

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2003.11.07	(73) Titular(es): PANTARHEI BIOSCIENCE B.V. P.O. BOX 464 3700 AL ZEIST NL
(30) Prioridade(s): 2002.11.08 EP 02079676	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.08.17	(72) Inventor(es): MARK THEODOOR VERHAAR THOMAS KOCH ERWIN GERARDUS JACOBUS WARMERDAM NL NL NL
(45) Data e BPI da concessão: 2010.05.26 155/2010	(74) Mandatário: MARIA MANUEL RAMOS LUCAS LARGO DE S. DOMINGOS N.º 1 2910-092 SETÚBAL PT

(54) Epígrafe: **SÍNTESE DO ESTETROL VIA ESTERÓIDES DERIVADOS DA ESTRONA**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

SÍNTESE DO ESTETROL VIA ESTERÓIDES DERIVADOS DA ESTRONA

Campo técnico da invenção

A presente invenção refere-se à síntese de esteróides derivados via estrona de estetrol [estra-1,3,5(10)-trien-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol; CAS Nr. 15183-37-6; por conveniência, este composto neste Pedido de Patente é referido como "estetrol"], preferencialmente à síntese de estetrol a qual é obtida com um alto rendimento e um elevado grau de pureza.

Antecedentes da invenção

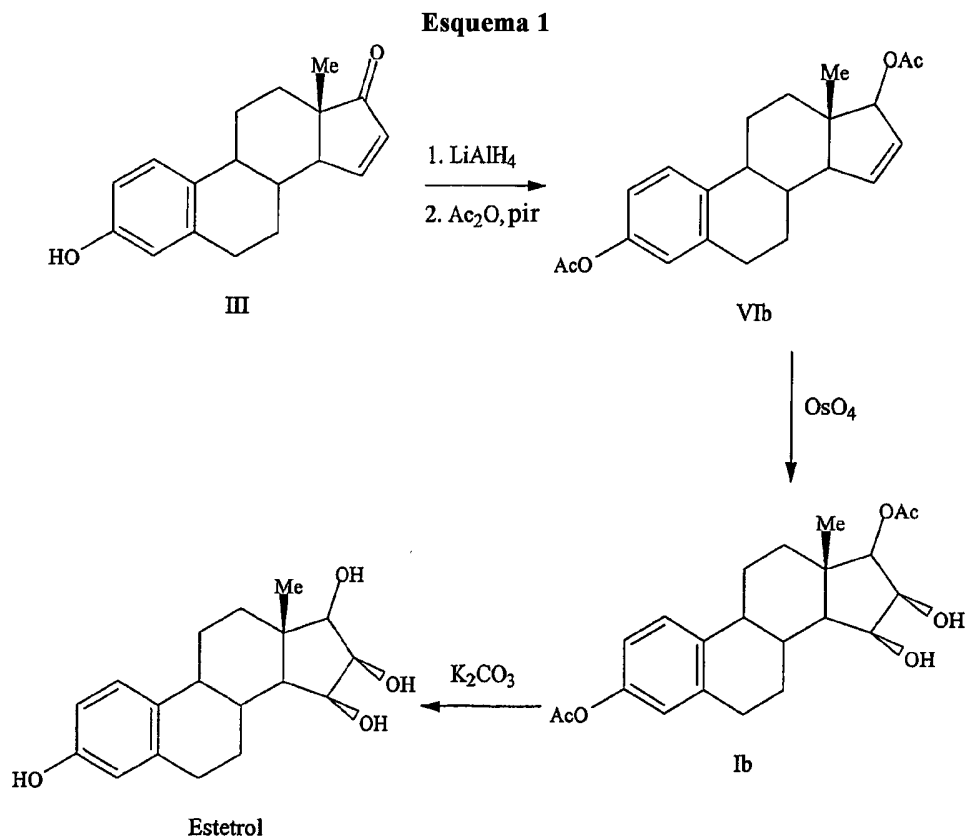
As substâncias estrogénicas comumente são usadas nos métodos de Tratamento Hormonal de Substituição (Hormone Replacement Therapy - HRT) e métodos contraceptivos femininos. Estas substâncias estrogénicas podem ser divididas em estrogénios naturais e estrogénios sintéticos. Exemplos de estrogénios naturais que têm encontrado aplicação farmacêutica incluem estradiol, estrona, estriol e estrogénios equinos conjugados. Exemplos de estrogénios sintéticos, os quais oferecem a vantagem de uma alta biodisponibilidade oral incluem etinilestradiol e mestranol.

Recentemente, foi descoberto que o estetrol é eficaz como substância estrogénica para ser usada na HRT, cuja descrição é dada no Pedido de Patente divisionária WO 02/094276 do Titular. O estetrol é um estrogénio biogénico que é produzido endogenamente pelo fígado fetal durante a gravidez humana. Outras aplicações importantes do estetrol são nas áreas dos contraceptivos, do tratamento de doenças auto-imunes, da prevenção e do tratamento dos tumores da mama e do cólon, a estimulação da libido, os cuidados da pele, e a cicatrização de feridas como o descrito nos Pedidos de Patentes divisionárias em nome do Titular WO 02/094276, WO 02/094279, WO 02/094278, WO

02/094275, EP 1511496 A1, EP 1511498 A1, WO 03/041718, WO 03/018026, EP 1526856 A1 e WO 04/0278032.

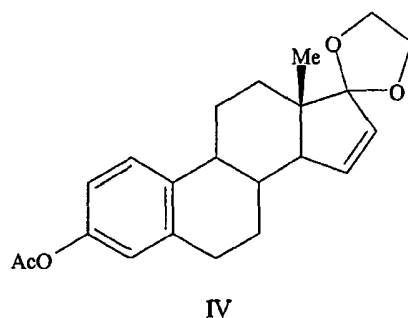
A síntese do estetrol e dos seus derivados numa base de escala de laboratório é conhecida da técnica: Fishman J., Guzik H., J. Org. Chem. 33, 3133 - 3135 (1968); Nambara T. et al., Steroids 27, 111 - 121 (1976); ou Suzuki E. et al., Steroids 60, 277 - 284(1995).

Fishman J., Guzik H., J. Org. Chem. 33, 3133 - 3135 (1968) descrevem uma síntese do estetrol bem sucedida a partir de um derivado de estrona (composto (III)); cf. para uma síntese do composto (III) Cantrall, E.W., Littell, R., Bernstein, S. J. Org. Chem 29, 214 - 217 (1964)). Numa primeira fase, o grupo carbonilo em C₁₇ do composto (III) é reduzido com LiAlH₄ a estra-1,3,5(10),15-tetraeno-3,17-diol (composto VIa) o qual foi isolado como o diacetato (composto VIb). O composto VIb foi submetido a uma cis-hidroxição da ligação dupla do anel D usando OsO₄ o qual resultou na formação de estra-1,3,5(10)-trieno-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol-3,17-diacetato (composto Ib) que sob aquecimento com K₂CO₃ em metanol produz estetrol (esquema 1).



