



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

205010

(11)

(82)

(22) Přihlášeno 06 10 75
(21) (PV 7525-76)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 08 08 75
(P 25 35 997.1) a
od 14 10 74 (P 24 49 327.4)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 31 07 80
(45) Vydáno 15 12 83

(51) Int Cl³
C 07 J 1/07//
A 61 K 31/565

(72)
Autor vynálezu

PETZOLDT KARL dr., VIDIC HANS-JÖRG dr., PREZEWOWSKY KLAUS dr.,
NISHINO YUKISHIGE dr., WIECHERT RUDOLF prof. dr. a LAURENT
HENRY dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

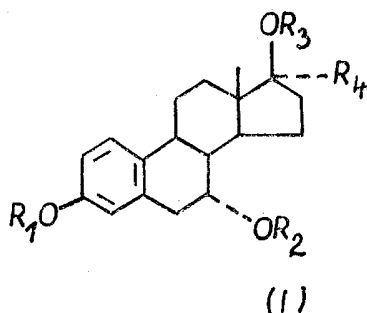
(73)
Majitel patentu

SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍ (Západní Berlín) a
BERGKAMEN (NSR)

(54) Způsob výroby 7-hydroxyestradiolů

1

Předmětem vynálezu je způsob výroby 7-hydroxyestradiolů obecného vzorce I,



ve kterém

R₁ znamená atom vodíku, alkanoylovou skupinu s 1 až 15 atomy uhlíku, alkylovou skupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, cykloalkylovou skupinu se 3 až 8 atomy uhlíku, nebo nasycenou pěti- nebo šestičlennou heterocyklickou skupinu obsahující kyslík, nebo zbytek sulfonové kyseliny s 1 až 6 uhlíkovými atomy,

R₂ a R₃ jsou shodné nebo rozdílné a znamenají atom vodíku, alkanoylovou skupinu s 1 až 15 uhlíkovými atomy nebo nasycenou pěti- nebo šestičlennou heterocyklickou sku-

2

pinu obsahující kyslík, přičemž R₂ popřípadě ještě znamená zbytek sulfonové kyseliny s 1 až 6 uhlíkovými atomy,

R₁ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu.

Jako alkanoylové skupiny přicházejí v úvahu zbytky kyselin poskytujících fyziologicky neškodné soli. Výhodnými kyselinami jsou organické karboxylové kyseliny s 1 až 15 atomy uhlíku, které patří do alifatické, cykloalifatické, aromatické, aromatickoalifatické nebo heterocyklické řady. Tyto kyseliny mohou být též nasycené a/nebo vícesytné a/nebo obvyklým způsobem substituované. Jako příklad substituentů je možno uvést alkylové skupiny, hydroxyskupiny, alkoxyskupiny, oxoskupiny nebo aminoskupiny nebo atomy halogenů.

Například je možno uvést tyto karboxylové kyseliny: kyselinu mravenčí, octovou, propionovou, máselnou, isomáselnou, valerovou, isovarelovou, kapronovou, enanthovou, kaprylovou, pelargonovou, kaprinovou, undecylovou, laurovou, tridecylovou, myristovou, pentadecylovou, trimethyloctovou, diethyloctovou, terc.butyloctovou, cyklopentyloctovou, cyklohexyloctovou, cyklohexankarboxylovou, fenyloctovou, fenoxyoctovou, mono-, di- a trichloroctovou, aminoctovou, diethylaminoctovou, piperidinoctovou, morfolinoctovou,

mléčnou, jantarovou, adipovou, benzoovou, nikotinovou, isonikotinovou, furan-2-karboxylovou.

Jako alkylové zbytky ve významu substituentu R_1 přicházejí v úvahu alkylové zbytky s 1 až 5 atomy uhlíku, které mohou být obvykle substituovány nebo rozvětveny. Příkladem substituentů jsou atomy halogenů nebo nižší alkoxykupiny. Obzvláště výhodné jsou methylová a ethylová skupina.

Jako cykloalkylové skupiny přicházejí v úvahu skupiny se 3 až 8 atomy uhlíku, z nichž výhodná je cyklopentylová skupina.

