

(19)



REPUBLIKA SLOVENIJA
Urad RS za intelektualno lastnino

(10) SI 9210065 A

(12)

PATENT

(21) Številka prijave: 9210065

(51) MPK⁸: C07J 5/00, A61K 31/57

(22) Datum prijave: 22.01.1992

(60) Prijava pri ZPP: YU 65/92, 22.01.1992

(30) Prednost: 04.02.1991 SE 9100341

(45) Datum objave: 28.02.1995

(72) Izumitelj: ANDERSSON PAUL HAKAN, S-24017 Soedra Sandby, SE;
AXELSSON BENGT INGEMAR, S-24013 Genarp, SE;
BRATTSAND RALPH LENNART, S-22367 Lund, SE;
THALEN ARNE BROR, S-23700 Bjaerred, SE

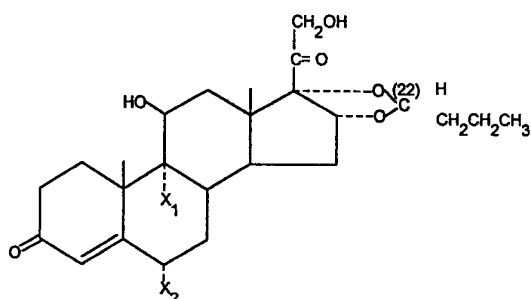
(73) Nosilec: AKTIEBOLAGET ASTRA, S-151 85 Soedertaelje, SE

(74) Zastopnik: PATENTNA PISARNA D.O.O., Čopova 14 p.p. 322, 61000 Ljubljana, SI

(54) NOVE ANTIINFLAMATORNO IN ANTIALERGIJSKO AKTIVNE SPOJINE, GLUKOKORTIKOSTEROIDI TER POSTOPKI ZA NJIHOVO PRIPRAVO

(57) Spojina s splošno formulo

v obliki 22R ali 22S epimera, kjer sta X₁ in X₂ enaka ali različna in vsak predstavlja vodikov ali fluorov atom, vendar X₁ in X₂ nista naenkrat vodikova atoma; postopki za njihovo pripravo, farmacevtski preparati, ki jih vsebujejo in sporaba spojin pri zdravljenju inflamatornih in alergijskih stanj.



SI 9210065 A

NOVE ANTIINFLAMATORNO IN ANTIALERGIJSKO AKTIVNE SPOJINE,
GLUKOKORTIKOSTEROIDI
TER POSTOPKI ZA NJIHOVO PRIPRAVO

Področje izuma

Predstavljeni izum se nanaša na nove antiinflamatorno in antialergijsko aktivne spojine ter na postopke za njihovo pripravo. Izum se prav tako nanaša na farmacevtske sestavke, ki vsebujejo spojine in na metode za farmakološko uporabo spojin.

Cilj izuma je zagotoviti antiinflamatorni, imunosupresivni in antialergijski glukokortikosteroid ali njegov farmacevtski sestavek z visoko aktivnostjo na mestu aplikacije, npr. v respiratornem traktu, na koži, v intestinalnem traktu, v sklepkih ali očesu, z usmerjanjem zdravila na omejeno ciljno področje, na ta način induciramo nizke glukokortikoidne sistemske učinke.

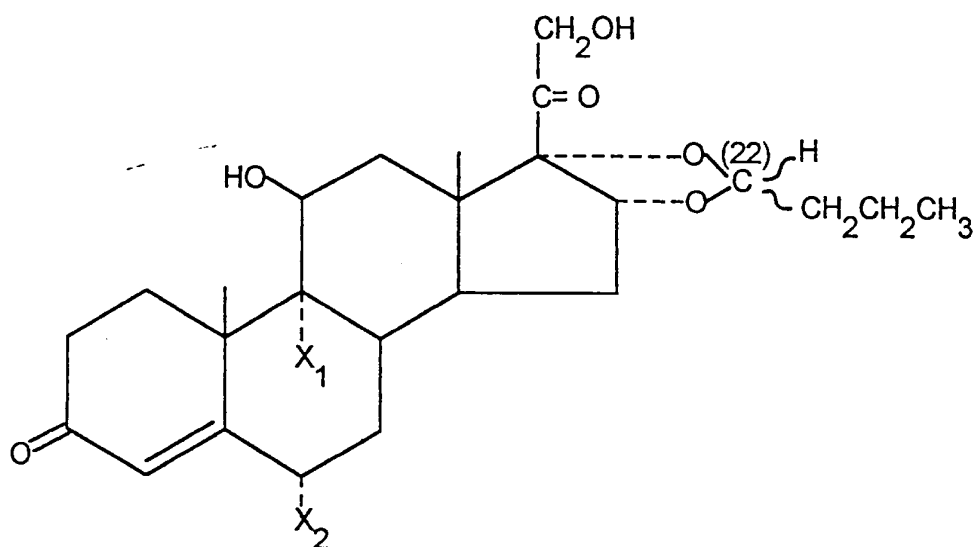
Znanstvena podlaga

Znano je, da glukokortikosteroide (GCS) lahko uporabljamo za lokalno terapijo za vnetja, alergije ali imunološke bolezni v respiratornih zračnih poteh (npr. astma, rinitis), na koži (ekcem, psoriza) ali v črevesju (ulcerativni kolitis, Morbus Crohn). Z lokalno glukokortikosteroidno terapijo dosežemo klinično prednost proti splošni terapiji (npr. glukokortikosteroidne tablete), posebej z ozirom na zmanjšanje nezaželenih učinkov glukokortikoida izven obolelih področij zaradi zmanjšanja potrebne doze. Da bi dosegli celo še višje klinične prednosti, pri npr. težjih bolezni respiratornih zračnih poti, mora GCS imeti ustrezen farmakološki profil. Imeti morajo visoko notranjo glukokortikoidno aktivnost na mestu aplikacije, toda tudi prav tako hitro inaktivacijo pred ali po prehodu v splošno cirkulacijo.

Odkritje izuma

En cilj predstavljenega izuma je opisati nove GCS spojine. Nove spojine so okarakterizirane z visoko antiinflamatorno, imunosupresivno in antianafilaktično močjo na kraju apliciranja in, še posebej, imajo izrazito poboljšano razmerje med to močjo in sposobnostjo za izzivanje GCS delovanja izven zdravljenih regij.

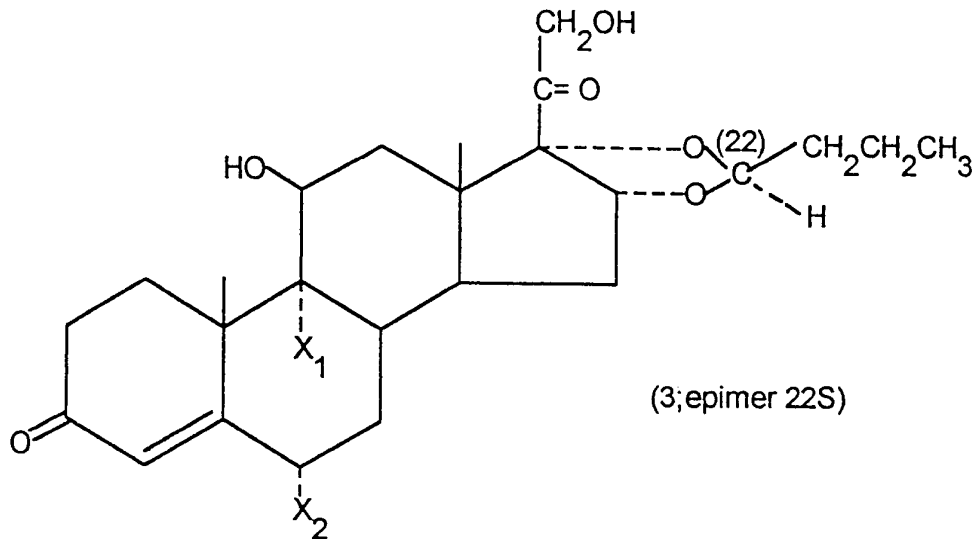
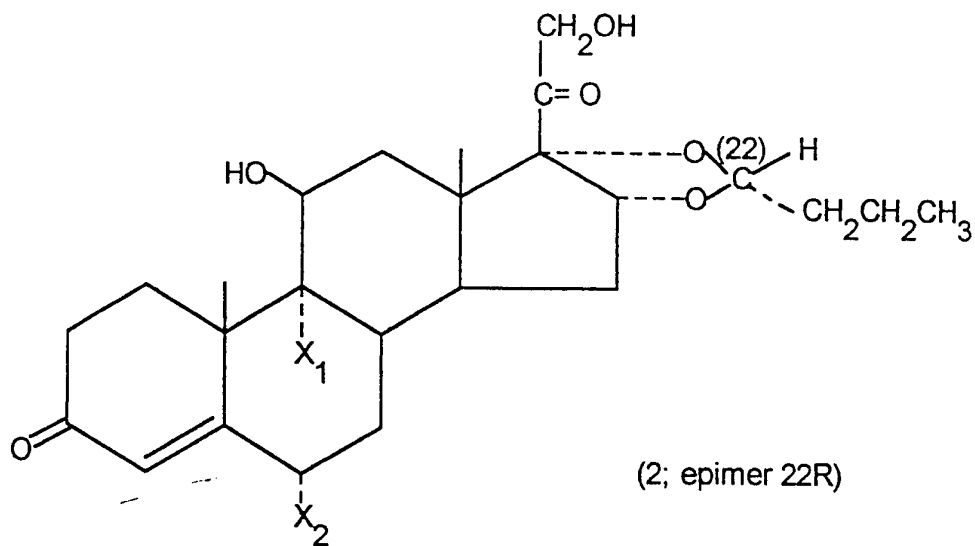
Spojini izuma sta 22R ali 22S epimera spojine s splošno formulo