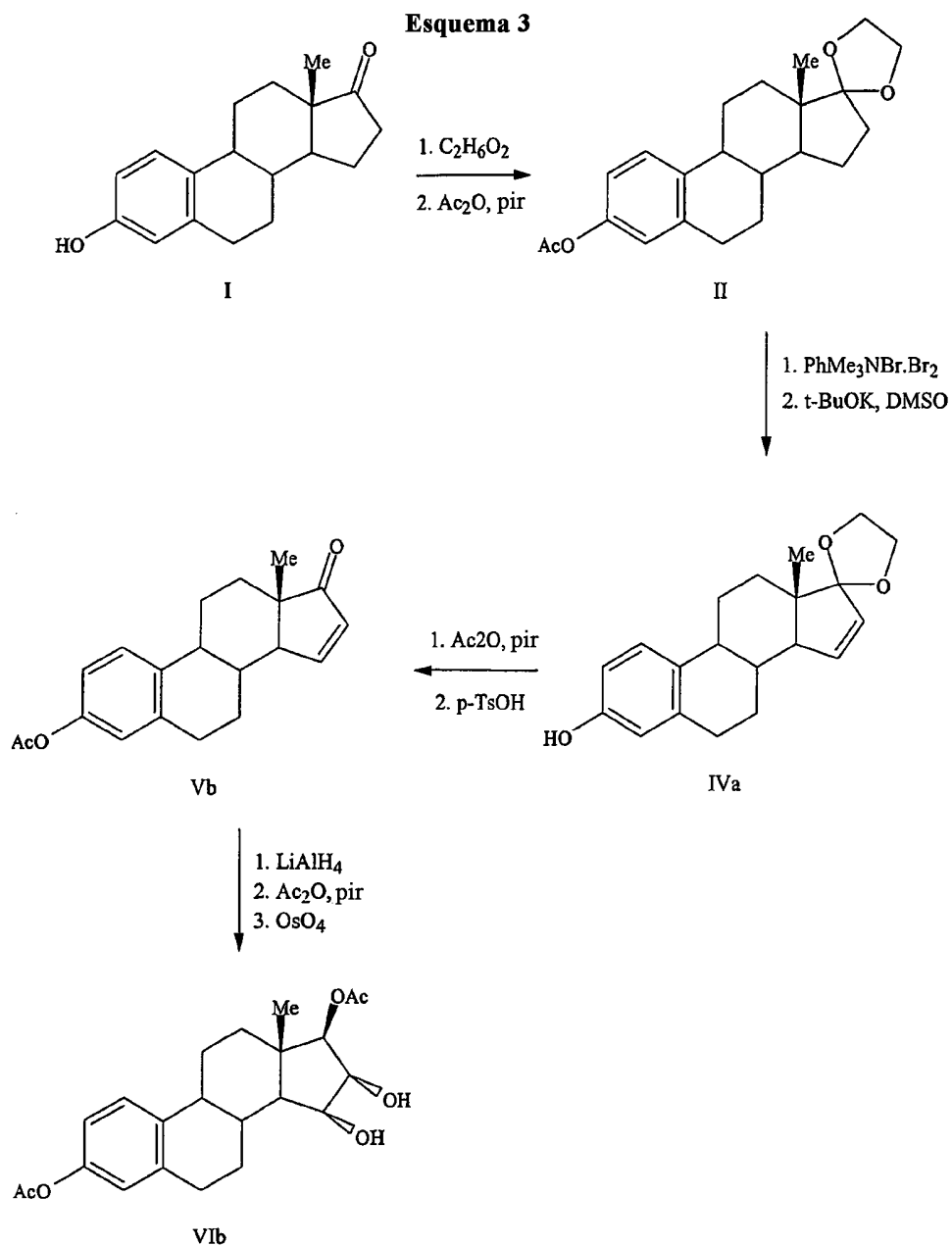
O rendimento global deste processo de três fases, é começando por derivado de estrona III, é de apenas aproximadamente 7%. É merecedor de ser salientado que o derivado protegido 17,17-etilenodioxiestra-1,3,5(10),15-tetraeno-3-ol-3-acetato (composto IV) poderá ser cis-hidroxiado para o seu derivado 15 α ,16 α -diol (composto Va), mas que depois o grupo dioxolano poderá não ser removido (ácido sulfônico de p-tolueno em acetona à temperatura ambiente) ou que a hidrólise (ácido sulfúrico aquoso em dioxano morno) do grupo dioxolano resulta numa mistura que contém uma grande quantidade de produtos(esquema 2).

Esquema 2



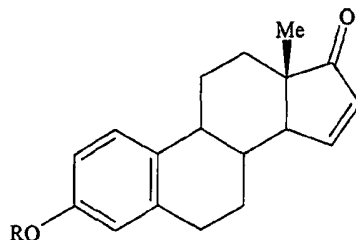
Nambara T. et al., *Steroids* 27, 111 - 121 (1976) descreve outra síntese do estetrol em que a estrona é a matéria-prima. O grupo carbonilo de estrona é primeiro protegido com um tratamento com etilenoglicol e hidrocloreto de piridina seguido da acetilação do grupo hidróxido em C₃. A seguinte sequência das fases envolveram uma bromação/desbromação catalisada de base resultando na formação de 17,17-etilenodioxiestra-1,3,5(10),15-tetraeno-3-ol (composto IVa). Este composto IVa é posteriormente acetilado o qual produziu 17,17-etilenodioxiestra-1,3,5(10),15-tetraeno-3-ol-3-acetato (composto IVb). Numa fase seguinte, o grupo dioxolano do composto IVb é hidrolisado usando ácido sulfônico de p-tolueno para o composto Vb, seguido posteriormente com a redução do grupo carbonilo em C₁₇ (composto Vc) e a oxidação da ligação dupla do anel D formando assim estra-1,3,5(10)-trieno-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol-3,17-diacetato (composto VIb). Ver esquema 3.

Suzuki E. et al., *Steroids* 60, 277 - 284 (1995) também descreve a síntese do estetrol usando o composto Vb de Nambara T. et al. como matéria-prima. O grupo carbonilo em C₁₇ deste composto foi primeiro reduzido seguindo-se uma acetilação que produziu estra-1,3,5(10),15-tetraeno-3,17-diol-3,17-diacetato (composto 2b). Este último foi submetido à oxidação com OsO₄ o qual proveu estra-1,3,5(10)-trieno-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol-3,17-diacetato (composto 3b) num rendimento de 46%.



De acordo com Nambara T. et al. e Suzuki E. et al., a síntese do estretol pode ser executada com um rendimento de aproximadamente 8%, começando a partir da estrona.

Poirier D., et al., *Tetraedron* 47, 7751 - 7766 (1991) descreve os seguintes compostos os quais são preparados de acordo com os métodos que têm sido usados para preparar compostos idênticos:



R = Benzilo, Metilo

Dionne, P. et al., *Steroids* 62, 674 - 681 (1997) descreve o composto acima mostrado onde R ou é metilo ou é t-butildimetilsilil.

Magnus, P. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120, 12486 - 12499 (1998) descreve que os métodos principais para a síntese de cetonas de α,β -insaturadas a partir de cetonas saturadas são

- (a) a halogenação seguida da desidroalogenação,
- (b) a utilização de derivados de enxofre ou de selênio,
- (c) DDQ e
- (d) a utilização de complexos de paládio(II).

Além disso, foi também descoberto que seguindo os métodos da técnica anterior acima mencionados, o estetrol com um elevado grau de pureza foi obtido sozinho num baixo rendimento quando um grupo acetilo foi usado como um grupo protector para o grupo 3-hidróxi de estra-1,3,5(10),15-tetraeno-3-ol-17-ona, em particular devido à sua sensibilidade à hidrólise e à solvólise. Em particular, a labilidade do grupo acetilo não só conduziu a

uma formação aumentada de subprodutos durante as reacções, mas também durante a cromatografia e a cristalização para a purificação dos produtos intermédios quando são usados solventes práticos como por exemplo o metanol. Portanto, é difícil isolar o estetrol purificado e os seus produtos intermédios com um bom rendimento.

Adicionalmente, a redução do grupo carbonilo em C₁₇ com LiAlH₄ procede com uma selectividade baixa desde que também sejam obtidas diferentes quantidades de β -estradiol (estra-1,3,5(10)-trien-3,17 β -diol). Obviamente, a formação deste subproduto reduz o rendimento assim como a pureza do produto desejado pelo qual são requeridas fases de purificação adicionais.

Os métodos da técnica anterior também empregam quantidades estequiométricas de OsO₄ na fase de oxidação que é conhecido por ser um composto tóxico e caro. Consequentemente, desde o ponto de vista da segurança e dos custos operacionais o uso deste reagente é indesejado.

Consequentemente, é um objectivo da presente invenção prover uma via de síntese para o estetrol pela qual altos rendimentos e elevados graus de pureza do estetrol sejam obtidos.

Ainda consequentemente, existe uma necessidade de uma síntese do estetrol em que a produção de subprodutos seja limitada, isto é preferencialmente menor do que o seu nível de detecção.

É um objectivo preferido da invenção prover uma síntese de estetrol em que um bom rendimento e uma boa pureza do estetrol sejam obtidos.

Por um bom rendimento, queremos dizer um rendimento de pelo menos 10%, preferencialmente maior do que 10%, mais

preferencialmente de pelo menos 12.5%, começando a partir da estrona (100%).

Por uma boa pureza, queremos dizer uma pureza de pelo menos 97%, preferencialmente de pelo menos 98%, mais preferencialmente de pelo menos 99%. Preferencialmente, as impurezas sozinhas não devem exceder 1%. Também é preferido que o β -estradiol não deva exceder o nível de detecção.