Jako nasycené heterocyklické zbytky obsahující kyslík přicházejí v úvahu ty, které se odvozují od heterocyklů s nejméně jedním atomem kyslíku v kruhu a které jsou perhydrogenovány na kruhu obsahujícím atom kyslíku. Jako příklad je možno uvést tetrahydrofurylový a tetrahydropyranylový zbytek, z nichž výhodný je tetrahydropyranylový zbytek.

Jako zbytky sulfonových kyselin ve významu substituentu R_1 a/nebo R_2 přicházejí v úvahu zbytky alifatických, cykloalifatických a aromatických sulfonových kyselin s 1 až 15 atomy uhlíku, jakož i zbytky aminosulfonových kyselin, které mohou obsahovat ještě další substituenty. Alifatické sulfonové kyseliny mají obsahovat s výhodou 1 až 6 atomů uhlíku a mohou být substituovány například halogenem, jako je chlor. Jako příklad je možno uvést tyto alifatické sulfonové kyseliny: kyselinu methansulfonovou, ethansulfonovou, β -chlorethansulfonovou, propansulfonovou, isopropansulfonovou, butansulfonovou. Z cykloalifatických sulfonových kyselin jsou výhodné kyselina cyklopentansulfonová a kyselina cyklohexansulfonová. Aromatickými sulfonovými kyselinami jsou s výhodou kyselina benzensulfonová, p-toluen-sulfonová, a p-chlorbensensulfonová. Z aminosulfonových kyselin přicházejí v úvahu například N,N-disubstituované aminosulfono-

vé kyseliny, přičemž oběma substituenty jsou alkylové zbytky s 1 až 6 atomy uhlíku nebo alkylenová skupina se 4 až 6 členy, popřípadě přerušená heteroatomem, jako je dusík, kyslík nebo síra. Jako příklad je možno uvést kyselinu N,N-dimethylaminosulfonovou, N,N-diethylaminosulfonovou, N,N-bis-(β -chlorethyl)aminosulfonovou, N,N-diisobutylaminosulfonovou, N,N-dibutylaminosulfonovou, pyrrolidino-, piperidino-, piperazino-, N-methylpiperazino- a morfolinosulfonovou.

Jako uhlovodíkové zbytky ve významu substituentu R_4 přicházejí v úvahu alkylové, alkenylové nebo alkylové skupiny až s 5 atomy uhlíku, například methylový, ethylový, propylový, butylový, pentylový, vinylový, ethinylový, propinylový a butadiinylový zbytek. Nenasycený uhlovodíkový zbytek může být též substituován chlorem. Výhodnými uhlovodíkovými zbytky ve významu substituentu R_4 jsou ethinylový a chlorethinylový zbytek.

Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu se vyznačují příznivou disociovanou farmakologickou účinností. Na základě silně vaginotropního a slabě uterotropního účinku jsou zejména vhodné k léčení žen v postmenstruačním období. Tak je možno jich použít pro léčení nedostatku estrogenu, přičemž se má zabránit centrálně řízenému účinku na dělohu, při němž je však žádoucí účinek na pochvu. Sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu jsou pak rovněž použitelné jako meziprodukty k výrobě farmakologicky cenných steroidů.

Příznivou estrogení disociaci je možno dokázat například na myši testem s kyselinou sialovou jak po orální, tak i po subkutánní aplikaci. Tak se sloučeniny podle vynálezu vyznačují, jak je uvedeno v tabulce I na příkladu 17α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu, disociačním podílem, který daleko předstihuje disociační podíl standardních látek, estradiolu a 17α -ethinylestadiolu.

Tabulka I

Sloučenina	prahová hodnota [mg] p. o.	relativní účinnost		disociační podíl p. o.
		vaginotropní	uterotropní	
estradiol	0,05—0,1	1	1	1
17α -ethinylestadiol	0,01	9,1	10,9	0,9
17α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triol	0,03	0,898	0,099	9,1

Test s kyselinou sialovou se provádí takto:

Myším se vyjmou vaječníky. Počínaje 10. dnem po kastraci se pokusným zvířatům podává jednou denně po 3 dny zkoušená látka p. o., 4. dne se zvířata usmrtí. Pochva a děloha se ihned vypreparují a odváží k hydrolýze do zkumavky. Stanovení kyseliny sialové se provádí postupem podle Svennerholma [Biochem. Biophys. Acta 24 (1957) 604]. Stanoví se přírůstek hmotnosti pochvy a

dělohy, závislý na dávce, jakož i úbytek obsahu kyseliny sialové, z nichž se určí poměrná velikost účinku zkoumané látky ve srovnání se standardní látkou estradiolem. Relativní účinnosti se vyjádří jako poměr, čímž se získá disociační stupeň Q. U standardní sloučeniny estradiolu je $Q = 1$. Sloučeniny s $Q > 1$ jsou poměrně vaginotropní, sloučeniny s $Q < 1$ jsou poměrně uterotropní.

