



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **249 257 A1**

4(51) C 07 B 59/00
A 61 K 49/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 07 B / 290 473 8	(22)	22.05.86	(44)	02.09.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Römer, Johannes, Dr. Dipl.-Ing.; Wagner, Horst, Dr. Dipl.-Chem.; Kunz, Gisela, DD

(54)	Verfahren zur Herstellung von spezifisch tritiummarkiertem 5 α -Androst-16-en-3-on
------	---

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von spezifisch tritiummarkiertem 5 α -Androst-16-en-3-on hoher spezifischer Aktivität beschrieben, das als Tracer in zunehmendem Umfang in landwirtschaftlichen Forschungseinrichtungen zur Bestimmung des Eberpheromons (5 α -Androst-16-en-3-on) mit einem Radioimmunoassay (RIA) benötigt wird. Das Verfahren geht davon aus, ein lagerfähiges und leicht zugängliches 16-Androsten der reduktiven katalytischen Tritierung zu unterwerfen und in zwei weiteren Schritten in das Zielprodukt zu überführen.



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 257 A1

4(51) C 07 B 59/00
A 61 K 49/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 07 B / 290 473 8 (22) 22.05.86 (44) 02.09.87

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72) Römer, Johannes, Dr. Dipl.-Ing.; Wagner, Horst, Dr. Dipl.-Chem.; Kunz, Gisela, DD

(54) Verfahren zur Herstellung von spezifisch tritiummarkiertem 5 α -Androst-16-en-3-on

(57) Es wird ein Verfahren zur Herstellung von spezifisch tritiummarkiertem 5 α -Androst-16-en-3-on hoher spezifischer Aktivität beschrieben, das als Tracer in zunehmendem Umfang in landwirtschaftlichen Forschungseinrichtungen zur Bestimmung des Eberpheromons (5 α -Androst-16-en-3-on) mit einem Radioimmunoassay (RIA) benötigt wird. Das Verfahren geht davon aus, ein lagerfähiges und leicht zugängliches 16-Androsten der reduktiven katalytischen Tritierung zu unterwerfen und in zwei weiteren Schritten in das Zielprodukt zu überführen.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Zur PS Nr. 249 257

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs.1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von spezifisch tritiummarkierten 5α -Androst-16-en-3-on hoher spezifischer Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß 3β -Acetoxyandrosta-5,16-dien-17-iodid in Ethylacetat mit T_2 bei einem Hydrieranfangsdruck von 70–75 kPa in Gegenwart von Pt-Mohr und einer Spur Perchlorsäure zu 3β -Acetoxy-(5α , 6α - 3H)-androst-16-en-17-iodid umgesetzt, dieses mit Natriummethylat hydrolysiert und deiodiert und das erzeugte (5α , 6α - 3H)-Androst-16-en-3 β -ol bekanntermaßen zu (5α , 6α - 3H)-Androst-16-en-3-on oxidiert wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

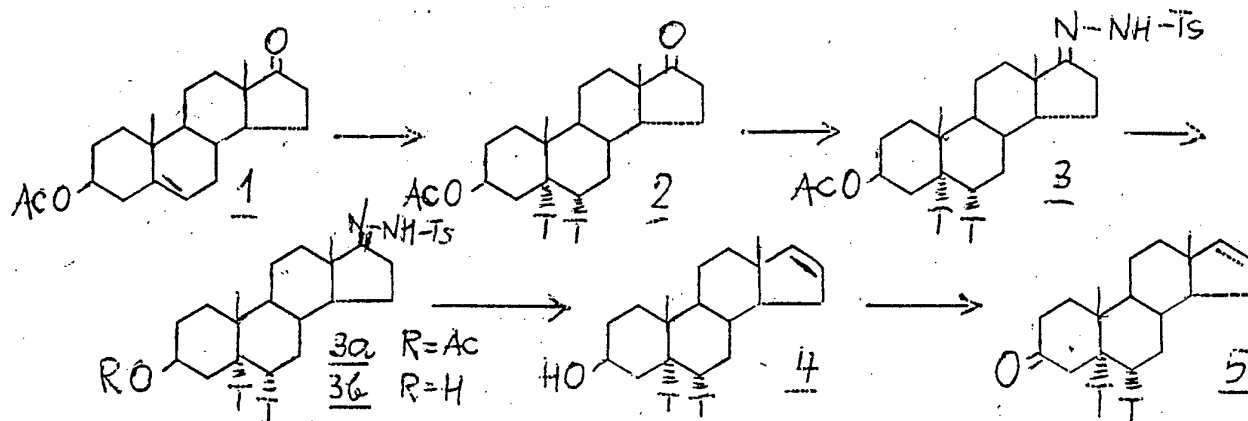
Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von tritiummarkiertem 5α -Androst-16-en-3-on.