Para o objectivo da presente invenção, a determinação da pureza é feita com HPLC-MS. As condições seguintes são usadas:

HPLC-MS foi executada usando um Hewlett Packard 1100 series:

Coluna: Discovery C18 (150 x 4.6 mm) Supelco
Fase móvel: Solução A:Solução B = 70:30(5 min)→(10 min)→10:90 (5 min)
Fluxo: 1 ml/min
UV: 280 nm
Temp: 22 °C
MS: API-ES negativo

Solução A: 9.65 g NH₄OAc, 2250 ml H₂O, 150 ml MeOH, 100 ml CH₃CN
Solução B: 9.65 g NH₄OAc, 250 ml H₂O, 1350 ml MeOH, 900 ml CH₃CN

Foi agora descoberto que a protecção do grupo 3-OH de estra-1,3,5(10),15-tetraen-3-ol-17-ona com um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente um grupo metilo, ou um grupo benzilo C₇-C₁₂, preferencialmente um grupo benzilo, cumpre esta necessidade. De facto, foi descoberto que o uso de um grupo protector mais estável tal como um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente um grupo metilo, ou um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente um grupo benzilo, no grupo 3-OH não é clivado numa fase indesejada da síntese. Portanto a formação de subprodutos é limitada e a purificação dos produtos intermédios é mais prática.

Neste Pedido de Patente o termo "alquilo" inclui grupos alquilo lineares, ramificados e cíclicos tais como metilo, etilo, n-

propilo, i-propilo, c-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, c-butilo, n-pentilo, s-pentilo, t-pentilo, c-pentilo e metilciclobutilo. Adicionalmente, o grupo benzílico C₇-C₁₂ deve ser entendido como um grupo benzilo que pode ser substituído por um ou mais substituintes na posição orto, meta e/ou para do núcleo aromático, em que os substituintes são grupos alifáticos, opcionalmente substituídos por um ou mais hetero-átomos e/ou átomos de halogéneo que não interferem de forma adversa no processo sintético. Como será evidente para um técnico especializado, os grupos alquilo e benzílico destinam-se a ser grupos protectores e portanto estes grupos devem ser relativamente fáceis de adicionar e relativamente fáceis de remover sob condições que não tenham um efeito adverso na estrutura molecular das moléculas dos esteróides derivados da estrona.

Devido aos grupos protectores seleccionados que são usados e ao rendimento e à pureza obtidos, concluiu-se que a síntese descrita neste Pedido de Patente pode adequadamente ser transposta para uma escala industrial. Isto representa uma vantagem particular em comparação com a síntese à escala laboratorial comum que foi descrita na técnica anterior e que a dificultavam com as suas várias desvantagens como as acima descritas. De facto, um problema com a síntese industrial são as quantidades dos produtos químicos assim como a toxicidade e as suas propriedades nocivas que estão envolvidas, fazendo assim que os métodos à escala laboratorial da técnica anterior não sejam transponíveis para uma escala industrial. A razão que está por detrás desta replicação impossível é que normalmente o método conhecido ou não provê um rendimento suficiente, isto é pelo menos 10% para ser considerado economicamente viável desde um ponto de vista industrial e/ou produz subproduto(s) que necessita(m) pelo menos de uma fase de purificação subsequente, elevando assim o custo do método.

Consequentemente, é também outro objectivo preferido da invenção prover um método que seja conveniente para ser usado na Indústria.

Resumo da invenção

Consequentemente, num aspecto da presente invenção, esta provê um processo para a obtenção de 1,3,5(10)-estratrien-3, 15 α , 16 α , 17 β -tetraol que compreende as fases de:

- 1) 3-A-oxi-estra-1,3,5(10), 15-tetraen-17-ona em que A é um grupo protector;
- 2) redução do grupo 17-ceto;
- 3) protecção da função carbonilo reduzida de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10), 15-tetraeno-17-ona;
- 4) oxidar a ligação alqueno da fracção de ciclopentenol do acetilado 3-A-oxi-estra-1,3,5(10), 15-tetraen-17-ol; e
- 5) remover os grupos protectores; em que o grupo protector A é seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente de um grupo metilo, ou de um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente de um grupo benzilo.

Portanto, de acordo com este primeiro aspecto da invenção, é provido um processo para a preparação de estra-1,3,5(10)-trien-3, 15 α , 16 α , 17 β -tetraol (1) que compreende as fases de:

- 1) converter a estrona (7) em 3-A-oxi-estra-1,3,5(10), 15-tetraen-17-ona (6), em que A é um grupo protector;

2) reduzir o grupo 17-ceto de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) a 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17 β -ol (5);

3) proteger o grupo 17-OH de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17 β -ol (5) a 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4), em que C é um grupo protector;

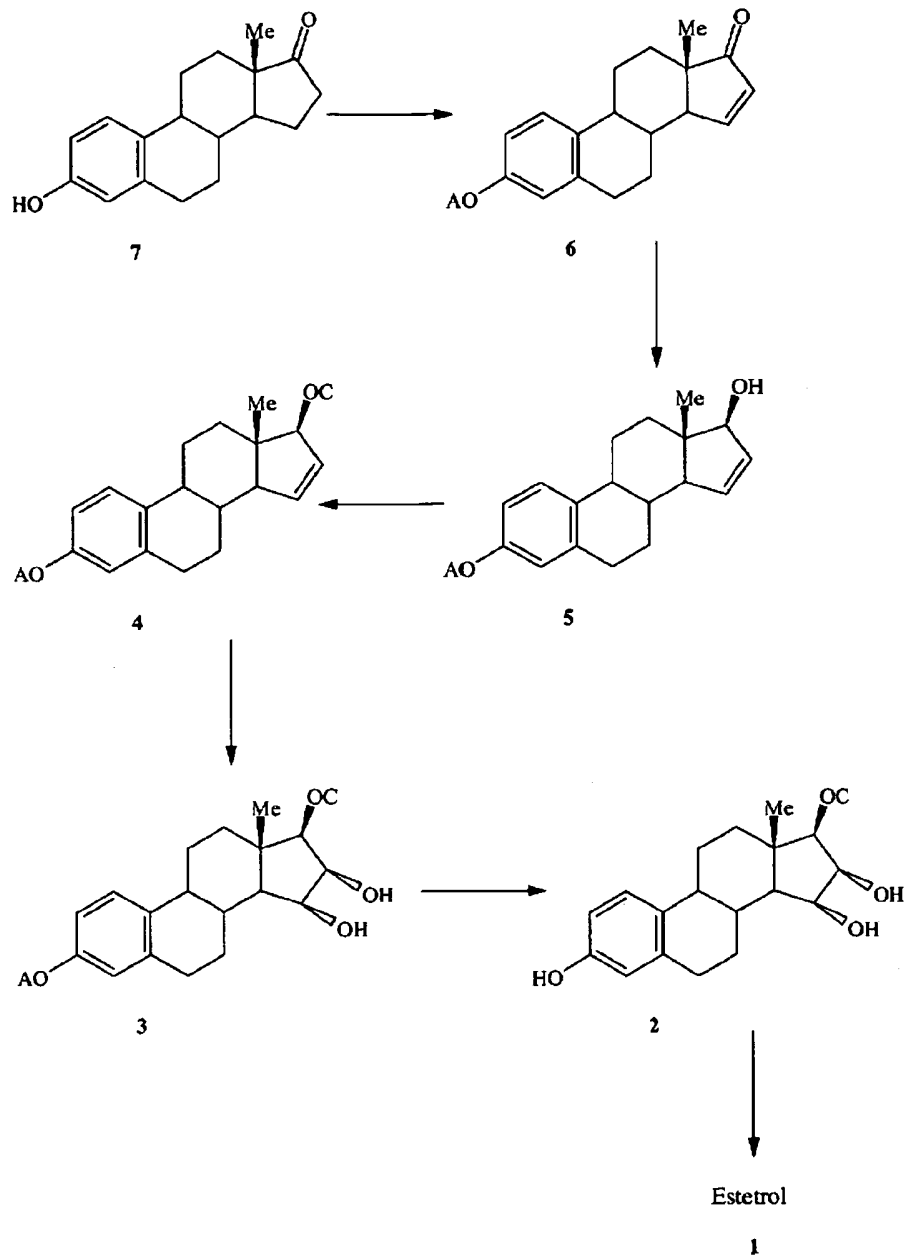
4) oxidar a ligação dupla de carbono-carbono do anel D de 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4) em estetrol protegido (3); e

5) remover os grupos protectores, em que preferencialmente o grupo protector A é removido primeiro para formar estetrol protegido 17-OC (2) e posteriormente o grupo protector C é removido para formar o estetrol (1);

em que o grupo protector A é seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente um grupo metilo, ou um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente o grupo benzilo, e o grupo protector C são seleccionados a partir dos grupos protectores hidroxilos monofuncionais alifáticos, estando os ditos grupos protectores hidroxilos monofuncionais alifáticos preferencialmente seleccionados do grupo constituído por carboxilatos C₁-C₅ em que o grupo alquilo dos carboxilatos é como o acima definido, sendo o dito grupo protector C mais preferido o acetilo.