1

kjer sta X₁ in X₂ enaka ali različna in vsak predstavlja vodikov ali fluorov atom, določeno je, da X₁ in X₂ nista hkrati vodikova atoma.

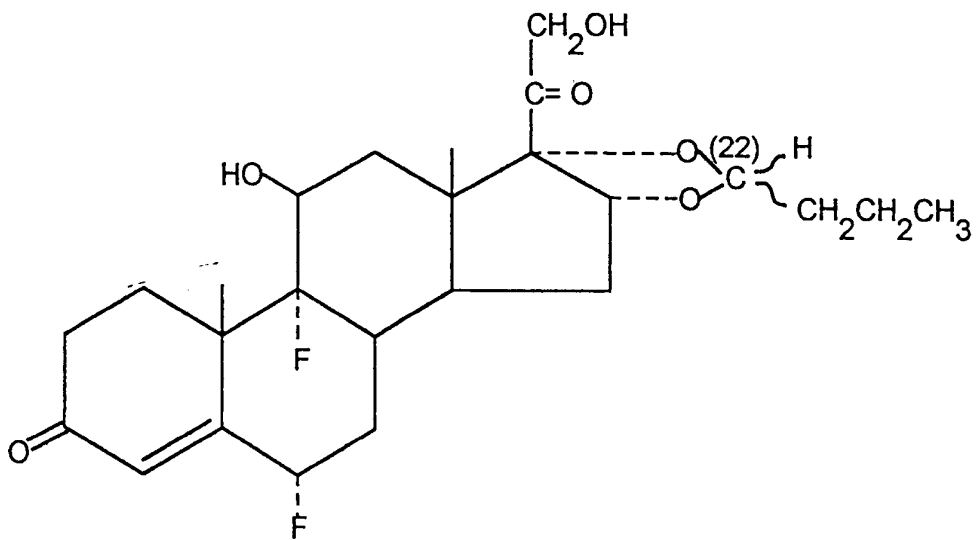
Posamezno lahko epimera 22R in 22S s formulo (1) razložimo na način, ki sledi, zaradi kiralnosti ogljikovega atoma na mestu 22:



kjer sta X_1 in X_2 definirana kakor zgoraj.

Epimer 22R, oziroma 22S s formulo 1 zgoraj, je po definiciji spojina, ki vsebuje ne več kot 2 utežna odstotka, zaželeno ne več kot 1 utežni odstotek, drugega epimera.

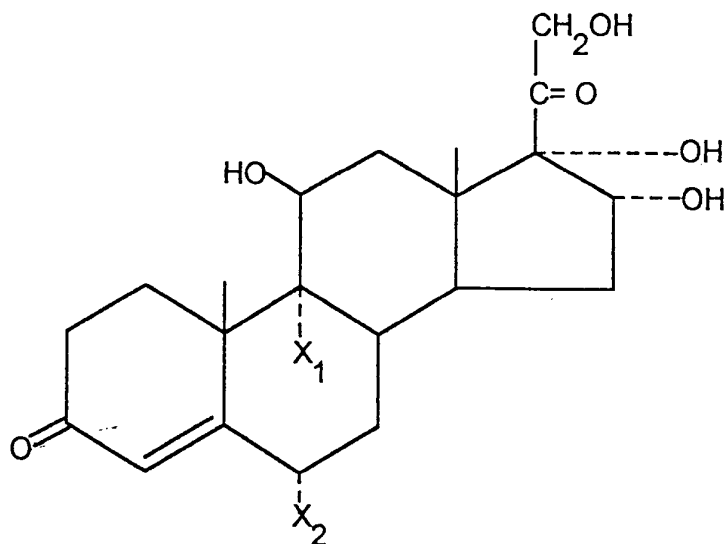
Zaželjeni spojini izuma sta 22R in 22S epimera s strukturo



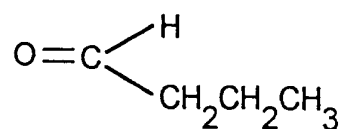
Zaželjeni steroid ima R konfiguracijo na 22 ogljikovem atomu.

Metode priprave

16 α ,17 α -acetale s formulo 1 pripravimo z reakcijo spojine s formulo

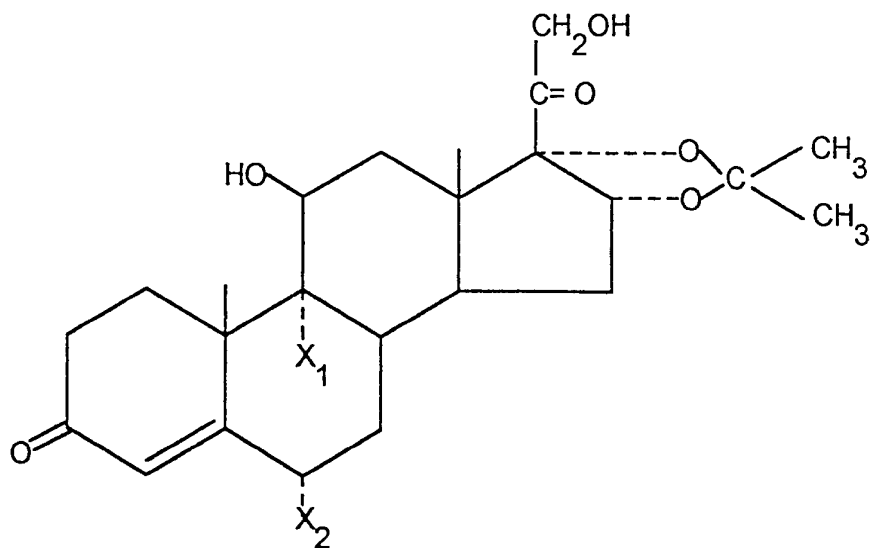


kjer sta X₁ in X₂ definirana kakor zgoraj, z aldehydom s formulo

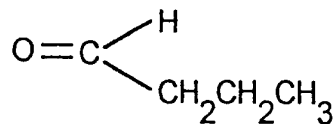


Reakcijo izvedemo z dodajanjem steroida v raztopino aldehida skupaj s kislim katalizatorjem, npr. perklorovo kislino, p-toluensulfonsko kislino, klorovodikovo kislino v etru, raje v dioksanu ali v acetonitrilu.

Spojine s formulo 1 prav tako pripravimo s transacetalizacijo ustreznih 16 α ,17 α -acetonidov



kjer sta X₁ in X₂ definirana kakor zgoraj, z aldehydom s formulo



Reakcijo izvedemo z dodajanjem steroida v raztopino aldehida skupaj s kislim katalizatorjem, npr. perklorovo kislino, p-toluensulfonsko kislino, klorovodikovo kislino v etru, raje v dioksanu ali v acetonitrilu.