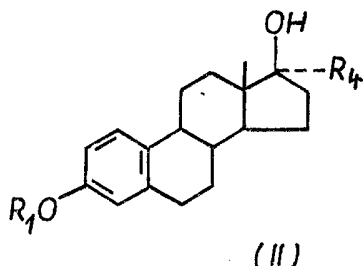
Prahové hodnoty uvedené v tabulce I, byly zjištěny na kryších obvyklým testem Allen-Doisy.

Vynález se týká též léčiv, které obsahují 7-hydroxyestradioly obecného vzorce I jako účinnou složku.

Výroba těchto léčiv se provádí obvyklým způsobem tím, že se účinné látky převedou s nosiči, ředidly, chuťovými přísadami atd., obvyklými v galenické farmacii, do požadované aplikační formy, jako jsou tablety, dražé, tobolky, roztoky atd. Koncentrace účinné látky v takto formulovaných léčivech závisí na aplikační formě. Tak například tableta obsahuje s výhodou 0,01 až 10 mg, roztoky k parenterální aplikaci obsahují 0,1 až 20 mg/ml roztoku.

Dávkování léčiv obsahujících sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu se může měnit podle formy podávání a podle zvolené sloučeniny. Kromě toho se může měnit i podle pacienta. Obecně se sloučeniny vyrobené způsobem podle vynálezu podávají v koncentraci, která může dosáhnout příznivých výsledků, aniž vyvolává nepříznivé nebo škodlivé vedlejší účinky; tak například se sloučeniny podle vynálezu podávají v dávce, která je v rozmezí přibližně 0,02 mg až asi 20 mg, i když za daných okolností je možno ji změnit, takže se použije dávka vyšší než 20 mg, například až po 50 mg. S výhodou však se používá dávek v rozsahu přibližně 0,05 mg až asi 5 mg.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se 17 α -R₄-estradiol obecného vzorce II,



ve kterém

R₁ a R₄ mají význam uvedený v úvodu tohoto popisu vynálezu, se fermentuje kulturou hub rodů *Absidia*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Pellicularia* nebo *Diplodia* a podle požadovaného významu substituentů R₁, R₂ a R₃ v konečném produktu vzorce I, kde R₄ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu, se popřípadě alespoň jedna hydroxylová skupina etherifikuje a/nebo esterifikuje.

Způsob podle vynálezu pro výrobu 7 α -hydroxyestradiolů obecného vzorce I, ve kterém R₁, R₂, R₃ a R₄ mají význam uvedený v úvodě tohoto popisu vynálezu (u vzorce I), s tou výjimkou, že žádný ze zbytků R₁ a R₂ nepředstavuje zbytek sulfonové kyseliny, se může výhodně provádět tak, že 17 α -4 α -estradiol obecného vzorce II, ve kterém R₁ a R₄ mají význam uvedený v bodě 1 s tou výjimkou, že R₁ nepředstavuje zbytek shora uvedené sulfonové kyseliny, se fermentuje kulturou hub rodů *Absidia*, *Aspergillus*, *Rhizo-*

pus, *Pellicularia* nebo *Diplodia* a podle žádaného významu R₁, R₂ a R₃ v konečném produktu vzorce I, kde R₄ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu, se popřípadě alespoň jedna hydroxylová skupina etherifikuje a/nebo esterifikuje.

7 α -hydroxylace se daří za použití kultur hub druhů *Absidia*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Pellicularia* a *Diplodia*. Vhodnými kmeny jsou například: *Absidia orchidis* (STCC 8990), *Aspergillus luchuensis* (CBS), *Rhizopus nigricans* (ATCC 6227b), *Pellicularia filamentosus* (ATCC 12289), *Diplodia natalensis* (ATCC 9055), *Rhizopus oryzae* (ATCC 4558), *Rhizopus kazahebsis* (ATCC 8998), *Rhizopus cohuii* (ATCC 8996), *Rhizopus shanghaiensis* (ATCC 10 329), *Rhizopus stolonifer* (ATCC 10 404).