O processo de acordo com este primeiro aspecto da invenção é mostrado no esquema 4.

Esquema 4



Noutro aspecto da invenção, é provido o uso do composto obtido como substância estrogénica, preferencialmente para cosméticos e/ou uso terapêuticas seleccionadas a partir do tratamento hormonal de substituição, contraceptivos, tratamento de doenças auto-imunes, a prevenção e o tratamento de tumores da mama e do

cólon, a estimulação da libido, os cuidados da pele, e a cicatrização de feridas.

Descrição detalhada da invenção

De acordo com um aspecto da invenção, esta provê um processo para a obtenção de 1,3,5(10)-estratrien-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol. O processo da invenção compreende as fases de:

1) prover um 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona, em que A é um grupo protector seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente de um grupo metilo, ou de um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente de um grupo benzilo.

Isto pode ser obtido por métodos conhecidos na técnica para fazer estes compostos como os dados em J. Am. Chem. Soc. 79, 2005 - 2009 (1957), "14-Isoestrone Methyl ether and its identity with totally synthetic material" by W. S. Johnson & W. F. Johns (A is Methyl); Biosci. Biotech. Biochem. 60, 411 - 414 (1996), "Synthesis of (14 β ,17 α)-14-Hydroxy- and (14 β ,17 α)-14-Dihydroxyestradiols and Their Activities" by M. Sakakibara and A.O. Uchida.

Foi ainda descoberto outro processo como eficaz para prover o 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno-17-ona (6) em que A é um grupo protector seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente de um grupo metilo, ou de um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente de um grupo benzilo. Este processo compreende as fases de:

Fase i) - proteger a função fenol da estrona por alquilação para obter uma estrona protegida;

Fase ii) - proteger a função carbonilo da estrona protegida obtida na fase a),

Fase iii) - formar uma ligação de alqueno na posição C₁₅-C₁₆ da estrona protegida obtida na fase b); e

Fase iv) - desproteger a função carbonilo.

Este processo para a preparação de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) compreende as fases seguintes:

(a1) conversão do grupo 3-OH de estrona (7) num grupo 3-AO para formar 3-A-oxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona(8);

(b1) conversão do grupo 17-ceto de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (8) num grupo ceto protegido para formar 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (9);

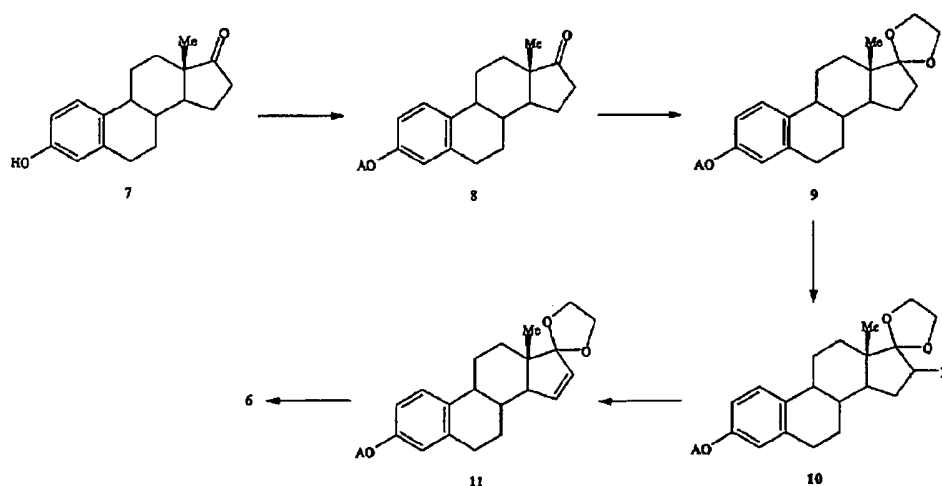
(c1) halogenação do C₁₆ de 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (9) para formar 3-A-oxi-16-X-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (10) em que X é um átomo halogéneo seleccionado do grupo de cloreto, brometo e iodeto e em que X é preferencialmente brometo;

(d1) desalogenação de 3-A-oxi-16-X-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (10) para 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (11); e

(e1) desprotecção do grupo ceto protegido de 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (11) para formar 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6), em que A é seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅, preferencialmente de um grupo metilo, ou de um grupo benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente um grupo benzilo, e em que D é dioxietileno.

O processo está representado no esquema 5.

Esquema 5



Fase (a)

A estrona (7) é um produto que está comercialmente disponível por Acros, Aldrich com o nome comercial estrona. Outros fornecedores de estrona são Andard-Mount Company Ltd., Diosynth B.V., Productos Quimicos Naturales S.A. de C.V.- Proquina, Schering AG, Mistsubishi Chemical Corporation.

A protecção do grupo 3-OH por alquilação é habitualmente realizada fazendo reagir a estrona com um componente seleccionado de um agente alquilante, preferencialmente um halogeneto de alquilo C₁-C₅, preferencialmente um halogeneto de metilo, ou um halogeneto benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente halogeneto de benzilo. Preferencialmente, o átomo de halogénio do agente alquilante é brometo, cloreto ou iodeto, da forma mais preferida brometo ou iodeto. De acordo com a presente invenção, o agente alquilante mais preferido é o brometo de benzilo ou iodeto de metilo, sendo o brometo de benzilo mais preferido que o iodeto de metilo. No entanto, de acordo com a invenção, é possível usar um dialquilo sulfato em vez de um halogeneto alquilo C₁-C₅, em que os grupos alquilo contêm entre 1 e 5 átomos de carbono e em que os grupos alquilo são preferencialmente

metilo (isto é, que o dialquilo sulfato preferido é o sulfato de dimetilo). Contudo, de acordo com esta forma de realizar a invenção, o agente alquilante mais preferido é o brometo de benzilo.

De acordo com esta terceira forma de realizar a presente invenção, é particularmente preferido suspender primeiro a estrona (7) e o carbonato de potássio numa mistura de diclorometano (DCM)/metanol. Uma mistura 1:1 de DCM/metanol é a preferida. O agente alquilante, halogeneto benzílico C₇-C₁₂, preferencialmente brometo de benzilo é adicionado, e a mistura resultante é refluída durante um período de 8 - 16 horas. É preferido refluir a mistura durante 16 horas. A mistura da reacção é seguidamente arrefecida à temperatura ambiente (Room Temperature - RT). O produto é isolado filtrando os sólidos. O bolo de filtração é lavado com um solvente prótico, preferencialmente metanol. O filtrado é concentrado até dar uma suspensão a qual é filtrada e lavada com heptanos até obter o produto como um sólido branco. O produto pode ser purificado com a recristalização de uma mistura de DCM e MeOH para obter um sólido cristalino branco, em que o rácio preferido de DCM:MeOH é 1:2.

Em particular, é preferido suspender primeiro a estrona (7) e o carbonato de potássio em DMF. O halogeneto alquilo C₁-C₅, preferencialmente o iodeto de metilo, é adicionado com arrefecimento, seno a temperatura mantida entre 18° e 22 °C. A mistura resultante é agitada durante um período de tempo à RT, preferencialmente durante 5 dias. A mistura da reacção foi entornada na água e agitada durante 2 horas. O produto é recolhido por filtração e lavado com água. O produto é seco até obter um sólido cristalino branco.

Fase b)

A protecção do grupo 17-ceto é preferencialmente realizado fazendo reagir 8 com etilenoglicol usando um ácido catalisador como o ácido sulfónico p-tolueno, piridina HCl, ácido sulfúrico ou ácido acético e um solvente seleccionado de entre dimetoxietano, tolueno, benzeno, ortoformato de trimetilo ou ortoformato de trietilo. Mais preferencialmente a reacção foi realizada com etilenoglicol, ortoformato de trietilo e ácido p-toluenosulfónico.

Em particular, é preferido suspender 8 numa mistura de ortoformato de trietilo e etilenoglicol num rácio de volume preferido de 4:3, mais preferencialmente de 2:1. Posteriormente, o ácido p-toluenosulfónico é adicionado e a mistura da reacção é agitada durante um período de tempo a 35 °C. Preferencialmente, depois de 1 - 16 horas, preferencialmente aproximadamente 3 horas, a mistura é entornada numa mistura de gelo/água e piridina. Depois de agitar durante 1 h o produto é recolhido por filtração, lavado com água e seco até obter o produto como um sólido branco.