Die nichtmarkierte Verbindung, das sogenannte Eberpheromon, kommt in geringer Konzentration im Plasma und Fettgewebe des geschlechtsreifen Ebers vor und führt infolge seines widerlichen Geruchs zur Ungenießbarkeit des Eberfleisches. Unter den Bedingungen der industriemäßigen Tierproduktion ergibt sich daher die dringende Aufgabe, das qualitativ hochwertige Eberfleisch geruchsfrei und damit verwendbar für die menschliche Ernährung zu machen. Ansätze dafür bietet eine gezielte Hemmung der Biosynthese des Pheromons, woran in vielen Ländern gearbeitet wird. Voraussetzung für diese Untersuchungen ist eine empfindliche Nachweismethode für die im ng-Bereich liegenden Konzentrationen an 5α -Androst-16-en-3-on. Dazu eignet sich am besten ein Radioimmunoassay (RIA), dessen Empfindlichkeit wiederum von der spezifischen Aktivität des eingesetzten Tracers abhängt.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

In der Literatur wird die Verwendung von (5α - 3H)-Androst-16-en-3-on mit einer spezifischen Aktivität von 537 GBq/mmol als Tracer für ein RIA-Verfahren erwähnt (O. Andresen; Acta endocrin. 76 [1974] 377).

Die untere Erfassungsgrenze liegt hier bei 25 pg Eberpheromon. Über die Synthese des Tracers werden keine Angaben gemacht. Bei der Entwicklung eines Eberpheromons-RIAs für die Landwirtschaft der DDR (G. Hobe et al.; Arch. exper. Vet. med. 36 [1982] 739) wird als Tracer (5α , 6α - 3H)-Androst-16-en-3-on benutzt, der mit 780 GBq/mmol den Nachweis von 20 pg Eberpheromons gestattet. Die Synthese dieses Tracers (H. Wagner, J. Römer; J. Lab. Comp. 14 [1978] 873) geht von 3β -Acetoxy-androst-5-en-17-on (1) aus, wobei die Acetoxygruppe laut Literatur (J. H. Pierce et al.; J. Chem. Soc. 1955, 694) für die fast ausschließlich entstehende 5α -Verbindung (2) bei der Hydrierung bzw. Tritierung verantwortlich ist. Umsetzung mit Tosylhydrazid liefert 3β -Acetoxy-(5α , 6α - 3H)-androstan-17-tosylhydrazon (3a) das unter Argon und Feuchtigkeitsausschluß mit Methylolithium behandelt wird. Dabei erfolgt eine schnelle Hydrolyse zum 3β -Hydroxy-tosylhydrazon (3b), und in einer langsameren Reaktion wird dann aus (3b) (5α , 6α - 3H)-Androst-16-en-3 β -ol (4) gebildet (R. H. Shapiro, M. J. Heath; J. Am. Ch. Soc. 89 [1967] 5734). Nach chromatographischer Reinigung wird (4) mit Jones-Reagenz (K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones, B. L. C. Weedon; J. Chem. Soc. 1946, 39) zum (5α , 6α - 3H)-Androst-16-en-3-on (5) oxydiert. Umkristallisation liefert ein Produkt mit einer radiochemischen Reinheit > 98% und einer spezifischen Aktivität von 780 GBq/mmol.



Das geschilderte Verfahren zeigt folgende Nachteile:

- Wegen der Hydrierempfindlichkeit der 16-Doppelbindung muß die katalytische Hydrierung mit T_2 am Synthesebeginn, also vor Einführung der 16-Doppelbindung, stattfinden.
- Die komplizierte, unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluß ablaufende Umsetzung mit Methylolithium muß mit Substrat hoher spezifischer Aktivität erfolgen.
- Mikromengen Methylolithium lassen sich nicht gut handhaben.
- Der Einsatz von großem Reagenzüberschuß führt bei Mikrosynthesen häufig zu geringen Umsetzungen, offenbar wegen ungenügender Durchmischung.
- Der Zeitaufwand für die Synthese ist beträchtlich.