Reakcijo lahko tudi izvedemo v v reakcijskem mediju, ki je ogljikovodik, zaželjeno izooktan, v katerem je topnost pregnanovih derivatov (16 α ,17 α -acetonid ali 16,17-diol) manj kot 1 mg/ml, ali v halogeniranem ogljikovodiku, zaželjeno metilen kloridu ali kloroformu.

Reakcijo kataliziramo s hidrohlogensko kislino ali organsko sulfonsko kislino, kot je p-toluensulfonska kislina.

Reakcijo izvedemo v prisotnosti majhnih zrn inertnega materiala, kot je steklo, keramika, presejan silicijev dioksid (pesek), ali delčkov inertne kovine,

kot je granulirano nerjaveče jeklo ali tantal v reakcijskem mediju (ko reakcijo izvajamo v topilu, ki je ogljikovodik).

22R epimer, ki ga dobimo, je tako prvovrsten, da ga lahko zadostno prečistimo za uporabo za farmacevtsko substanco z rekristalizacijo namesto z veliko dražjim kromatografskim postopkom.

Pri reakcijskem postopku v ogljikovodikih kompleks steroid-katalizator tvori veliko lepljivo kepo, kar naredi mešanje in učinkovito reakcijo nemogočo. Za premagovanje tega uporabljamo majhna zrnca inertnega materiala in učinkovito mešanje, tako se, namesto, da bi nastala velika kepa, kompleks steroid-katalizator porazdeli v tankem sloju okrog zrnca. Tako je reakcijska površina veliko večja in reakcija s karbonilno spojino poteka zelo hitro.

Inertni zrnati material, ki ga uporabljamo v postopku, zaželeno silicijev dioksid (SiO_2), mora biti sestavljen iz prosto plavajočih majhnih delčkov. Velikost delcev je v okviru 0.1-1.0 mm, zaželeno 0.1-0.3 mm. Količina, ki jo uporabimo pri reakciji, je v okviru od 1:5 do 1:50, zaželeno 1:20.

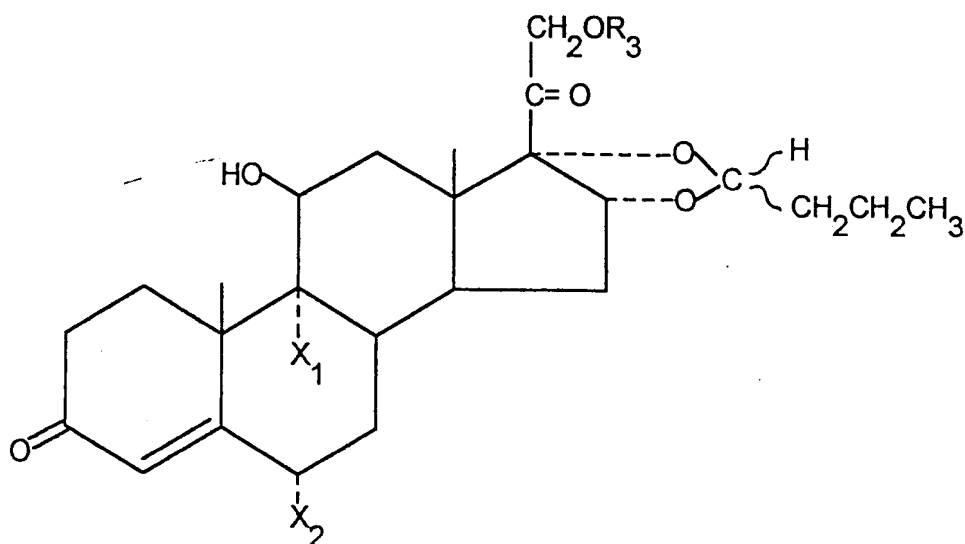
Kot hidrohalogeno kislino razumemo fluorovodikovo, klorovodikovo, bromovodikovo in jodovodikovo kislino in ustrezne oksihalogenne kisline, kot je perklorova kislina.

Posamezna epimera 22R in 22S, ki ju formiramo z acetalizacijo, imata praktično identične topnostne lastnosti. Glede na to se je izkazalo, da ju je nemogoče ločiti in izolirati iz epimerne zmesi s konvencionalnimi metodami za ločevanje stereoizomerov, t.j. frakcionirano kristalizacijo. Z namenom, da bi dobili posamezne epimere posebej, smo izpostavili stereoizomerno zmes po formuli 1, zgoraj, kolonski kromatografiji, ter tako ločili epimera 22R in 22S glede na različno mobilnost na stacionarni fazi. Kromatografija lahko, na primer, poteka na zamreženih dekstranskih gelih tipa Sephadex LH, npr. Sephadex LH-20 v kombinaciji s primernim organskim topilom kot elucijskim agensom. Sephadex LH-20, pripravljen v Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden, je hidroksipropiliran dekstranski gel v bisemi obliki, kjer so dekstranske verige navzkrižno povezane, tako dajo tridimenzionalno polisaharidno mrežo. Za mobilno fazo smo uspešno uporabili halogenirane ogljikovodike, npr. kloroform

ali mešanico heptan-kloroform-etanol v razmerju 0-50:50-100:10-1, zaželjeno mešanico 20:20:1.

Alternativno lahko kromatografijo izvedemo na kolonah z mikrododelčno vezano fazo, npr. 10 μm oktadecilsilan ($\mu\text{Bondapak C}_{18}$) ali $\mu\text{Bondapak CN}$ kolonah v kombinaciji s primernim organskim topilom, mobilna faza. Uspešno smo uporabili mešanico etanol-voda v razmerju 40-60:60-40.

Epimera 22R in 22S lahko dobimo tudi iz stereoizomerne zmesi s splošno formulo 4



kjer sta X_1 in X_2 definirana zgoraj in R_3 je preostanek karboksilne kisline, ki ima nerazvejano ogljikovodikovo verigo, dolgo 1-5 ogljikovih atomov, zaželjeno 21-acetat; po ločevanju s kromatografijo na Sephadex LH-20 skupaj s primerno mešanico topil, npr. heptan-kloroform-etanol v razmerju 0-50:50-100:10-1, zaželjeno mešanico 20:20:1, kot mobilno fazo. Ločena in izolirana epimera 22R in 22S s splošno formulo 4, zgoraj, podvržemo bazično katalizirani hidrolizi s hidroksoidi, karbonati ali hidrogenkarbonati alkalijskih kovin, npr. natrijev ali kalijev hidroksid, natrijev ali kalijev karbonat ali natrijev ali kalijev hidrogenkarbonat, kar da epimere 22R in 22S s formulo 2 oziroma 3, zgoraj.

Hidrolizo lahko alternativno izvedemo s kislino kot katalizatorjem, npr. klorovodikovo ali žvepleno kislino.

Spojine s formulo 4 pripravimo z upoštevanjem metod, ki so opisane v sorodni aplikaciji (naš primer D 1093-1 SE).

Farmaceutski preparati

Spojine iz izuma lahko uporabimo za različne načine lokalnega dajanja v odvisnosti od mesta vnetja, npr. perkutno, parenteralno ali za lokalno dajanje v respiratorni trakt z inhalacijo. Pomemben cilj načrtovanja formulacije je doseči optimalno bio-razpoložljivost aktivne steroidne sestavine. Za perkutne formulacije to prednostno dosežemo, če je steroid raztopljen z visoko termodinamsko aktivnostjo v nosilcu. To dosežemo z uporabo primerne sistema topil, ki vsebuje ustrezne glikole, kot propilen glikol ali 1,3-butandiol, oba kot taka ali pa v kombinaciji z vodo.

Steroidni ester je prav tako moč popolnoma ali delno raztopiti v lipofilni fazi z dodatkom surfaktanta kot sredstva za raztapljanje. Perkutni sestavki so lahko mazilo, krema olje v vodi, krema voda v olju ali pa losion. Sistem, ki vsebuje raztopljeno aktivno komponento, lahko v nosilcih za emulzijo sestavlja disperzno fazo prav tako kot kontinualno fazo. V zgornjih sestavkih lahko steroid prav tako obstaja kot trdna snov, zmanjšana na mikrometrski premer.