De forma alternativa, também foi descoberto que as fases (a) e (b) podem ser vantajosamente executadas simultânea ou sequencialmente sem a necessidade de uma purificação e/ou um isolamento dos produtos intermédios enquanto que por outro lado é obtido um produto final com um bom rendimento e uma boa pureza. Isto é particularmente vantajoso para ser usado na Indústria em que a redução do número de fases do processo provê uma vantagem económica assim como uma simplificação do processo eliminando a necessidade de uma fase adicional como a da purificação e/ou a do isolamento entre as duas fases.

Se o processo é feito sequencialmente, a ordem para realizar a síntese é preferencialmente ter primeiro a protecção do grupo 3-OH (fase (a)) e seguidamente a protecção do grupo 17-ceto (fase (b)). Ainda assim, é preferido ter realizado primeiro a fase (b) e depois a fase (a) De facto, usando esta ordem, foi descoberto

que no processo industrial foi reduzida a formação de subprodutos.

Assim, é provido um processo para a obtenção de um 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona em que A é o grupo protector seleccionado de um grupo alquilo C_1-C_5 , preferencialmente um grupo metilo, ou um grupo benzílico C_7-C_{12} , preferencialmente um grupo benzilo, compreendendo o processo as fases de:

Fase ia) proteger a função carbonilo da estrona para obter uma estrona protegida;

Fase iia) proteger a função fenol da estrona protegida obtida na fase ia) por alquilação,

Fase iii) formar uma ligação de alqueno na posição $C_{15}-C_{16}$ da estrona protegida obtida na fase iia);

Fase iv)- desproteger a função carbonilo;

onde as fases ia) e iia) foram executadas simultânea ou sequencialmente sem purificação e/ou sem isolamento do produto intermédio obtido.

Este processo para a preparação de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) compreende as fases seguintes:

(a2) conversão do grupo 17-ceto de estrona (7) num grupo ceto protegido para formar 17-D-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol (12);

(b2) conversão do grupo 3-OH de 17-D-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol (12) num grupo 3-AO para formar 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (9);

(c2) halogenação de C_{16} de 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (9) para formar 3-A-oxi-16-X-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (10) em

que X é um átomo de halogénio seleccionado do grupo de cloreto, brometo e iodeto e em que X é preferencialmente brometo;

(d2) desalogenação de 3-A-oxi-16-X-17-D-estra-1,3,5(10)-trieno (10) para 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (11); e

(e2) desprotecção do grupo ceto protegido de 3-A-oxi-17-D-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (11) para formar 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6),

em que A foi seleccionado de um grupo alquilo C_1-C_5 , preferencialmente um grupo metilo, ou um grupo benzílico C_7-C_{12} , preferencialmente um grupo benzilo, e onde D é dioxietileno.

Preferencialmente, isto é obtido agitando uma mistura de estrona (7), etilenoglicol e ortoformato de trietilo à qual depois foi seguidamente adicionada uma quantidade catalítica de ácido, preferencialmente de ácido sulfónico p-tolueno. A temperatura da reacção foi seguidamente aumentada entre aproximadamente 40 °C e aproximadamente 60 °C, preferencialmente a aproximadamente 45 °C. O composto aquoso foi agitado à mesma temperatura até à finalização da reacção, isto é a protecção da função carbonilo da estrona. A conversão foi controlada com HPLC. Ao composto aquoso foi-lhe adicionado uma solução de base, preferencialmente metóxido de sódio em metanol, dando como resultado uma solução amarela clara. Usando esta base, o grupo 3-OH foi completamente deprotonado, o qual permite vantajosamente o uso de cloreto benzílico C_7-C_{12} menos reactivo mas mais económico, preferencialmente cloreto de benzilo, no processo de alquilação. A temperatura foi aumentada para 65 °C. Esta alta temperatura permite também uma boa cristalização do produto. Apesar de que possam ser usadas temperaturas inferiores tais como até 20 °C, pensamos que a baixa temperatura incorreria numa reactividade inferior, e assim tempos de reacção maiores e provavelmente em conversões incompletas. O cloreto benzílico C_7-C_{12} , preferencialmente cloreto de benzilo, foi seguidamente

adicionado passados alguns minutos, como por exemplo 5 minutos, durante o qual a solução tornou-se turva e foi-se espessando lentamente até obter um composto aquoso. Depois de 1.5 hora a conversão foi controlada com HPLC, normalmente uma conversão >95%, foi observada a qual é suficiente para continuar o processamento.

A mistura é arrefecida com agitação até 20 °C, e seguidamente o produto sólido é isolado por filtração. O sólido é então lavado e seco.

Fase 3)

A formação da ligação dupla carbono-carbono no anel D é preferencialmente realizada com as fases (c2) e (d2) acima definidas.

A halogenação é realizada com um agente halogenante. Os agentes halogenantes preferidos são seleccionados de brometo, perbrometo de feniltrimetilamónio ou perbrometo de brometo de pirídínio. Um agente halogenante mais preferido para ser usado na presente invenção é o perbrometo de brometo de pirídínio. O solvente é seleccionado de CHCl_3 , dioxano, dimetoxietano, etilenoglicol ou THF. O solvente preferido é THF sem nenhum co-solvente.

Em particular, é preferido dissolver o composto previamente obtido 9 em dimetoxietano, o qual é posteriormente adicionado a uma solução do reagente de brometo numa mistura de etilenoglicol e dimetoxietano. A mistura resultante é agitada até à finalização da reacção. Preferencialmente passadas 16 horas o produto é isolado. Uma solução de tiosulfato de sódio pentahidrato em água é adicionada à mistura da reacção. O produto é extraído com um solvente orgânico, preferencialmente diclorometano. O extracto é seco usando sulfato de sódio e os solventes são evaporados até obter um óleo viscoso o qual pode ser vantajosamente usado sem purificação adicional.

No entanto, é ainda mais preferido dissolver o composto 9 em THF puro e executar a reacção à temperatura ambiente durante menos de duas horas, seguida da remoção do THF por destilação, e adicionar um solvente essencial não miscível com água, preferencialmente tolueno. A água pode seguidamente ser removida do produto 10 por destilação azeotrópica. Antes de que a fase seguinte seja executada, a solução de tolueno 10 é concentrada e seca e o solvente a ser usado na fase seguinte é adicionado.

A reacção de desidroalogenação é realizada usando uma base seleccionada de tert-butóxido de potássio, DBU (1,8-diazabicyclo[5,4-0]undec-7-eno) ou hidróxido de potássio e é preferencialmente tert-butóxido de potássio. O solvente é seleccionado de benzeno, xileno, metanol ou DMSO. A base e o solvente mais preferidos para serem usados nesta fase são respectivamente tert-butóxido de potássio e dimetilsulfóxido (DMSO).

Em particular, é preferido adicionar uma suspensão do composto previamente obtido 10 em DMSO a uma solução de tert-butóxido de potássio em DMSO. A mistura resultante foi seguidamente agitada até à finalização da reacção. Preferencialmente depois de aproximadamente 2 horas a mistura da reacção foi entornada numa mistura de gelo e água. O produto foi extraído com um solvente orgânico, preferencialmente DCM. O extracto foi seco usando sulfato de sódio e os solventes são evaporados até obter um óleo viscoso o qual pode ser usado sem purificação adicional.

No entanto, é ainda mais preferido executar a fase de desidroalogenação durante menos de uma hora e executar a extracção com tolueno a aproximadamente 60 °C. Além disso, a solução de tolueno do composto 11 foi preferencialmente seco por destilação azeotrópica antes de realizar a fase seguinte.

Fase 4)

A desprotecção da função carbonilo é preferencialmente realizada por um componente seleccionado do ácido p-toluenossulfónico, p-toluenossulfonato de piridínio, e cloreto de piridínio, preferencialmente ácido p-toluenossulfónico mono-hidrato. Mais preferencialmente, a desprotecção é executada usando ácido p-toluenossulfónico mono-hidrato na presença de acetona aquosa como solvente.

Em particular, é preferido adicionar ácido p-toluenossulfónico mono-hidrato a uma solução do composto previamente obtido em acetona aquosa, preferencialmente com 10 - 20% de água. A mistura é agitada até à finalização da reacção. Preferencialmente passadas aproximadamente 3 horas, o DCM e o bicarbonato de sódio aquoso saturado são adicionados. Depois de separar as camadas, a camada aquosa foi extraída com DCM. Os extractos combinados são lavados com solução salina e concentrados para dar a suspensão. O produto é recolhido por filtração e é lavado com solventes orgânicos, preferencialmente com acetona e heptano frios. O produto pode ser purificado por recristalização.