Fermentace probíhá za týchž podmínek, jakých se používá při známých fermentativních přeměnách steroidů kulturami hub. S výhodou se fermentativní hydroxylace sloučenin obecného vzorce II provádí v submerzních kulturách výše uvedených kmenů za aerobních podmínek. Za tím účelem se kultury hub pěstují za provzdušňování v živném prostředí, které obsahuje uhlohydráty, bílkoviny, živné soli a růstové látky, nutné pro růst hub. Po vypěstování se ke kulturám přidá substrát jako vodná suspenze nebo rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle, jako je methanol, ethanol, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid, a fermentuje se až do ukončení reakce. Přeměna substrátu se účelně sleduje chromatikou analýzou vzorkových extraktů na tenké vrstvě. Jako u všech známých mikrobiologických přeměn steroidů je i při způsobu podle vynálezu optimální koncentrace substrátu a optimální doba fermentace závislá na specifické struktuře substrátu a na samotných fermentačních podmínkách a musí se stanovit známými předběžnými pokusy.

Po skončené fermentaci se produkty fermentace izolují známým způsobem. Izolace se může například provádět tak, že se fermentační nāsady extrahují polárním, ve vodě nerozpustným rozpouštědlem, jako je ethylacetát, butylacetát nebo methylisobutylketon, extrakty se zahustí a takto získané surové produkty se popřípadě přečistí chromatograficky a/nebo překrystalováním. Volné hydroxylové skupiny se pak mohou zesterifikovat nebo zetherifikovat. Zesterifikované nebo zetherifikované hydroxylové skupiny se mohou převést ve volné hydroxylové skupiny.

Pro esterifikaci přicházejí v úvahu postupy obvyklé v chemii steroidů. Poněvadž hydroxylové skupiny v poloze 3, 7 a 17 se vyznačují odlišnou reaktivností, je možno tyto hydroxylové skupiny zesterifikovat postupně. Podle volby reakčních podmínek se získají 3-mono-, 3,7-di- nebo 3,7,17-triacioly sloučeniny. Acylace v poloze 3 a 7 se provádí s výhodou anhydridem, popřípadě halogenidem kyseliny v přítomnosti pyridinu při teplotě

místnosti. Ukončí-li se acylace při nízké teplotě asi po 0,3 až 1 hodině, získá se 3-monoacylová sloučenina; nechá-li se však acylace probíhat po několik hodin, vznikne 3,7-diacylová sloučenina. K acylaci 17 β -hydroxylové skupiny ve 3,7-diacylátech se na steroid působí za teploty místnosti například anhydridem kyseliny v přítomnosti silných kyselin, jako je kyselina p-toluensulfonová nebo kyselina chloristá, nebo za tepla anhydridem kyseliny v přítomnosti pyridinu. Těchto postupů je možno též použít k bezprostřednímu převedení volné trihydroxysloučeniny v triacylát. Z triacylátů je možno uvolnit 3-hydroxyskupinu částečným zmýdlením za mírných podmínek.

Trihydroxylovou sloučeninu, jakož i mono- a diester je možno převést v příslušné tetrahydropyranylethery působením dihydropyranu v přítomnosti silné kyseliny, například kyseliny p-toluensulfonové. Z 3-monoacyl-, popřípadě 3,7-diacyl-7,17-, popřípadě 17-tetrahydropyranyletherů je možno alkalickým zmýdlením uvolnit 3-, popřípadě 3,7-hydroxyskupiny.

Štěpení tetrahydropyranyletherů se provádí za mírných podmínek přidáním kyseliny, například kyseliny šťavelové v methylenchloridu a methanolu za teploty varu.

Etherifikace alkylovým nebo cykloalkylovým zbytkem v poloze 3 se provádí s výhodou příslušným halogenidem v přítomnosti slabé zásady, jako je uhličitán draselný, uhličitán sodný atd. v alkoholickém roztoku při teplotě varu nebo (cyklo-)alkylhalogenidem v přítomnosti silné zásady, jako je hydrid sodíku, při teplotě místnosti.