Aerosoli pod pritiskom za steroide so namenjeni za oralno ali nazalno inhaliranje. Sistem aerosola je oblikovan na tak način, da vsaka dostavljena doza vsebuje 10-1000 μg , zaželjeno 20-250 μg aktivnega steroida. Najbolj aktivne steroide dajemo v nižjem delu doznega okvira. Mikroniziran steroid sestavljajo delci, ki so znatno manjši od 5 μm , le ti so s pomočjo sredstva za dispergiranje (sol dioktilsulfosukcinske kisline) suspendirani v mešanico pogonskega sredstva.

Steroid lahko prav tako dajemo s pomočjo inhalatorja za suhi prah.

Ena možnost je zmešati mikroniziran steroid z nosilno substanco kot je laktoza ali glukoza. Zmes v prahu razporedimo v trde kapsule iz želatine, vsaka vsebuje zaželjeno dozo steroida. Kapsulo nato namestimo v inhalator za prah in dozo pacient inhalira v svoje zračne poti.

Druga možnost je ta, da mikroniziran prah spravimo v sfere, ki se zlomijo med postopkom doziranja. Ta sferoniziran prah polnimo v rezervoarje za zdravila v multidozni inhalator, t.j. Turbuhaler. Enota za doziranje odmeri zaželjeno dozo, ki jo pacient nato inhalira. Na ta način dostavimo pacientu steroid brez ali z nosilno substanco.

Steroid lahko prav tako vključimo v formulacije, ki so namenjene za zdravljenje inflamatornih črevesnih bolezni, oboje, po oralni poti ali rektalno. Formulacije za oralno pot morajo biti oblikovane tako, da steroid dostavijo do vnetih delov črevesja. To lahko dosežemo z različnimi kombinacijami črevesnih in/ali postopnih ali nadzorovanih principov sproščanja. Za rektalno pot je primerna formulacija klistimega tipa.

Delovni primeri

Izum bomo nadalje ilustrirali z neomejujočimi primeri, ki sledijo. V primerih smo pri preparativnih kromatografskih serijah uporabljali pretočno hitrost $2.5 \text{ ml/cm}^2 \times \text{h}^{-1}$. Molekulske mase smo v vseh primerih določili s kemijsko ionizacijsko masno spektrometrijo (CH_4 kot reagentni plin), tališča pa z Leitz Wetzlar mikroskopom z ogrevalno mizico. HPLC analize (High Performance Liquid Chromatography) smo izvajali na $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ koloni (300 x 3.9 mm i.d.) s pretočno hitrostjo 1.0 ml/min in z etanolom in vodo v razmerju med 40:60 in 60:40 kot mobilno fazo, če ni drugače določeno.

**PRIMER 1. 6 α ,9 α -difluoro-11 β -,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-
-4-en-3,20-dion**

Raztopino 6 α ,9 α -difluoro-16 α -hidroksiprednisolona (2,0 g) v 1000 ml absolutnega etanola smo dodali raztopini tris(trifenilfosfin)rodijevega klorida (2,2 g) v 500 ml toluena in hidrogenirali pri sobni temperaturi in atmosferskemu tlaku tekom 7 dni. Reakcijsko mešanico smo uparili do suhega in dodali metilen klorid (50 ml). Trdno oborino smo zbrali in večkrat sprali z majhnimi porcijami metilen klorida, da smo dobili 1,8 g 6 α ,9 α -difluoro-11 β -,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-diona. Molekulska masa 414 (izračunano 414,5).

**PRIMER 2. 6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksi-16 α ,17 α -
-[(1-metiletiliden)bis(oksi)] pregn-4-en-3,20-dion**

Suspenzijo 0,9 g tris(trifenilfosfin)rodijevega klorida v 250 ml razplinjenega toluena smo hidrogenirali 45 minut pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku. Dodali smo raztopino 1,0 g fluocinolon 16 α ,17 α -acetonida v 100 ml absolutnega etanola in nadaljevali s hidrogeniranjem še 40 ur. Reakcijski produkt smo uparili in ostanek očistili s "flahs" kromatografijo na silikagelu, uporabljajoč kot mobilno fazo aceton-petroleter, da smo odstranili največji del katalizatorja. Eluat smo uparili in ostanek nadalje očistili s kromatografijo na koloni Sephadex LH-20 (72,5 x 6,3 cm), s kloroformom kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcijo 3555-4125 ml in jo uparili, kar je dalo 0,61 g 6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksi-16 α ,17 α -[(1-metiletiliden)-bis(oksi)]pregn-4-en-3,20 diona. Tališče 146-151°C. $[\alpha]_D^{25} = +124,5^\circ$ (c = 0,220; CH₂Cl₂). Molekulska masa 454 (izračunano 454,6). Čistota: 98,5% (analiza s HPLC).

**PRIMER 3. (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-
-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

Raztopini sveže destiliranega butanala (0,5 g) in 0,4 ml perklorne kisline (70%) v 100 ml očiščenega in posušenega dioksana smo med mešanjem po majhnih porcijah v teku 30 minut dodali 1,8 g 6 α ,9 α -difluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-diona. Reakcijsko mešanico smo mešali pri sobni temperaturi nadaljnih 5 ur. Dodali smo metilen klorid (600 ml) in raztopino sprali z vodno raztopino kalijevega karbonata in vodo ter sušili nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Surov produkt, ki smo ga dobili po izhlapevanju, smo očistili s kromatografijo na koloni Sephadex LH-20 (76 x 6,3 cm), s kloroformom kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcijo 3015-3705 ml in jo uparili, da je ostalo 1,5 g (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoropregn-4-en-3,20-diona. Molekulska masa 468 (izračunano 468,5).

**PRIMER 4. (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-
-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksi-16 α ,17 α [(1-metiletiliden)bis(oksi)]pregn-4-en-3,20-dion (100 mg), 0,03 ml butanala, 2 ml finega peska (SiO₂) in 4 ml heptana smo pomešali pri sobni temperaturi. Med močnim mešanjem smo dodali perklorno kislino (70%; 0,1 ml). Reakcijsko mešanico smo mešali pri sobni temperaturi nadaljnih 5 ur, jo shladili in filtrirali. Trdni ostanek smo sprali s 4 x 15 ml vodne raztopine kalijevega karbonata (10%), potem s 4 x 15 ml vode in ga nato 4 krat mešali s po 25 ml diklorometana. Združene ekstrakte smo sprali z vodo, sušili in uparili. Ostanek smo raztopili v majhni količini diklorometana in oborili s petroletrom (vrel. 40-60°C), da smo dobili 75 mg (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona, pomešanega s 3% (22S)-epimera. Čistota, določena z analizo s HPLC, je bila 98%. Molekulska masa 468 (izračunano 468,5).

**PRIMER 5. (22R)- in (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-
-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion.**

(22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (1,5 g) smo ločili v njegova 22R- in 22S-epimera s kromatografijo na koloni Sephadex LH-20 (76 x 6,3 cm), uporabljajoč kot mobilno fazo mešanico *n*-heptan-kloroform-etanol (20:20:1). Zbrali smo frakciji 1845-2665 ml (A) in 2745-3600 ml (B) in ju uparili. Dva produkta smo oborili iz metilen klorid-petroleter. Produkt iz frakcije A (332 mg) smo določili s ¹H-NMR in masno spektromterijo kot (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion in produkt iz frakcije B kot (22R)-epimer.

Epimera imata naslednje lastnosti. Epimer 22S: tališče 231-44°C; $[\alpha]_D^{25} = +84,4^\circ$ ($c = 0,096$; CH₂Cl₂); molekulska masa 468 (izračunano 468,5). Epimer 22R: tališče 150-56°C; $[\alpha]_D^{25} = +120,0^\circ$ ($c = 0,190$; CH₂Cl₂); molekulska masa 468 (izračunano 468,5). Čistoto epimerov smo določili z analizo s HPLC in je bila 95,7% za 22S-epimer (ki je vseboval 1,2% 22R-epimera) in 98,8% za 22R-epimer (ki je vseboval 0,7% 22S-epimera).