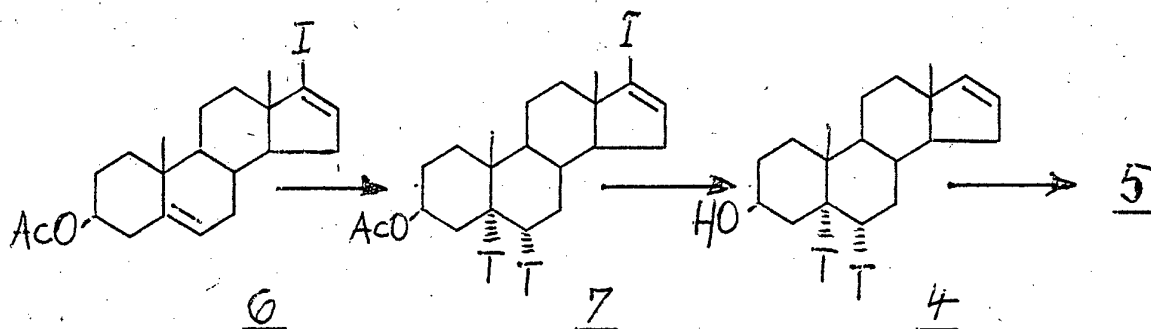
Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist demnach ein Verfahren, das mit geringem synthetischen Aufwand etwa 1 GBq an tritiummarkiertem Eberpheromon hoher spezifischer Aktivität in kurzer Zeit zu synthetisieren gestattet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Einführung von Tritium in ein lagerfähiges, leicht zugängliches 16-Androsten anzugeben, welches die einfache und schnelle Überführung in ein hochmarkiertes 5 α -Androst-16-en-3-on (ca. 1800 GBq/mmol) gestattet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß 3 β -Acetoxyandrost-5,16-dien-17-iodid (**6**) durch katalytische Hydrierung in Ethylacetat mit T₂ bei einem Hydrieranfangsdruck von 70–75 kPa in Gegenwart von Pt-Mohr und einer Spur Perchlorsäure selektiv zum 3 β -Acetoxy-(5 α , 6 α -³H)-androst-16-en-17-iodid (**7**) umgesetzt, das chromatographisch gereinigte Produkt nach (D. H. R. Barton, R. E. O'Brian u. S. Sternhell, J. Chem. Soc. **1962**, 470) mit Natriumethylat hydrolysiert und deiodiert und das so entstandene bekannte (5 α , 6 α -³H)-Androst-16-en-3 β -ol (**4**) nach einem bekannten Verfahren (z. B. mit Jones-Reagenz) zum (5 α , 6 α -³H)-Androst-16-en-3-on (**5**) oxydiert wird.



Der Ausgangspunkt der Erfindung war, daß die 16-Doppelbindung von (**6**) infolge des 17-Iods hydrierunempfindlich sein sollte. Überraschenderweise wird aber, wie das Ergebnis der generell vor einer aktiven Tritium-Synthese durchgeführten Versuche ergab, auch die bisher bei (**1**) problemlos zu hydrierende 5-Doppelbindung katalytisch von H₂, selbst mit sehr aktiven Katalysatoren wie PtO₂ in Gegenwart von Säure nicht angegriffen, so daß auch eine Tritiummarkierung generell aussichtslos erschien. Allein Tritium liefert unerwarteterweise, vermutlich infolge seines Isotopieffekts unter den erfindungsgemäßen Bedingungen das gewünschte (**7**).

Obwohl unter den gewählten drastischen Bedingungen ein Abspalten des Iods und damit die Hydrierung der nunmehr freien Doppelbindung zu befürchten wäre, bleibt das 17-Iod unangetastet.

Der Vorteil der Erfindung besteht darin, daß das Ausgangsmaterial bereits die 16-Doppelbindung enthält. Die Probleme der Einführung dieser Doppelbindung, wie sie dem Stand der Technik anhaften, entfallen. Die Synthese ist schnell, einfach und vor allem im Mikromaßstab durchführbar.

Ausführungsbeispiel

6 (25 mg = 57 μ mol) wird in Essigester (2,5 ml), der als Promotor 1 Tropf. HClO₄ enthält, in Gegenwart von PtO₂ (40 mg) mit T₂ umgesetzt. Nach Abfiltrieren des Katalysators, Entfernen des labilen Tritiums und chromatographischer Reinigung wird das vorliegende Gemisch aus **6** und **7** in Ethanol (99,9%, 10 ml) gelöst, mit überschüssigem Natrium in kleinen Stücken versetzt und unter Rückfluß 1 h erhitzt, wobei **7** zu **4** deiodiert und hydrolysiert wird. Eintropfen der ethanolischen Lösung in HNO₃ (1:10, 50 ml), Extrahieren mit Ether (20 ml) und Entfernen des Ethers durch Gefriertrocknen liefert bräunliches Rohprodukt, das mit Aceton (5 ml) aufgenommen und in einem Bad (0°C) tropfenweise mit Jones-Reagenz bis zur deutlichen Gelbfärbung versetzt wird. Dabei wird **4** zu **5** oxydiert. Der Reagenzüberschuß wird mit Isopropanol beseitigt. Einführen in Wasser, Extraktion mit Benzen (30 ml) und Entfernen des Benzens durch Gefriertrocknen liefert Rohprodukt, das auf einer Kieselgelplatte gereinigt wird. Auswaage: 1,2 mg = 4,3 μ mol. Gesamtaktivität 7,6 GBq. Das entspricht einer spezifischen Aktivität von 1770 GBq/mmol.