Sloučeniny etherifikované v poloze 3 se mohou pak esterifikovat v polohách 7 a 17 karboxylovými kyselinami nebo se mohou nechat reagovat s dihydropyranem.

Sloučenina monoacylovaná v poloze 3 karboxylovou kyselinou se může převést v ester sulfonové kyseliny v poloze 7 tím, že se 3-monoacylová sloučenina známým způsobem nechá při teplotě místnosti reagovat s halogenidem sulfonové kyseliny v přítomnosti terciárního aminu. Obdobně je možno sloučeninu etherifikovanou v poloze 3 sulfonylovat v poloze 7.

Nechá-li se trihydroxysloučenina reagovat při teplotě místnosti s halogenidem sulfonové kyseliny v přítomnosti terciárního aminu, získá se 3,7-diester sulfonové kyseliny. V případě reakce s chloridem kyseliny methansulfonové je účelné chránit 17-hydroxylovou skupinu, například převedením v 17-tetrahydropyranylether, neboť nechráněná hydroxylová skupina v poloze 17 se může při působení chloridu kyseliny methansulfonové snadno odštěpit. Kromě toho je pak účelné pracovat při teplotách v rozmezí přibližně -10 až $+15$ °C.

3,7-Dihydroxy-17-tetrahydropyranylether se získá tak, že se 3,7-diacylová sloučenina, získaná působením anhydridu, popřípadě halogenidu kyseliny v přítomnosti pyridinu při

teplotě místnosti, převede dihydropyranem v přítomnosti silné kyseliny, jako je kyselina p-toluensulfonová, v příslušný 17-tetrahydropyranylether a hydroxylové skupiny v polohách 3 a 7 se uvolní alkalickým zmýdlením.

K přípravě esteru monosulfonové kyseliny v poloze 3 se nechá reagovat 3-hydroxy-7,17-bis(tetrahydropyranylether) s halogenidem sulfonové kyseliny při teplotě místnosti v přítomnosti terciárního aminu. Příprava 3-hydroxy-7,17-bis(tetrahydropyranyletheru) se provádí například reakcí 3-monoacylové sloučeniny s dihydropyranem a následným alkalickým zmýdlením esterové skupiny v poloze 3.

Příklad 1

Mikrobiální 7 α -hydroxylace

2 litrová Erlenmayerova baňka, která obsahuje 500 ml živného roztoku, sterilizovaného po dobu 30 minut v autoklávu při teplotě 120 °C a obsahujícího 3 % glukózy, 1 % kukuřičného výluhu, 0,2 % NaNO₃, 0,1 % KH₂PO₄, 0,05 % MgSO₄, 0,002 % FeSO₄ a 0,05 procent KCl, se naočkuje lyofilní kulturou *Diplodia natalensis* (ATCC 9055) a třepe se po dobu 72 hodin při teplotě 30 °C na rotační třepačce. Touto předkulturou se pak naočkuje 20litrový fermentační tank naplněný 15 litry prostředí, sterilizovaného při teplotě 121 °C za přetlaku 0,11 MPa, o stejném složení jako předkultura. Za přídavku Silikonu SH jako prostředku proti pění, se pak kultivuje při teplotě 29 °C za provzdušnění (10 l/min), přetlaku 0,07 MPa a míchání (220 otáček/min) po dobu 24 hodin; 1 litr kultivační zářky se pak za sterilních podmínek převede do 14 litrů živného prostředí stejného složení, sterilizovaného, jak je výše uvedeno, a kultivuje se za stejných podmínek. Po 12 hodinách se přidá sterilně filtrovaný roztok 3 g ethinylestradiolu ve 100 ml dimehtylsulfidu.

Průběh přeměny se sleduje chromatografickou analýzou methylisobutylketonových extraktů fermentačních vzorků na tenké vrstvě. Po úplné přeměně (doba kontaktů 45 hodin) se obsah fermentačního tanku dvakrát promíchá vždy s 10 litry methylisobutylketonu a extrakt se odpaří za vakua při teplotě lázně 50 °C.