No entanto, é ainda mais preferido executar esta fase de desprotecção em acetona aquosa (com um teor de água de aproximadamente 10%) durante a qual o produto 6 cristaliza a partir da solução. Para melhorar o processo de cristalização, é adicionada água após a finalização da reacção a qual provê cristais refinados que são facilmente recolhidos por filtração e elimina a necessidade de outra purificação, por exemplo por recristalização.

A 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) obtida é vantajosamente usada no processo para a obtenção de estetrol.

2) redução do grupo 17-ceto

A redução do grupo 17-ceto é preferencialmente executada fazendo reagir 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) com um agente redutor seleccionado do grupo de compostos de hidreto de metal, compreendendo o dito grupo de compostos de hidreto de metal preferencialmente LiAlH_4 , AlH_3 , NaBH_4 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, ZnBH_4 , e $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$. Mais preferencialmente o composto de hidreto de metal é $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$. Os agentes redutores mais preferidos para serem usados na presente invenção são aqueles que provêm uma redução quimi- e estereo-selectiva do grupo 17-ceto em favor da posição β . Por esta razão, o agente redutor quimi- e estereo-selectivo mais preferido para ser usado na presente invenção é NaBH_4 em combinação com hidrato CeCl_3 , preferencialmente o heptahidrato.

Em particular, é preferido suspender 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) e heptahidrato CeCl_3 numa mistura de um solvente prótico, preferencialmente MeOH e THF, e agitar a mistura durante aproximadamente 1 h à temperatura ambiente. Um rácio de volume preferido entre MeOH e THF é entre 2:1 e 4:1. Seguidamente a mistura é arrefecida, preferencialmente entre 0 °C e 5 °C, e o NaBH_4 é adicionado em porções pequenas mantendo a temperatura abaixo de 8 °C. Depois de um período de tempo, preferencialmente de 2 horas, 1 N NaOH e DCM são adicionados. Depois de 30 minutos de agitação, as camadas são separadas e a camada aquosa é extraída com DCM. Os extractos orgânicos combinados são secos com sulfato de sódio e concentrados até obter o produto como um sólido branco.

No entanto, é ainda mais preferido temperar a mistura da reacção com um ácido, preferencialmente 2 N HCl, para remover os solventes por destilação a vácuo a entre aproximadamente 30 °C e aproximadamente 40 °C e adicionar tolueno. Preferencialmente, a temperatura é seguidamente aumentada para aproximadamente 70 °C para induzir a fase de separação. A fase orgânica é seguidamente separada, e é lavada com uma solução aquosa de Na_2CO_3 e água. A

fase orgânica final é seca por destilação azeotrópica, arrefecida até aproximadamente 50 °C e usada para a fase seguinte.

3) Proteger a função carbonilo reduzida de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona, isto é, proteger o grupo 17-OH de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17b-ol (5) para formar 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4), em que C é um grupo protector.

O grupo 17-OH é protegido seleccionando preferencialmente por acetilação usando um reagente seleccionado a partir de anidrido acético ou cloreto de acetilo. Preferencialmente, o anidrido acético é o usado.

Em particular, é preferido tratar uma solução do composto em piridina com anidrido acético e 4-dimetilaminopiridina. A mistura foi agitada durante um período temporal. Preferencialmente depois de 2 horas à temperatura ambiente os voláteis são removidos. O resíduo é dissolvido em acetato de etilo (EtOAc) e a solução resultante é lavada com água e solução salina. A solução é seca usando sulfato de sódio e concentrada até obter o produto bruto. A recristalização de uma mistura de solventes orgânicos, preferencialmente acetato de etilo, heptano e etanol dá o produto como um sólido branco.

No entanto, dado que a 4-dimetilaminopiridina é tóxica e difícil de remover por destilação, é mais preferido executar a reacção com uma trialkilamina, preferencialmente trietilamina, e um halogeneto acetilo (aproximadamente dois equivalentes), preferencialmente cloreto de acetilo (aproximadamente 1.5 equivalente) em tolueno entre aproximadamente 25 °C e aproximadamente 60 °C, preferencialmente entre aproximadamente 40 °C e aproximadamente 50 °C. O tratamento final é seguidamente executado lavando depois com água, ácido aquoso e base aquosa. A purificação do produto é seguidamente obtida por cristalização,

isto é removendo o tolueno por destilação, dissolvendo o produto bruto em acetato de etilo e aquecendo esta solução entre aproximadamente 70 °C e aproximadamente 80 °C. A esta solução aquecida, partes pequenas de etanol são adicionadas para induzir a cristalização (o rácio preferido de acetato de etilo para etanol é de aproximadamente 1 para aproximadamente 8).

4) Oxidar a ligação de alquenos do grupo ciclopentenol do acetilado 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ol, isto é, oxidar a ligação dupla carbono-carbono do anel D de 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4) para o estetrol protegido (3)

A oxidação da ligação dupla carbono-carbono no anel D é realizada com um agente oxidante provendo cis-hidroxição selectiva da ligação dupla carbono-carbono. Preferencialmente, o agente oxidante é tetróxido de ósmio e mais preferencialmente o agente oxidante é tetróxido de ósmio imobilizado em PVP ($\text{OsO}_4\text{-PVP}$) que é usado numa quantidade catalítica (cf. G. Cainelli, M. Contento, F. Manesclachi, L. Plessi, *Synthesis*, 45 - 47 (1989)) em combinação com um co-oxidante seleccionado de trimetilamina-N-óxido, N-metil morfolina-N-óxido ou peróxido de hidrogénio, preferencialmente trimetilamina-N-óxido. Mais preferencialmente, $\text{OsO}_4\text{-PVP}$ e trimetilamina-N-óxido são usados com THF como solvente.

Em particular, é preferido adicionar $\text{OsO}_4\text{-PVP}$ a uma solução aquecida do composto preparado na fase anterior em THF. Preferencialmente, a adição é executada a 50 °C seguida da adição de trimetilamina-N-óxido. Preferencialmente, a adição de trimetilamina-N-óxido é executada em porções durante 1 hora. A mistura é agitada a esta temperatura durante um período de tempo. Preferencialmente, passadas 12 horas a mistura é arrefecida à temperatura ambiente e é filtrada. Os voláteis são removidos e o resíduo é dissolvido em acetato de etilo e adiciona-se água. A camada aquosa é acidificada e as camadas são

separadas. A camada aquosa é extraída com acetato de etilo. Os extractos combinados são secos com sulfato de sódio e são concentrados. O resíduo resultante é triturado com heptanos e acetato de etilo para obter o produto como um precipitado branco que é filtrado. O produto é purificado por recristalização a partir de uma mistura de solventes orgânicos, preferencialmente acetato de etilo, heptano e etanol para dar o produto como um sólido branco.

5) Remoção dos grupos protectores A e C

A remoção dos grupos protectores é também um aspecto importante do processo da presente invenção. De facto, foi descoberto que nem todos os grupos protectores podem ser removidos sem efeitos adversos no produto obtido. Assim, onde por exemplo um grupo metilo é usado como o grupo protector para o grupo 3-OH, foi descoberto que a remoção com piridina HCl conduz à decomposição do produto.

Consequentemente, foi descoberto que a remoção do grupo alquilo C₁-C₅ protector é preferencialmente executada usando BBr₃ sem conduzir a uma maior decomposição do produto.

A remoção do grupo benzílico C₇-C₁₂ protector é preferencialmente executado usando condições de hidrogenação catalíticas (Pd/H₂) como são bem conhecidas do técnico especializado.

Em particular, é preferido dissolver a estrona protegida (estetrol protegido (3)) num solvente prótico, preferencialmente metanol. Uma quantidade catalítica do 10% de Pd em carbono foi adicionada como uma suspensão pré-formada em metanol e a mistura foi colocada sob uma atmosfera de hidrogénio, preferencialmente 1 atmosfera. Depois de agitar a mistura durante 3 horas à temperatura ambiente ela foi filtrada sobre Celite. O filtrado é concentrado até obter estetrol protegido 17-OC (2) como um sólido branco.

A remoção do grupo protector C é eficaz usando um solvente prático tal como metanol e uma base, preferencialmente K_2CO_3 , para produzir estetrol.

Em particular, é preferido dissolver o composto obtido na fase anterior em metanol. O carbonato de potássio foi adicionado e a mistura é agitada durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois os voláteis são evaporados e água e clorofórmio são adicionados. A mistura é neutralizada com 0.1 N HCl e o produto é recolhido por filtração. Seguidamente ele é lavado com água e seco para obter estetrol como um sólido branco.

