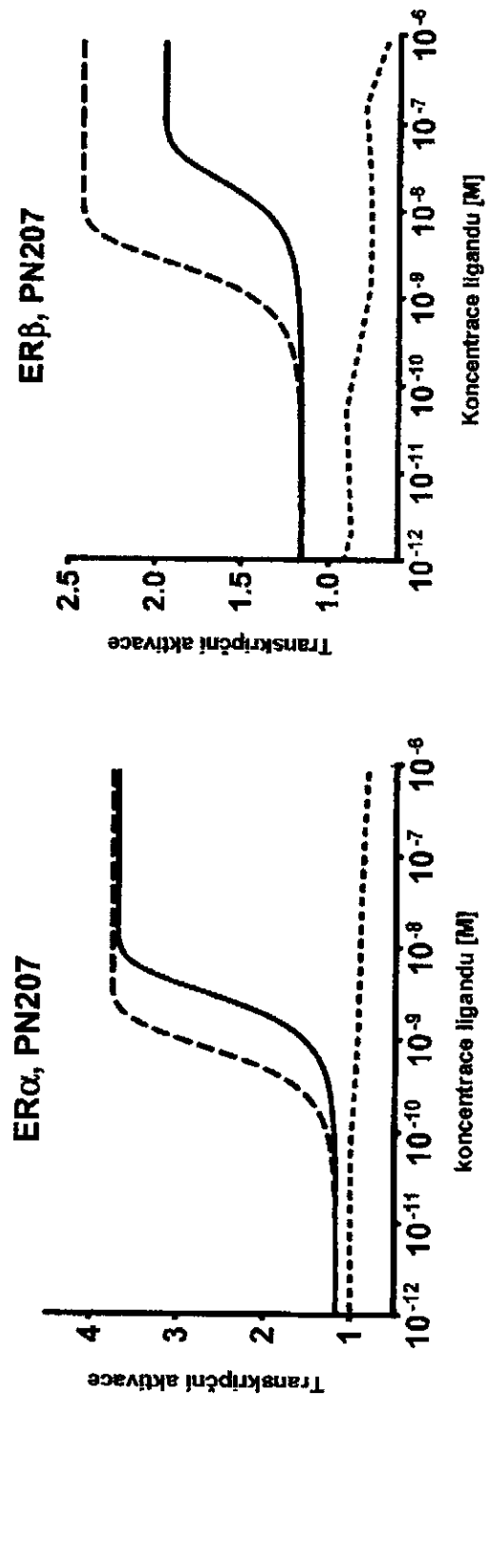
9 výkresů

Obr. 1



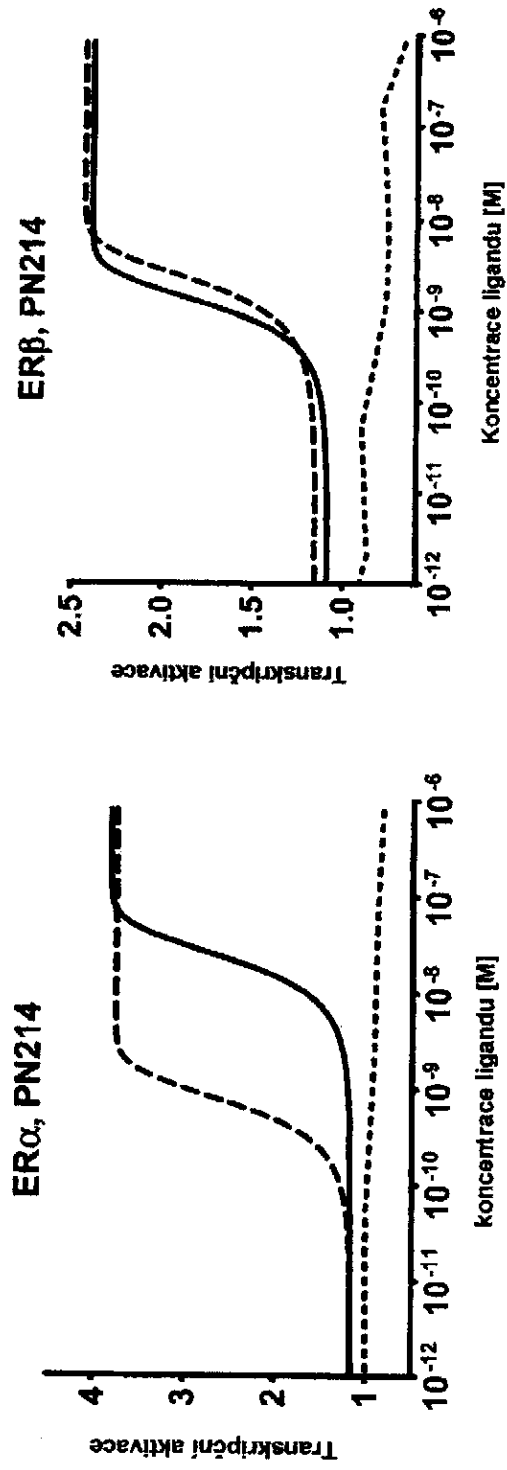
- PN202
- E2
- ICI 182780