K odstranění prostředku proti pění se zbytek vyjme methanolem, silikonový olej se oddělí v dělicí nálevce, roztok se pak prefiltruje přes skládaný filtr a znovu se odpaří do sucha. Zbývající získaný surový produkt se pak rozpustí v methylenchloridu a přečistí se chromatografií na sloupci silikagelu za použití rozpouštědlového gradientu methylenchlorid-methylenchlorid/aceton.

Po překrystalování z ethylacetátu taje čistý bílý 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triol při teplotě 234 až 235 °C (za rozkladu). C₂₂H₂₄O₃ (molekulová hmotnost 312,4). Výťažek: 710 mg.

Příklad 2

500 mg 17 β -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu se rozpustí v 10 ml pyridinu, k roztoku se přidá 0,5 ml acetanhydridu a směs se míchá po dobu 20 minut za chlazení ledem. Pak se roztok vmíchá do 100 ml chlazené 8% kyseliny sírové a vyloučená sraženina se promyje do neutrální reakce. Po vysušení se produkt překrystalizuje ze směsi etheru a hexanu, čímž se získá čistý 3-acetoxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-7 α ,17 β -diol o teplotě tání 133 až 135 °C. Výtěžek: 365 mg.

Příklad 3

K roztoku 100 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu v 5 ml ethylacetátu se při teplotě místnosti po sobě přidá 1 ml anhydridu kyseliny octové a 1 kapka 70% kyseliny chloristé. Po 3 minutách se přidá 1 kapka pyridinu, směs se promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší a odpaří. Získá se 78 mg 3,7 α ,17 β -triace-toxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrienu jako amorfní látka.

UV (methanol):

$\epsilon_{215} = 9\,760$,
 $\epsilon_{261} = 541$,
 $\epsilon_{267} = 715$,
 $\epsilon_{274} = 696$.

Příklad 4

K roztoku 150 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu ve 3 ml pyridinu se přidá 1 ml anhydridu kyseliny octové a směs se ponechá stát při teplotě místnosti po 16 hodin. Pak se reakční směs za přidání cyklohexanu nebo chloridu uhličitého odpaří dosucha. Zbytek se rozpustí v ethylacetátu a roztok se promyje vodou. Po vysušení a odpaření se získá 120 mg surového produktu, který se přečistí chromatografií na tenké vrstvě. Získá se 110 mg 3,7 α -diacetoxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-17 β -olu o teplotě tání 165 až 166 °C.

Příklad 5

200 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu se rozpustí za zahřátí ve 3 ml methanolu a 1 ml cyklopentylbromidu, k roztoku se pak přidá 200 mg uhličitane draselného a směs se zahřívá k varu po 12 hodin v atmosféře dusíku. Poté se směs vlije do ledové vody, okyselené kyselinou octovou a extrahuje methylenchloridem. Organická fáze se promyje do neutrální reakce, vysuší a odpaří. Surový produkt v množství 150 mg se přečistí chromatograficky na tenké vrstvě, čímž se získá 110 mg 17 α -ethinyl-3-cyklopentyloxy-1,3,5(10)-estratrien-7 α ,17 β -diolu o teplotě tání 126 až 128 °C.

Příklad 6

K roztoku 350 mg 17 α -ethinyl-3-cyklopentyloxy-1,3,5(10)-estratrien-7 α ,17 β -diolu v 5 ml ethylacetátu se přidá 1 ml anhydridu kyseliny octové a 1 kapka 70% kyseliny chloristé a směs se míchá při teplotě místnosti po 3 minuty. Pak se přidá 0,5 ml pyridinu, promyje nasyceným roztokem chloridu sodného, vysuší a odpaří. Získá se 310 mg 7 α ,17 β -diacetoxy-17 α -ethinyl-3-cyklopentyloxy-1,3,5(10)-estratrienu jako amorfní látka.

UV (methanol):

$\epsilon_{222} = 9\,060$,
 $\epsilon_{227} = 8\,730$,
 $\epsilon_{274} = 1\,460$,
 $\epsilon_{280} = 1\,920$,
 $\epsilon_{288} = 1\,770$.