**PRIMER 6. (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-
-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

Raztopino (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregna-1,4-dien-3,20-diona (4,0 g) in tris(trifenilfosfin)rodijevega klorida (0,40 g) v 150 ml absolutnega etanola smo hidrogenirali pri sobni temperaturi tekom 68 ur. Dodali smo vodo (150 ml) in mešanico filtrirali skozi HV LP 0,45 μ m filter. Filtrat smo delno uparili. Oborino, ki je nastala, smo filtrirali ter dobili 1,48 g surovega produkta, ki smo ga očistili na koloni Sephadex LH-20 (75 x 6,3 cm), uporabljajoč kot mobilno fazo kloroform. Zbrali smo frakcijo 3600-4200 ml, jo uparili in zopet očistili na koloni Sephadex LH-20 (75 x 6,3 cm), z

mobilno fazo heptan:kloroform:etanol, 20:20:1. Zbrali smo frakcijo 9825-10500 ml in jo uparili, da smo dobili 0,57 g (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion. Molekulska masa 468 (izračunano 468,5). Čistota: 96,5% (analiza s HPLC).

Filtratu, ki smo ga pridobili na zgoraj opisani način, smo dodali še 220 ml vode, da smo dobili nadaljno porcijo trdnega produkta, iz katerega smo po očiščenju na koloni Sephadex LH-20 (75 x 6,3 cm) ter s kloroformom kot mobilno fazo (frakcija 3795-4275) dobili 1,04 g (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α ,9 α -difluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona. Molekulska masa 468 (izračunano 468,5). Čistota 98,3% (HPLC-analiza).

PRIMER 7. 6 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-dion

Suspenziji 1,4 g tris(trifenilfosfin)-rodijevega klorida v 300 ml toluena smo dodali raztopino 1170 mg 6 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregna-1,4-dien-3,20 diona v 250 ml absolutnega etanola. Mešanico smo hydrogenirali 22 ur pri sobni temperaturi in atmosferskem tlaku ter jo uparili. Ostanek smo oborili iz aceton -kloroforma in tako dobili 661 mg 6 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-dion. Molekulska masa 396 (izračunano 396,5). Čistota: 96,6% (HPLC-analiza).

PRIMER 8. (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion

6 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-dion (308 mg) smo v porcijah dodali raztopini butanala (115 mg) in 70% perklorne kisline (0,2 ml) v 50 ml dioksana. Reakcijsko mešanico smo mešali pri sobni temperaturi 6

ur. Dodali smo metilen klorid (200 ml) in raztopino sprali z 10% vodnim kalijevim karbonatom in vodo ter sušili. Ostanek po uparevanju smo očistili na koloni Sephadex LH-20 (87 x 2,5 cm) s kloroformom kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcijo 420-500 ml in jo uparili, da smo dobili 248 mg (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona. Tališče 85-96°C. $[\alpha]_D^{25} = +119,8^\circ$ (c = 0,192; CH₂Cl₂). Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota: 96,1% (HPLC analiza). Razpodelitev med 22R- in 22S-epimeroma je bila 59/41 (HPLC-analiza).

PRIMER 9. (22R)- in (22S)-butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion

(22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (225 mg) smo ločili v porcije s preparativno HPLC na koloni μ Bondapak C₁₈ (150 x 19 mm), uporabljajoč kot mobilno fazo etanol:vodo, 40:60. Frakciji okoli 265 ml (A) in 310 ml (B) smo zbrali in jih uparili. Po precipitaciji iz metilen klorida - petroletra smo iz frakcije A pridobili 68 mg (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona. Tališče 180-192°C. $[\alpha]_D^{25} = +138,9^\circ$ (c = 0,144; CH₂Cl₂). Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota: 99,4% (HPLC-analiza).

Iz frakcije B smo po precipitaciji dobili 62 mg (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona. Tališče 168-175°C. $[\alpha]_D^{25} = +103,7^\circ$ (c = 0,216; CH₂Cl₂). Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota: 99,5% (HPLC-analiza).

**PRIMER 10. (22R)- in (22S)-21-acetoksi-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-
-11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-dion**

Raztopili smo 68 mg (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona v 1 ml piridina. Dodali smo anhidrid očetne kisline (1 ml) in reakcijsko mešanico mešali pri sobni temperaturi 1 uro, jo izlili na led-vodo ter ekstrahirali s 3 x 25 ml metilen klorida. Ekstrakt smo sušili in ga uparili. Ostanek smo kromatografirali na koloni Sephafex LH-20 (89 x 2,5 cm) s heptan:kloroform:etanolom, 20:20:1, kot mobilno fazo. Zbrali smo frakciji 380-400 ml (A) in 420-440 ml (B) in ju uparili.

Po precipitaciji iz metilen klorida - petroletra smo iz frakcije A pridobili 14 mg (22S)-21-acetoksi-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-diona. Tališče 179-186°C. $[\alpha]_D^{25} = +86,2^\circ$ (c = 0,188; CH₂Cl₂). Molekulska masa 492 (izračunano 492,6). Čistota: 97,5% (HPLC-analiza).

Iz frakcije B smo po precipitaciji dobili 20 mg (22R)-21-acetoksi-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-diona. Tališče 169-172°C. $[\alpha]_D^{25} = +139,0^\circ$ (c = 0,200; CH₂Cl₂). Molekulska masa 492 (izračunano 492,6). Čistota: 97,9% (HPLC-analiza).

**PRIMER 11. (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-
-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

Raztopini 20 mg (22R)-21-acetoksi-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-diona v 2 ml etanola smo dodali 2 ml 2M klorovodikove kisline. Po mešanju pri 60°C tekom 5 ur smo reakcijsko mešanico nevtralizirali z nasičeno vodno raztopino natrijevega hidrogen karbonata in jo ekstrahirali s 3 x 25 ml metilen klorida. Združene ekstrakte smo sprali z vodo, sušili in jih uparili.

Ostanek smo očistili na koloni Sephadex LH-20 (87 x 2,5 cm) s kloroformom kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcijo 460-515 ml in jo uparili, da smo dobili 8 mg (22R)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β -dihidroksipregn-4-en-3,20-diona.

Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota 98,4% (HPLC-analiza).

PRIMER 12. (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion

Raztopini 14 mg (22S)-21-acetoksi-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β -hidroksipregn-4-en-3,20-diona v 2 ml etanola smo dodali 2 ml 2M klorovodikove kisline. Reakcijo, izoliranje ter očiščenje smo izvedli na isti način kot v primeru 11. Zbrali smo frakcijo 455-510 ml in jo uparili, da smo dobili 7 mg (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-6 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona.

Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota 98,6% (HPLC-analiza).

PRIMER 13. 9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-dion

Suspencijo 3,0 g tris(trifenilfosfin)rodijevega klorida v 1000 ml razplinjenega toluena smo hidrogenirali 45 minut pri sobni temperaturi in atmosferskemu tlaku. Dodali smo raztopino 5,0 g triamcinolona v 500 ml absolutnega etanola in nadaljevali s hidrogeniranjem še 48 ur. Reakcijsko mešanico smo uparili do suhega ter jo suspendirali v 50 ml metilen klorida. Po filtriranju smo trdno fazo večkrat sprali z malimi porcijami metilen klorida in po sušenju dobili 4,4 g 9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-diona. Molekulska masa 396 (izračunano 396,5).

**PRIMER 14. (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-9 α -fluoro-11 β ,21-
-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

Raztopini sveže destiliranega butanala (100 mg) in 0,2 ml perklome kisline (70%) v 50 ml očiščenega in sušenega dioksana smo ob mešanju tekom 20 minut v malih porcijah dodali 9 α -fluoro-11 β ,16 α ,17 α ,21-tetrahidroksipregn-4-en-3,20-dion (340 mg). Reakcijsko mešanico smo mešali pri sobni temperaturi nadaljnih 5 ur. Dodali smo metilen klorid (200 ml) in raztopino sprali z vodno raztopino kalijevega karbonata in vodo ter sušili nad brezvodnim magnezijevim sulfatom. Surov produkt, pridobljen po uparevanju, smo očistili na koloni Sephadex LH-20 (72,5 x 6,3 cm), s kloroformom kot mobilno fazo. Zbrali smo frakcijo 2760-3195 ml in jo uparili, da smo dobili 215 mg (22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-9 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-diona. Molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistota 97,4% (HPLC analiza).