Obr. 2



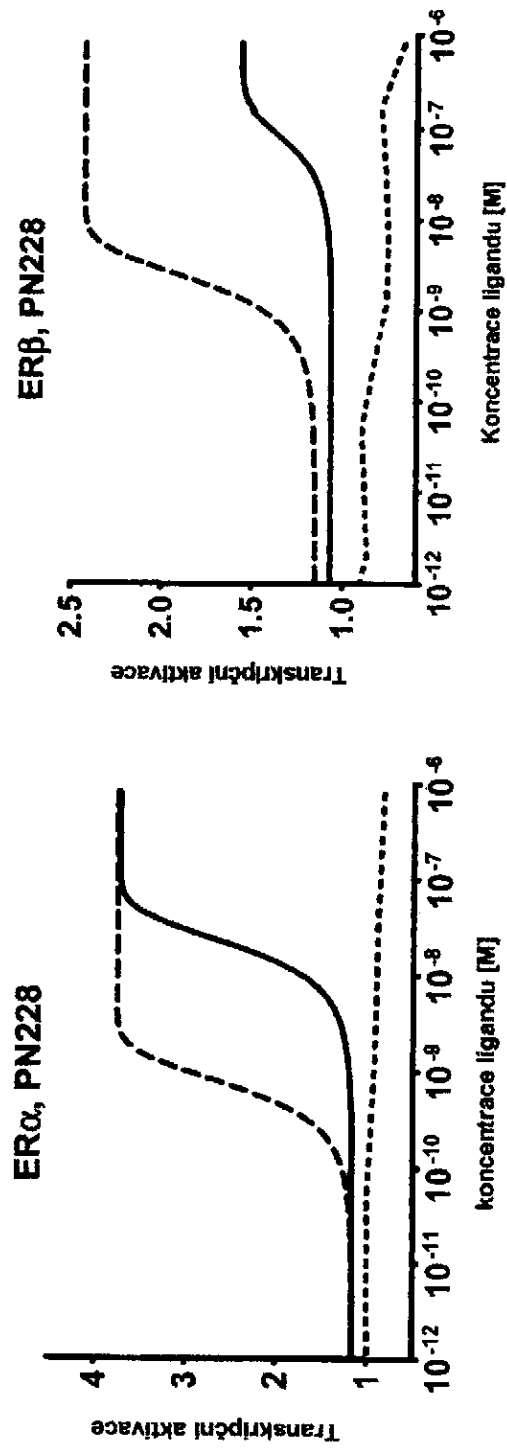
- PN207
- E2
- ICI 182780

Obr. 3



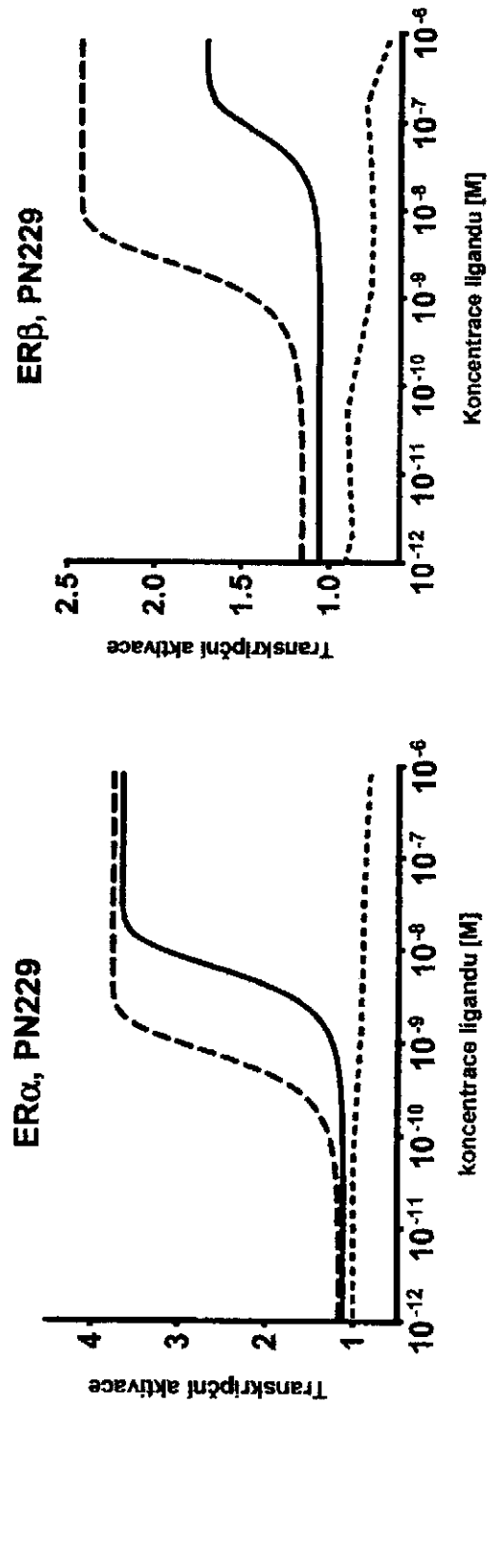