Příklad 7

500 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu se rozpustí v 10 ml pyridinu, k roztoku se přidá 1 ml anhydridu kyseliny máslé a směs se míchá po dobu 60 minut při teplotě místnosti. Pak se roztok vmíchá do 100 ml ochlazené 8% kyseliny sírové a vyloučená sraženina se promyje do neutrální reakce. Po vysušení se překrystalizuje ze směsi etheru a hexanu, čímž se získá čistý 3-butyryloxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-7 α ,17 β -diol o teplotě tání 130 až 131 °C. Výtěžek: 415 mg.

Příklad 8

500 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu se rozpustí v 10 ml pyridinu, přidají se 3 ml anhydridu kyseliny máslé a směs se míchá po dobu 72 hodin při teplotě místnosti. Pak se roztok vmíchá do 100 ml ochlazené 8% kyseliny sírové a vyloučená sraženina se promyje do neutrální reakce. K dalšímu přečištění se produkt chromatografuje přes sloupec silikagelu a překrystalizuje se ze směsi etheru a hexanu. Čistý 3,7 α -dibutyryloxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol taje při teplotě 132,5 až 133 °C. Výtěžek: 380 mg.

Příklad 9

K roztoku 450 mg 3-acetoxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-7 α ,17 β -diolu ve 30 ml absolutního benzenu se při teplotě místnosti přidá 7 ml triethylaminu a za silného míchání 1,4 ml chloridu kyseliny isopropylsulfonové, načež se směs míchá po dobu 48 hodin při teplotě místnosti. Pak se ná sada vlije na led a extrahuje se etherem. Etherová fáze se promyje, vysuší a odpaří a surový produkt se přečistí chromatograficky s gradientovou elucí. Získá se 250 mg 17 α -ethinyl-3-acetoxy-7 α -isopropylsulfonyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -olu jako amorfní látky.

UV (methanol):

ϵ_{215}	= 9 800,
ϵ_{260}	= 610,
ϵ_{268}	= 785,
ϵ_{276}	= 750.

Příklad 10

K roztoku 350 mg 17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α ,17 β -triolu ve 35 ml absolutního benzenu se při teplotě místnosti přidá 5 ml triethylaminu a za silného míchání 2 ml chloridu kyseliny isopropylsulfonové. Směs se míchá po dobu 38 hodin při teplotě místnosti, načež se vlije na led a extrahuje se etherem. Etherová fáze se promyje vodou, vysuší se a odpaří. Surový produkt se přečistí chromatograficky s gradientovou elucí, čímž se získá 125 mg 17 α -ethinyl-3,7 α -bis-isopropylsulfonyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -olu jako oleje.

UV (methanol):

ϵ_{214}	= 10 450,
ϵ_{223}	= 5 500,
ϵ_{262}	= 530,
ϵ_{267}	= 731,
ϵ_{278}	= 715.

Příklad 11

a) K roztoku 350 mg 3,7 α -diacetoxy-17 α -ethinyl-1,3,5(10)-estratrien-17 β -olu ve 20 ml absolutního benzenu se přidá 20 mg kyseliny p-toluensulfonové a 1 ml dihydroxyranu. Směs se míchá přes noc při teplotě místnosti, zředí se etherem, promyje roztokem hydrogenuhlčitanu sodného a vodou do neutrální reakce a odpaří. Získá se z acetonu a hexanu 300 mg 3,7 α -diacetoxy-17 α -ethinyl-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrienu.

b) 250 mg 3,7 α -diacetoxy-17 α -ethinyl-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrienu se rozpustí v 10 ml methanolu, přidá se roztok 200 mg uhličitany draselného ve 2 ml

vody a směs se zahřívá po dobu 1,5 hodiny k varu v atmosféře dusíku. Pak se násada vlije do ledové vody a organická látka se extrahuje etherem. Po promytí vodou, vysušení a odpaření se získá z acetonu a hexanu 180 mg 17 α -ethinyl-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α -diolu, teplota tání: 163 až 170 °C.

c) K roztoku 230 mg 17 α -ethinyl-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrien-3,7 α -diolu v 5 ml pyridinu se za chlazení ledem v atmosféře dusíku přidá 0,5 ml chloridu kyseliny methansulfonové a směs se míchá po dobu 48 hodin v atmosféře dusíku při teplotě přibližně 4 °C. Pak se násada vlije do ledové vody, vzniklá sraženina se odfiltruje a rozpustí v methylenchloridu. Po promytí, vysušení a odpaření se získá 200 mg 17 α -ethinyl-3,7 α -bis-mesyloxy-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrienu jakožto surový produkt, který se zpracuje dále bez dalšího čištění.