**PRIMER 15. (22R)- in (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-9 α -fluoro-11 β ,
-21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion**

(22RS)-16 α ,17 α -butilidendioksi-9 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion (200 mg) smo ločili s kromatografijo na koloni Sephadex LH-20 (76 x 6,3 cm), uporabljajoč kot mobilno fazo mešanico heptan-kloroform-etanol (20:20:1). Zbrali in uparili smo frakciji 7560-8835 ml (A) in 8836-9360 ml (B). S $^1\text{H-NMR}$ in masno spektrometrijo smo določili, da je produkt iz frakcije A (128 mg) (22S)-16 α ,17 α -butilidendioksi-9 α -fluoro-11 β ,21-dihidroksipregn-4-en-3,20-dion, produkt iz frakcije B (50 mg) pa 22R-epimer.

Epimera imata naslednje lastnosti. Epimer 22S: tališče 180-190°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +105,6^\circ$ ($c = 0,214$; CH_2Cl_2); molekulska masa 450 (izračunano 450,6). Epimer 22R: tališče 147-151°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +133,7^\circ$ ($c = 0,196$; CH_2Cl_2);

molkulska masa 450 (izračunano 450,6). Čistoto epimerov smo določili z analizo s HPLC in je bila 97,6% za 22S-epimer (ki je vseboval 1,8% 22R-epimera) in 98,2% za 22R-epimer (ki je vseboval 0,8% 22S-epimera).

PRIMER 16. Farmacevtski pripravki

Naslednji primeri, ki pa ne omejujejo izuma, ilustrirajo formulacije, namenjene različnim oblikam lokalnega dajanja. Količine aktivnega steroida v podkožnih formulacijah so navadno 0,001-0,2% (w/w), prednostno 0,01-0,1% (w/w).

Formulacija 1, mazilo		[g]
Steroid, mikroniziran		0.025
Tekoči parafin		10.0
Beli mehki parafin	do	100.0

Formulacija 2, mazilo		[g]
Steroid		0.025
Propilen glikol		5.0
Sorbitan seskviolate		5.0
Tekoči parafin		10.0
Beli mehki parafin	do	100.0

Formulacija 3, krema olje v vodi		[g]
Steroid		0.025
Cetanol		5.0
Gliceril monostearat		5.0
Tekoči parafin		10.0
Cetomacrogol 1000		2.0
Citronska kislina		0.1
Natrijev citrat		0.2
Propilen glikol		35.0
Voda	do	100.0

Formulacija 4, krema olje v vodi		[g]
Steroid, mikroniziran		0.025
Beli mehki parafin		15.0
Tekoči parafin		5.0
Cetanol		5.0
Sorbimacrogol stearat		2.0
Sorbitan monostearat		0.5
Sorbinska kislina		0.2
Citronska kislina		0.1
Natrijev citrat		0.2
Voda	do	100.0

Formulacija 5, krema voda v olju		[g]
Steroid		0.025
Beli mehki parafin		35.0
Tekoči parafin		5.0
Sorbitan seskvioleat		5.0
Sorbinska kislina		0.2
Citronska kislina		0.1
Natrijev citrat		0.2
Voda	do	100.0

Formulacija 6, losion

Steroid		0.25mg
Izopropanol		0.5ml
Karboksivinil polimer		3mg
NaOH		do dopolnitve
Voda	do	1.0 g

Formulacija 7, suspenzija za injekcije

Steroid, mikroniziran		0.05-10 mg
Natrijeva karboksimetil celuloza		7 mg
NaCl		7 mg
Polioksietilen (20) sorbitan monooleat		0.5 mg
Fenil karbinol		8 mg
Voda, sterilna	do	1.0 ml

Formulacija 8, aerosol za oralno in nazalno inhalacijo [% w/w]

Steroid, mikroniziran	0.1
Sorbitan trioleat	0.7
Triklorofluorometan	24.8
Diklorotetrafluorometan	24.8
Diklorodifluorometan	49.6

Formulacija 9, raztopina za atomiziranje

Steroid		7.0 mg
Propilen glikol		5.0 g
Voda	do	10.0 g

Formulacija 10, prašek za inhalacijo

Želatinasta kapsula, napolnjena z mikroniziranim steroidom	0.1 mg
Laktoza	20 mg

Prah inhaliramo s pomočjo inhalacijske naprave.

Formulacija 11, prašek za inhalacijo

Prašek v obliki kroglic, polnjen v večdozni inhalator za prah.

Vsaka doza vsebuje mikroniziran steroid	0.1 mg
---	--------

Formulacija 12, prašek za inhalacijo

Prašek v obliki kroglic, polnjen v večdozni inhalator za

prah. Vsaka doza vsebuje mikroniziran steroid

0.1 mg

Laktoza, mikronizirana

1 mg

Formulacija 13, kapsule za zdravljenje tankega črevesa [mg]

Steroid	1.0
Sladkorne kroglice	321
Aquacoat ECD 30	6.6
Acetiltributil citrat	0.5
Polisorbat 80	0.1
Eudragit L100-55	17.5
Trietilcitrat	1.8
Smukec	8.8
Sredstvo proti penjenju MMS	0.01

Formulacija 14, kapsule za zdravljenje debelega [mg]
črevesa

Steroid	2.0
Sladkorne kroglice	305
Aquacoat ECD 30	5.0
Acetiltributil citrat	0.4
Polisorbat 80	0.14
Eudragit NE30 D	12.6
Eudragit S100	12.6
Smukec	12.6

Formulacija 15, rektalni klistir

Steroid	0.02 mg
Natrijeva karboksimetil celuloza	25 mg
Dinatrijev edetat	0.5 mg
Metil parahidroksibenzoat	0.8 mg
Propil parahidroksibenzoat	0.2 mg
Natrijev klorid	7.0 mg
Anhidrid citronske kisline	1.8 mg
Polisorbat 80	0.01 mg
Voda, očiščena	do 1.0 ml

Farmakologija

Selektivnost za lokalno antiinflamatorno aktivnost lahko ponazorimo z modelom zračnih poti, ki sledi.

Znaten del inhaliranega GCS se deponira v žrelu in ga kasneje pogoltujemo ter konča v črevesu. Ta del doprinaša k nezaželenim stranskim učinkom steroida, ker deluje izven območja, ki ga nameravamo zdraviti (pljuča). Tako ima prednost uporaba GCS z visoko lokalno antiinflamatorno aktivnostjo, vendar z nizkimi z GCS induciranimi učinki po oralnem dajanju. Tako smo opravili študije z namenom, da bi določili z GCS inducirane učinke po lokalnem

apliciranju v pljuča prav tako kakor po peroralnem dajanju in razlike med delovanjem glukokortikosteroida v zdravljeni regiji pljuč in zunaj tega območja, to je bilo testirano na način, ki sledi.

Testni modeli

A) Testni model za zaželjeno lokalno antiinflamatorno delovanje na sluznične zračne poti (levi lobus pljuč)

Podganam Sprague Dawley (250 g) smo dali rahlo anestezijo z Ephrane in jim vkapali natanko v levi lobus pljuč glukokortikosteroidni testni preparat (suspendiran v slanici), volumen 0.5ml/kg. Dve uri kasneje smo vkapali suspenzijo Sephadex (5 mg/kg v volumnu 1ml/kg) v sapnik dovolj nad razcepom, da je suspenzija dosegla oba, levi in desni pljučni lobus. Dvajset ur kasneje smo podgane ubili, secirali leve pljučne lobuse in jih stehtali. Kontrolne skupine so namesto glukokortikosteroida dobile slanico, namesto suspenzije Sephadex pa slanico, da bi izmerili težo normalnih pljuč in Sefadeks edema, ki ni bil obdelan z zdravilom.