- PN214
- - - E2
- ICI 182780

Obr. 4



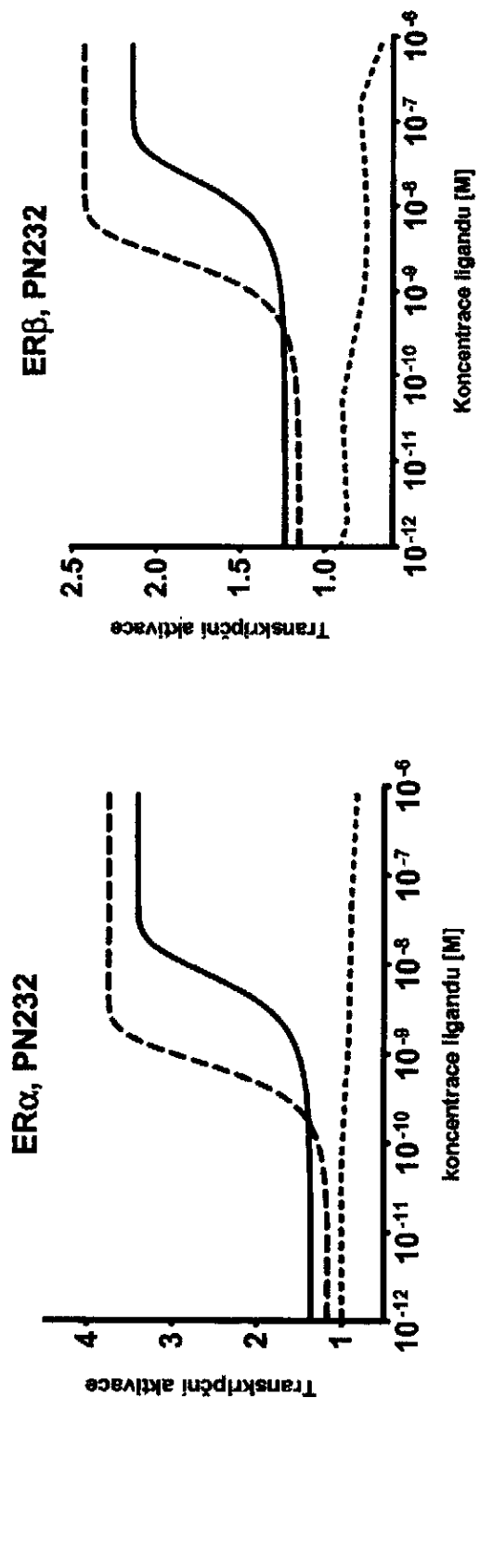
- PN228
- - - E2
- ICI 182780

Obr. 5