De forma alternativa, a ordem das duas fases de desprotecção anteriores pode ser invertida. Assim, a desprotecção completa pode ser realizada desprotegendo primeiro o grupo protector C seguida da hidrogenação catalítica para remover o grupo protector A em que A é um grupo benzílico C_7-C_{12} protector. Estes procedimentos são idênticos aos acima descritos. No entanto, é preferido que a primeira ordem das fases de desprotecção que foram anteriormente descritas do que as últimas, isto é que de acordo com a invenção é preferido primeiro remover o grupo protector A e posteriormente o grupo protector C.

De acordo com uma forma mais preferida de realizar esta fase, as reacções de desprotecção, isto é a remoção de A e C, são executadas numa única fase se A é um grupo benzílico C_7-C_{12} protector. Preferencialmente, o composto 3 é dissolvido num álcool de alquilo C_1-C_3 , preferencialmente metanol, e submetido à hidrogenação à temperatura ambiente durante a noite. Posteriormente, a solução do composto 2 é preferencialmente usado na fase posterior, isto é a remoção de C como o acima descrito. O tratamento final da mistura da reacção foi seguidamente executada concentrando a solução a aproximadamente 20% do seu volume original e adicionando uma quantidade de água aproximadamente igual ao volume da solução concentrada.

Posteriormente, o ácido concentrado, preferencialmente HCl concentrado, é adicionado gota a gota dando como resultado uma suspensão branca a qual é filtrada, lavada com água e seca.

Os compostos e os produtos intermédios que são em particular preferidos de acordo com a presente invenção são:

- o composto de acordo com a fórmula 2, em que C é acetilo.
- os compostos de acordo com a fórmula 3, em que A é metilo ou benzilo, preferencialmente benzilo, e onde C é acetilo.

Aplicações

Noutro aspecto da presente invenção é provido o uso do produto como o obtido pelo processo da invenção para a fabricação de uma composição farmacêutica, preferencialmente para o uso num método seleccionado de um método para o tratamento hormonal de substituição, um método para tratar a secura vaginal, um método contraceptivo, um método para estimular a libido, um método para o tratamento da pele, um método para estimular a cicatrização de uma ferida, e um método para tratar ou prevenir um transtorno seleccionado do grupo constituído por doenças auto-imunes, tumores de mama e tumores colo-rectais.

Noutro aspecto da presente invenção é provido o uso cosmético/estético do produto como o obtido pelo processo da invenção para o tratamento da pele.

Exemplos

Os seguintes são exemplos de síntese não limitativos para a síntese de estetrol de acordo com a invenção:

São usados os seguintes métodos e materiais para a determinação:

Os espectros 1H RMN são registados num aparelho Varian de 200 MHz em CD30D.

Um HPLC-MS foi executada usando um Hewlett Packard 1100 series:
HPLC-MS foi executada usando um Hewlett Packard 1100 series:

Coluna: Discovery C18 (150 x 4.6 mm) Supelco
Fase móvel: Solução A:Solução B = 70:30(5 min)→(10 min)→10:90 (5 min)
Fluxo: 1 ml/min
UV: 280 nm
Temp: 22 °C
MS: API-ES negativo

Solução A: 9.65 g NH₄OAc, 2250 ml H₂O, 150 ml MeOH, 100 ml CH₃CN
Solução B: 9.65 g NH₄OAc, 250 ml H₂O, 1350 ml MeOH, 900 ml CH₃CN

A DSC foi medida usando um aparelho Mettler Toledo DSC822.

Exemplo 1, 3, Benziloxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (composto 8, A = benzilo)

A uma suspensão de estrona (7; 100 g, 0.370 mol) e K₂CO₃ (160 g, 1.16 mol) em DCM/MeOH (800 ml, rácio 1:1 v/v) à temperatura ambiente adicionou-se-lhe brometo de benzilo (132 ml, 1.10 mol) numa parte. A mistura resultante foi refluída durante 16 h (50% de conversão passadas 4 h de acordo com TLC). A mistura da reacção foi arrefecida a RT e os sólidos foram filtrados. O bolo da filtração foi lavado com MeOH. A solução foi concentrada (até um volume total de aproximadamente 300 ml). O precipitado que foi formado foi recolhido por filtração e foi lavado com heptanos até obter um sólido branco. O filtrado também foi concentrado (até um volume total de 100 ml) e triturado com heptano. O precipitado resultante foi filtrado e combinado com o primeiro lote do produto. O produto (153 g, max 0.370 mol) ainda continha traços de brometo de benzilo mas foi usado sem outra purificação. O produto pode ser purificado a partir da recristalização de DCM/MeOH (1/2). TLC: R_f = 0.5

(heptanos/acetato de etilo = 4/1); HPLC-MS: 91%; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.60-7.24 (m, 5H), 7.49 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.87 (dd, 1H, J₁ = 2.6 Hz, J₂ = 8.4 Hz), 6.82 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.12 (s, 2H), 3.05-2.90 (m, 2H), 2.66 - 2.01 (m, 5H), 1.77 -1.47 (m, 8H), 0.99 (s, 3H) ppm.

Exemplo 2 17,17-Etilenodioxo-3-benziloxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (composto 9; A = benzilo, C = etileno dioxo)

3-Benzil-estrone (composto 6, A = benzilo; 153 g (cru), max. 0.370 mol) foi suspenso numa mistura de ortoformato de trietilo (320 ml) e de etilenoglicol (160 ml). Mono-hidrato de p-TsOH (5 g, 26.3 mmol) foi adicionado e a suspensão cor-de-rosa resultante foi agitada durante 3 h a 35 °C (TLC indicou a conversão completa depois de 1.5 h). A mistura foi arrefecida a RT, entornada numa mistura de água gelada (2 l) e piridina (40 ml). O precipitado resultante foi recolhido por filtração e foi lavado com água (150 ml). O sólido branco restante foi seco azeotropicamente por esgotamento com tolueno (2 x 200 ml) para obter o produto (153 g, max. 0.370 mmol) como material cristalino branco. TLC: R_f = 0.3 (heptanos/acetato de etilo = 9/1); ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.60-7.24 (m, 5H), 7.29 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 6.86 (dd, 1H, J₁ = 2.6 Hz, J₂ = 8.4 Hz), 6.80 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.11 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 3.05-2.90 (m, 2H), 2.46 - 1.28 (m, 13H), 0.96 (s, 3H) ppm.

Exemplo 3 17,17-Etilenodioxo-3-benziloxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (composto 9; A = benzilo, C = etileno dioxo)

Um matrás de reação equipado com agitador mecânico, termómetro, purga de nitrogénio, condensador e funil com torneira foi usado para o processo. O matrás foi carregado com 27 g (100 mmol) de estrone, 50 ml (55g, 9 equivalentes) de glicol e 24 g de trietilortoformato. A mistura resultante foi agitada, 0.5 g de ácido toluenossulfónico foi-lhe adicionada e a temperatura da

reação foi aumentada para 45 °C. A aproximadamente 35-40 °C foi observado um exotérmico. O composto aquoso foi agitado durante 1 hora a 45 °C. A conversão foi controlada com LC. Normalmente depois de 1 hora é observada uma conversão quase completa. Ao composto aquoso uma solução de metóxido de sódio em metanol (30% em peso; 1.1 equivalentes) foi adicionada desde o funil com torneira dando como resultado uma solução amarela clara. A temperatura foi aumentada para 65 °C e 15 g de cloreto de benzilo são adicionados depois de 5 minutos. Em poucos minutos a solução ficou turva e foi espessando lentamente até ficar como um composto aquoso. Depois de 1.5 horas a conversão foi controlada com LC, normalmente foi observada uma conversão >95%, a qual é suficiente para outro processamento.

A mistura foi deixada arrefecer até 20 °C com agitação, e seguidamente o produto sólido é isolado por filtração. O sólido é lavado com metanol (2*30 ml) e seco sob condições atmosféricas.

Uma quantidade de 33-34 g de produto é obtida com uma pureza orgânica >97%.