B) Testni model za nezaželjene sistemske učinke oralno absorbiranih glukokortikosteroidov

Podganam Sprague Dawley (250 g) smo dali rahlo anestezijo z Ephrane in jim dali glukokortikosteroidni testni preparat oralno, volumen 1.0 ml/kg. Dve uri kasneje smo vkapali suspenzijo Sefadeksa (5 mg/kg v volumnu 1ml/kg) v sapnik dovolj nad razcepom, da je suspenzija dosegla oba, levi in desni pljučni lobus. Dvajset ur kasneje smo podgane ubili, secirali pljučne lobuse in jih stehtali. Kontrolne skupine so namesto glukokortikosteroida dobile slanico, namesto suspenzije Sepgadex pa slanico, da bi izmerili normalno težo in težo Sefadeks edema, ki ni bil obdelan z zdravilom.

Rezultati primerjalnega proučevanja so podani v tabeli 1. Farmakološki profil spojin iz izuma smo primerjali s profilom budesonida. Rezultati so pokazali, da spojina po primeru 6 kaže veliko večjo lokalno antiinflamatorno aktivnost kot budesonid. Še več, rezultati prav tako kažejo višjo pljučno selektivnost testirane spojine iz izuma v primerjavi z izbrano, prej znano spojino, ker je doza zgoraj omenjene spojine, potrebna za inhibiranje pljučnega edema, (ED₅₀) z oralnim dajanjem zgoraj omenjene spojine 32 krat višja in budesonidova 13 krat višja kot doza, ki je potrebna za inhibicijo pljučnega edema z lokalno aplikacijo zdravil v pljuča. (Budesonid 4000 in 300nmol/kg, primer 6 pa 320 oziroma 10nmol/kg.)

Tako lahko ugotovimo, da so spojine iz izuma dobro prilagojene za lokalno zdravljenje inflamatornih motenj na koži in v različnih telesnih votlinah (t.j. pljuča, nos, črevo in sklepi).

Za

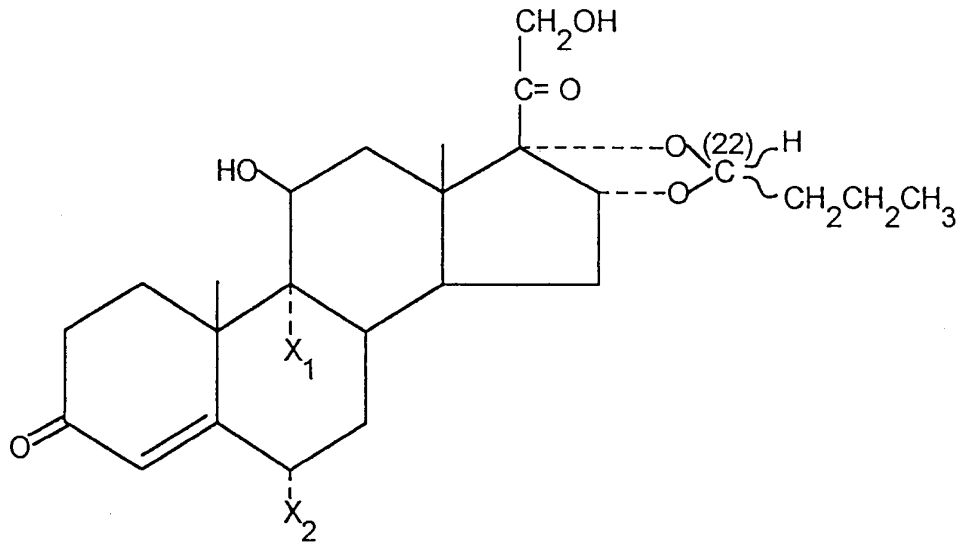
AKTIEBOLAGET ASTRA:

**PATENTNA PISARNA
LJUBLJANA**



PATENTNI ZAHTEVKI

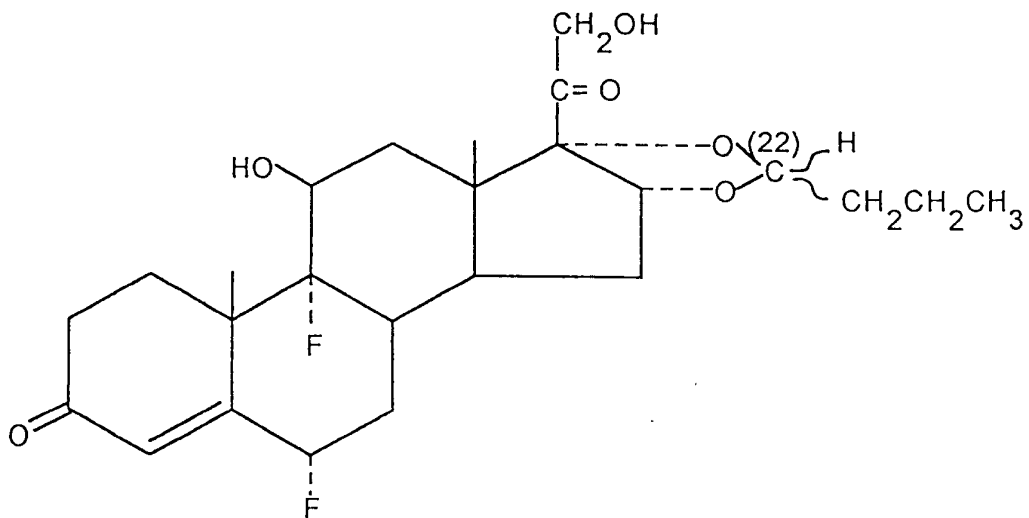
1. 22R ali 22S epimer spojine, ki je označena s tem, da ima splošno formulo



1

kjer sta X_1 in X_2 enaka ali različna in vsak predstavlja vodikov ali fluorov atom, določeno je, da X_1 in X_2 nista hkrati vodikova atoma.

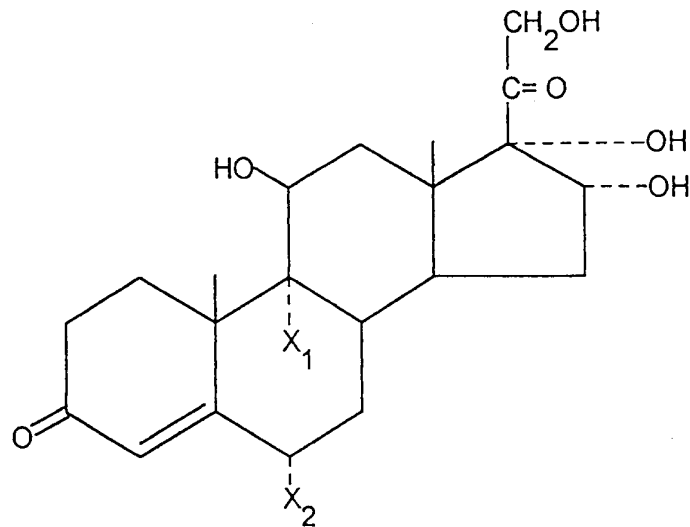
2. Spojina po prvem zahtevku, ki je označena s tem, da je 22R ali 22S epimer strukture



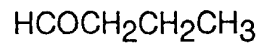
3. Spojina po kateremkoli izmed zahtevkov 1-2, ki je označena s tem, da je stereoizomerna konfiguracija na 22 ogljikovem atomu R.