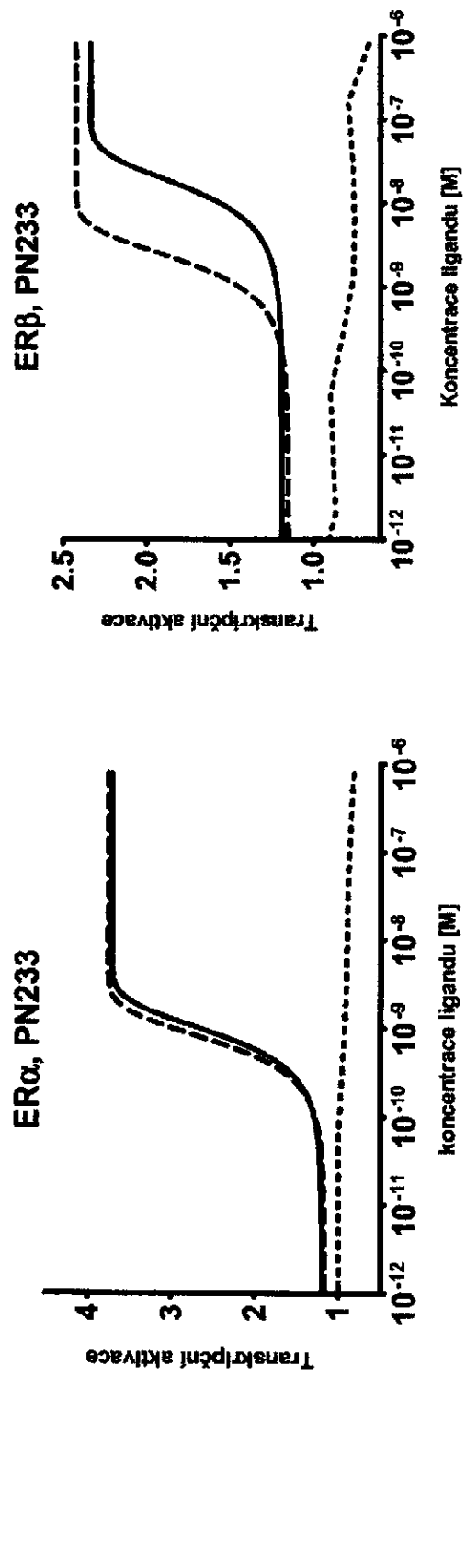
- PN229
- - - E2
- ICI 182780

Obr. 6



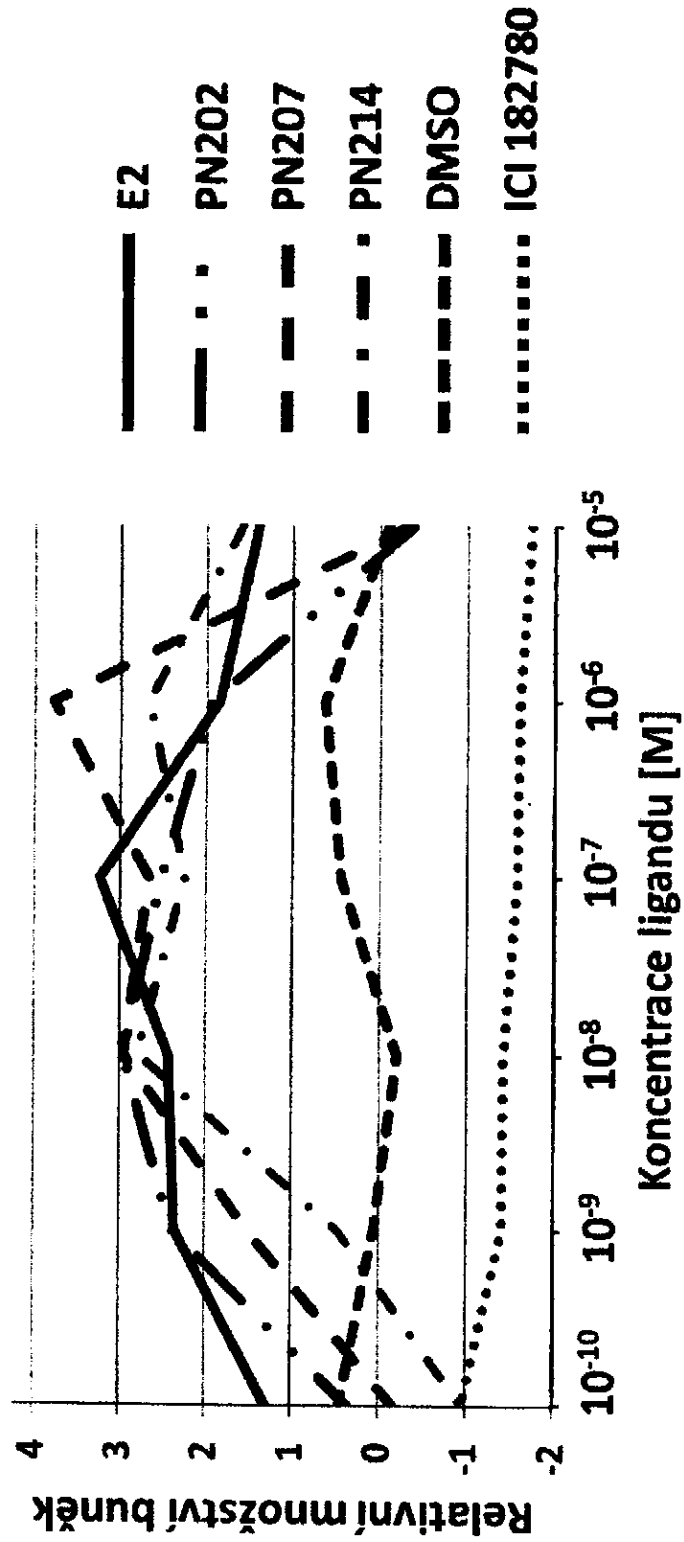
- PN232