UV (methanol):

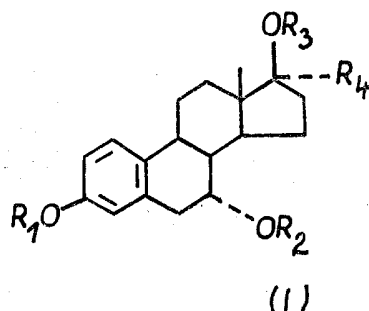
ϵ_{213}	= 10 650,
ϵ_{217}	= 10 105,
ϵ_{225}	= 5 245,
ϵ_{262}	= 565,
ϵ_{267}	= 745,
ϵ_{274}	= 740,
ϵ_{298}	= 66.

Příklad 12

K roztoku 200 mg 17 α -ethinyl-3,7 α -bis-mesyloxy-17 β -tetrahydropyranyloxy-1,3,5(10)-estratrienu v 5 ml methanolu se přidá roztok 500 mg kyseliny šťavelové ve 2 ml vody a směs se zahřívá půl hodiny k varu. Pak se násada vlije do ledové vody a organická látka se extrahuje methylenchloridem. Po promytí vodou, vysušení a odpaření se získá z methylenchloridu a hexanu 120 mg 17 α -ethinyl-3,7 α -bis-mesyloxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol, teplota tání: 133 až 143 °C.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby 7-hydroxyestradiolů obecného vzorce I,



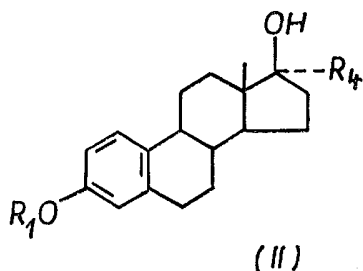
ve kterém

R₁ znamená atom vodíku, alkanoylovou skupinu s 1 až 15 atomy uhlíku, alkylovou skupinu s 1 až 4 uhlíkovými atomy, cykloalkylovou skupinu s 3 až 8 uhlíkovými atomy, nebo nasycenou pěti- nebo šestičlennou heterocyklickou skupinu obsahující kyslík, nebo zbytek sulfonové kyseliny s 1 až 6 uhlíkovými atomy,

R₂ a R₃ jsou shodné nebo rozdílné a znamenají atom vodíku, alkanoylovou skupinu s 1 až 15 uhlíkovými atomy nebo nasycenou pěti- nebo šestičlennou heterocyklickou skupinu obsahující kyslík, přičemž R₂ popřípadě

ještě znamená zbytek sulfonové kyseliny s 1 až 6 uhlíkovými atomy,

R₄ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu, vyznačující se tím, že se fermentuje 17 α -R₄-estradiol obecného vzorce II,



ve kterém

R₁ a R₄ mají shora uvedený význam, kulturou hub rodů Absidia, Aspergillus, Rhizopus, Pellicularia nebo Diplodia a podle požadovaného významu substituentů R₁, R₂ a

R₃ v konečném produktu vzorce I, kde R₄ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu, se popřípadě alespoň jedna hydroxylová skupina etherifikuje a/nebo esterifikuje.

2. Způsob podle bodu 1 k výrobě 7 α -hydroxyestradiolů obecného vzorce I, ve kterém R₁, R₂, R₃ a R₄ mají význam uvedený v bodě 1 s tou výjimkou, že žádný ze zbytků R₁ a R₂ nepředstavuje zbytek shora uvedené sulfonové kyseliny, vyznačující se tím, že 17 α -R₄-estradiol obecného vzorce II, ve kterém R₁ a R₄ mají význam uvedený v bodě 1, s tou výjimkou, že R₁ nepředstavuje zbytek shora uvedené sulfonové kyseliny, se fermentuje kulturou hub rodů Absidia, Aspergillus, Rhizopus, Pellicularia nebo Diplodia a podle žádaného významu R₁, R₂ a R₃ v konečném produktu vzorce I, kde R₄ znamená ethinylovou nebo chlorethinylovou skupinu, se popřípadě alespoň jedna hydroxylová skupina etherifikuje a/nebo esterifikuje.