4. Postopek za pripravo spojine s splošno formulo 1, kakor je definirana v prvem zahtevku, ki je označen s tem, da obsega

a) reakcijo spojine s formulo



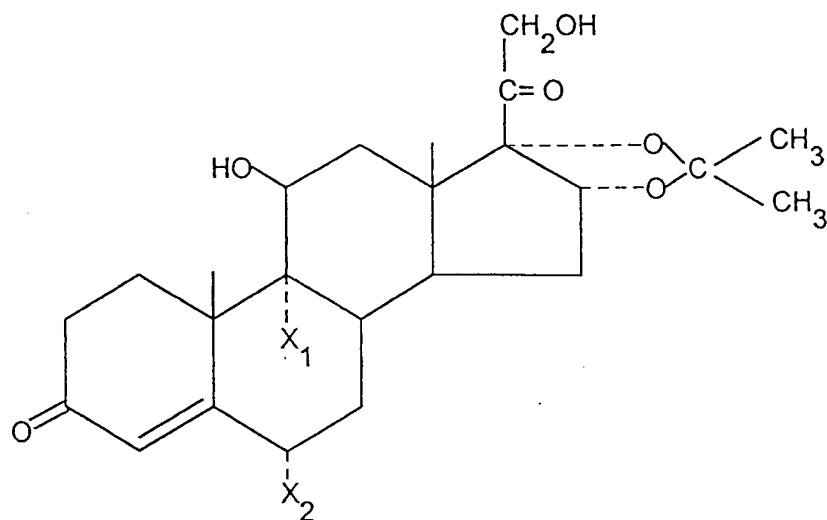
kjer sta X₁ in X₂ definirana kakor v prvem zahtevku, z aldehydom s formulo



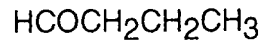
po tem epimerno zmes ločimo v njene stereoizomerne komponente;

ali

b) reakcijo spojine s formulo



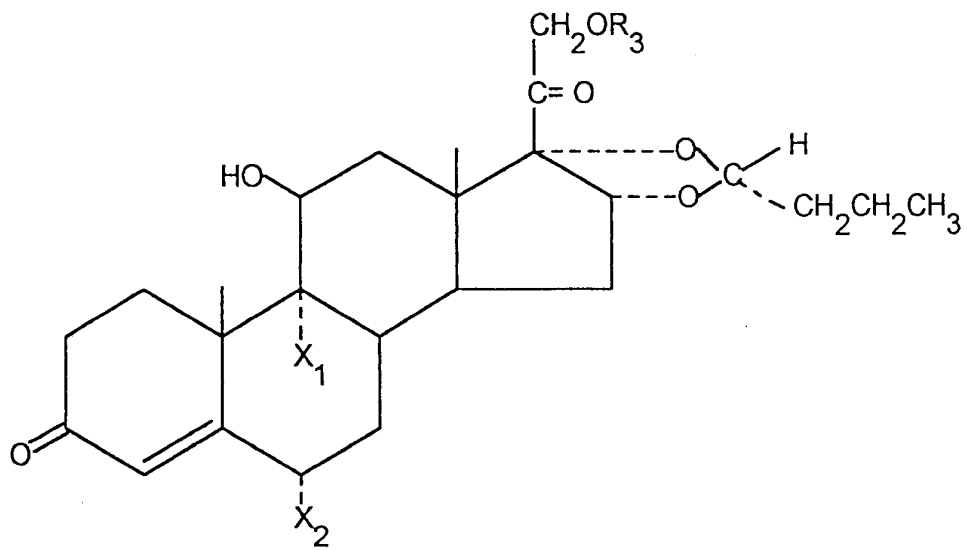
kjer sta X_1 in X_2 definirana kakor v prvem zahtevku, z aldehydom s formulo



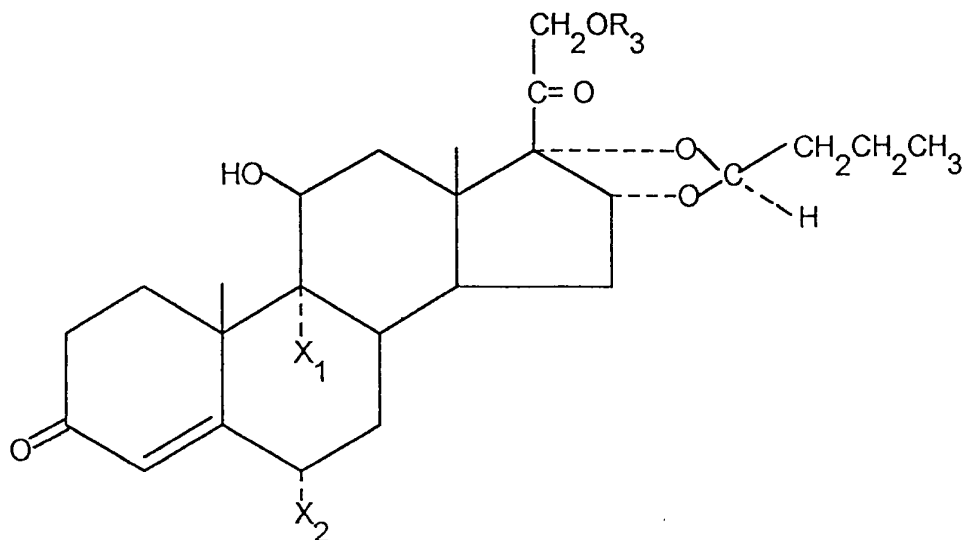
po tem epimerno zmes ločimo v njene stereoizomerne komponente;

ali

c) hidrolizo spojine s formulo



ali

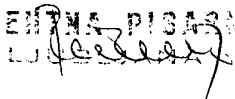


kjer sta X_1 in X_2 definirana kakor v prvem zahtevku in R je karboksilni kislini preostanek, ki ima nerazvejano ogljikovodikovo verigo, ki ima 1-5 ogljikovih atomov.

5. Farmaceutski preparat, ki je označen s tem, da kot aktivno sestavino vsebuje spojino, ki ustreza kateremukoli izmed zahtevkov 1-3.
6. Farmaceutski preparat po zahtevku 5, ki je označen s tem, da je v obliki enote za doziranje.
7. Farmaceutski preparat po zahtevkih 5-6, ki je označen s tem, da vsebuje aktivno sestavino, združeno s farmacevtsko sprejemljivim nosilcem.
8. Spojina po kateremukoli izmed zahtevkov 1-3, ki je označena s tem, da je uporabna kot terapevtsko aktivna substanca.
9. Uporaba spojine po kateremukoli izmed zahtevkov 1-3 za pripravo zdravil z antiinflamatorno in antialergijsko aktivnostjo.

Za

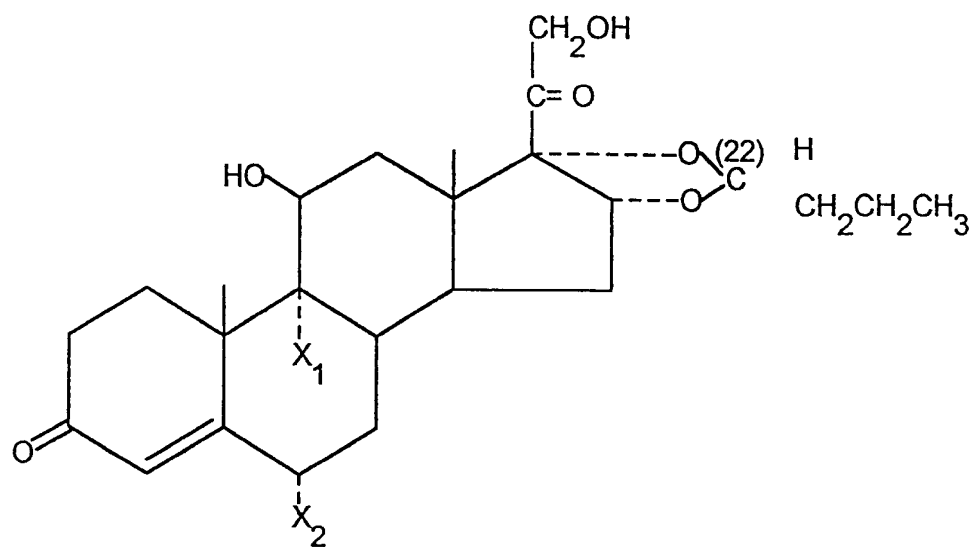
Aktiebolaget Astra:

PATENTNA PISARNA


Izvleček

NOVE ANTIINFLAMATORNO IN ANTIALERGIJSKO AKTIVNE SPOJINE,
 GLUKOKORTIKOSTEROIDI
 TER POSTOPKI ZA NJIHOVO PRIPRAVO

Spojina s splošno formulo



1

v obliki 22R ali 22S epimera, kjer sta X₁ in X₂ enaka ali različna in vsak predstavlja vodikov ali fluorov atom, določeno je, da X₁ in X₂ nista naenkrat vodikova atoma; postopki za njihovo pripravo, farmacevtski preparati, ki jih vsebujejo in uporaba spojin pri zdravljenju inflamatornih in alergijskih stanj.