- E2
- ICI 182780

Obr. 7

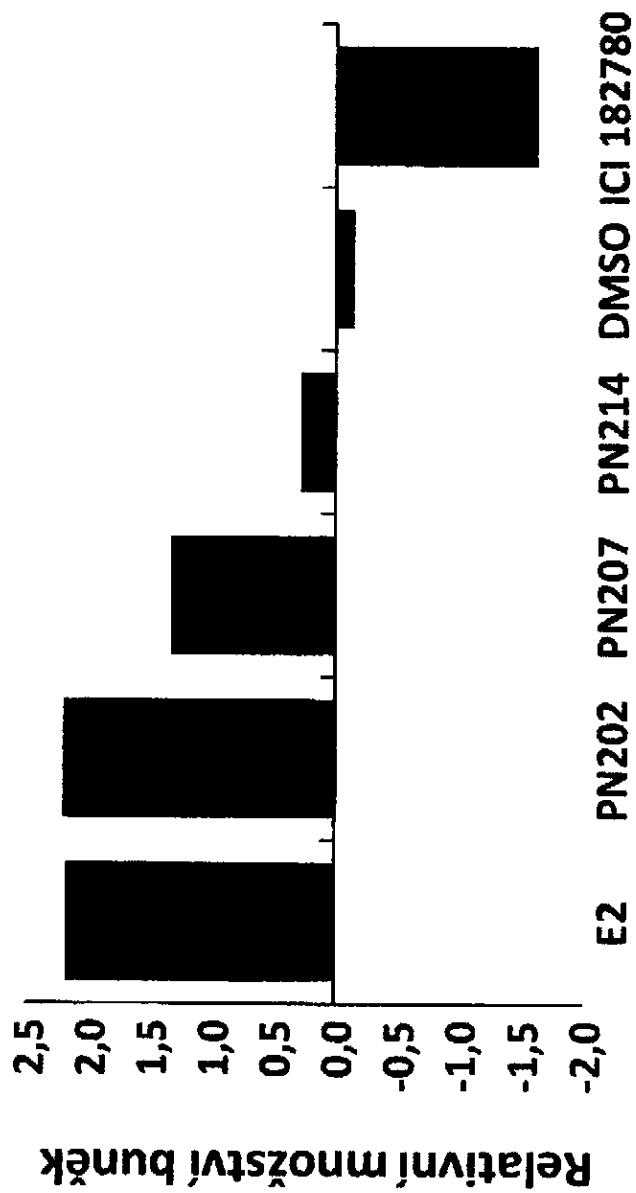


- PN233
- E2
- CI 182780

Obr. 8



Obr. 9



Konec dokumentu