Exemplo 4 16-Bromo-17,17-etilenedioxi-3-benziloxi-estra-1,3,5(10)-trien-17-ona (composto 10, X = Br, A = benzilo, B = etileno dioxi)

O perbrometo de brometo de piridínio (120 g, 375 mmol, 1.44 equiv) foi dissolvido numa mistura de etilenoglicol (120 ml) e éter dimetílico de etilenoglicol (200 ml). Acetal com etilenoglicol 3-benzil-estrone (composto 4; A = benzilo, C = etilenodioxi; 153 g (cru), max. 0.370 mol) foi dissolvido em éter dimetílico de etilenoglicol (400 ml) e posteriormente nos 5 minutos seguintes adicionado ao reagente bromante. A mistura ficou imediatamente amarela e foi agitada durante 16 h a RT (TLC mostrou que 50% da reação depois de 2 h se tinha convertido). Uma solução de Na₂S₂O₃-5H₂O (205 g, 0.83 mol) em água (700 ml) foi

adicionada à mistura da reacção. DCM (1 l) foi adicionado e as camadas foram separadas. A camada aquosa foi extraída com DCM (2 x 200 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água (300 ml) e solução salina (300 ml), secas (Na_2SO_4) e concentradas in vacuo para produzir o produto brominado (180 g, max. 0.370 mol) como um sólido amarelo o qual foi usado sem outra purificação para a fase seguinte. TLC: $R_f = 0.25$ (heptanos/acetato de etil = 9:1); HPLC-MS: 2 diastereómeros (juntos 85%) subprodutos menores presentes; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.60-7.20 (m, 5H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 5.10 (s, 2H), 4.63 (m, 1H), 4.08 (m, 4H), 2.93 (m, 2H), 2.41 - 1.38 (m, 11H), 0.98 (s, 3H) ppm.s

Exemplo 5 17,17-Etilenedioxi-3-benziloxi estra-1,3,5(10),15-tetraeno (composto 11; A = benzilo, B = etileno dioxi)

O tert-butóxido de potássio (180 g, 1.6 mol) foi dissolvido em DMSO (600 ml) e foi-lhe adicionado uma suspensão de 16-Bromo-17,17-etilenodioxi-3-benziloxi-estra-1,3,5(10)-trieno-17-ona (composto 10, X = Br, A = benzilo, B = etilenodioxi; 180 g (cru), max. 0.370 mol) em DMSO (600 ml) a RT nos 5 minutos seguintes. A temperatura foi aumentada para 45 °C durante a adição. A cor da mistura da reacção mudou imediatamente para castanho escuro. A mistura da reacção foi agitada durante 2 h durante as quais a temperatura diminuiu para 25 °C. Ela foi entornada em gelo/água (2 l) e foi extraída com DCM (2 x 1 l, 2 x 300 ml). As camadas orgânicas foram combinadas, lavadas com água (300 ml) e solução salina (300 ml) e seca com Na_2SO_4 . A solução foi concentrada in vacuo para dar o produto bruto (147 g, max. 0.370 mmol) como um óleo castanho que foi usado sem purificação adicional para a fase seguinte. TLC: $R_f = 0.35$ (heptanos/acetato de etil = 9/1); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.60-7.44 (m, 5H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.86 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.33 (dd, 1H, $J_1 =$

1.6 Hz, $J_2 = 7.4$ Hz), 5.82 (dd, 1H, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 5.10 (s, 2H), 4.03 (m, 4H), 2.95 (m, 2H), 2.56-1-40 (m, 9H), 1.04 (s, 3H) ppm.

Exemplo 6 3-Benziloxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona
(composto 6; A = benzilo)

A uma solução de 17,17-Etilenodioxo-3-benziloxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (composto 11; A = benzilo, B = etilenodioxo; 147 g, max 0.370 mol) em acetona (0.9 l) e água (100 ml) a RT foi adicionado mono-hidrato de p-TsOH (4.8 g, 25 mmol). A mistura foi agitada durante 3 h a RT (de acordo TLC a reação estava completa após 1 h e um precipitado tinha-se formado). DCM (1.2 l) e uma solução de NaHCO₃ aquosa saturada (300 ml) foi adicionada. A mistura foi agitada vigorosamente. As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com DCM (300 ml). As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com solução salina (300 ml) e foram concentradas até que a precipitação começasse (volume de aprox. 300 ml, T = 50 °C). O precipitado foi filtrado, lavado com acetona fria e hexanos para obter o produto como um sólido branco mate o qual foi purificado por recristalização a partir da acetona para dar um sólido branco (58 g, 0.162 mol, 44% em 5 fases). (Pureza de acordo HPLC-MS: 94%). A solução mãe restante ainda continha 40% de produto de acordo HPLC-MS. TLC: $R_f = 0.3$ (heptanos/acetato de etil = 4:1); DSC: Mp. 161.9 °C (pureza 91.7%); ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (dd, 1H, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 7.60-7.40 (m, 5H), 7.26 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 6.86 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz), 6.84 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.17 (dd, 1H, $J_1 = 3.8$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz), 5.12 (s, 2H), 3.01 (m, 2H), 2.62 - 1.64 (m, 9H), 1.18 (s, 3H) ppm.

Exemplo 7 3-Benziloxi-estra-1,3,5 (10),15-tetraen-17-ol
(composto 5; A = benzilo)

A uma solução de 3-benzil-dehidroestrone (composto 6; A = benzil; 58 g, 162 mmol) numa mistura de MeOH (900 ml) e THF (200 ml) à temperatura ambiente foi-lhe adicionada heptahidrato de CeCl_3 (66.4 g, 178 mmol). Depois de a agitar durante 1 h a mistura foi arrefecida a 0-5 °C usando um banho de gelo/água. Seguidamente NaBH_4 (12.2 g, 324 mmol) foi adicionado em partes pequenas mantendo uma temperatura abaixo de 8 °C. Depois de agitar durante 2 h a 0-5 °C (TLC mostrou que a reacção estava completa) 1 N NaOH (300 ml) e DCM (1 l) e a mistura foi agitada durante $1/2$ h à temperatura ambiente. As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com DCM (200 ml). As camadas orgânicas foram combinadas, secas (Na_2SO_4) e concentradas in vacuo para dar um sólido branco mate (55.0 g, 152.8 mmol, 94%) TLC: $R_f = 0.25$ (heptanos/acetato de etil = 4:1); HPLC-MS: 93% β -isómero, 2% α -isómero; DSC: Mp. 149.7 °C, pureza 96.6%; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (m, 5H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.85 (dd, 1H, $J_1 = 2.8$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz), 6.81 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 6.10 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz), 5.79 (dd, 1H, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 3.4$ Hz), 5.11 (s, 2H), 4.48 (d, 1H, $J = 7.6$), 2.96 (m, 2H), 2.46 - 1.64 (m, 9H), 0.93 (s, 3H) ppm.

Exemplo 8 17-Acetiloxi-3-benziloxi-estra-1,3,5 (10),15-tetraeno (composto 4; A = benzilo, C = acetilo)

Uma solução de 3-Benziloxi-estra-1,3,5 (10),15-tetraen-17-ol (composto 5; A = benzilo; 55.0 g, max. 153 mmol) em piridina (400 ml) foi tratada com Ac_2O (50 ml, 0.53 mol) e 4-dimetilaminopiridina (1.5 g, 12.3 mmol). A mistura foi agitada durante 2 h à temperatura ambiente (TLC mostrou que a reacção estava completa). Ela foi concentrada in vacuo. O resíduo foi dissolvido em EtOAc (400 ml), lavado com água (200 ml) e solução salina (150 ml), seco (Na_2SO_4) e concentrado in vacuo para produzir um sólido amarelo (54.0 g, 49.8 mmol, 88%). O produto foi purificado com recristalização a partir de heptanos/EtOAc/EtOH (1:0,5:1) para prover um sólido branco (45.0 g, 112 mmol,

73%) TLC: $R_f = 0.6$ (heptanos/acetato de etil = 4/1); HPLC-MS: 98% de β -isómero, 1% de α -isómero, 1.3% de β -estradiol; DSC: Mp. 122.8 °C, pureza 99.8%; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.44 (m, 5H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.86 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz), 6.80 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 6.17 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz), 5.78 (dd, 1H, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 3.2$ Hz), 5.45 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 2.96 (m, 2H), 2.40 - 1.54 (m, 10H), 2.18 (s, 3H), 0.93 (s, 3H) ppm.

Exemplo 9 17-Acetil-3-Benzil estetrol (composto 3; A = benzilo, C = acetilo)

OsO_4 em PVP (9 g, ~5% p/p de OsO_4 em PVP, preparado de acordo com Cainelli et al. *Synthesis*, 45 - 47 (1989) foi adicionado a uma solução de 17-Acetiloxi-3-benziloxi-estra-1,3,5 (10),15-tetraeno (composto 4; A = benzilo, C = acetilo; 45 g, 112 mmol) em THF (450 ml) e a mistura foi aquecida a 50 °C. Dihidrato de trimetilamina-N-óxido (24.9 g, 224 mmol) foi adicionado em porções durante 2 h. Depois de agitar durante 36 h a 50 °C (TLC mostrou que a reacção estava completa) a mistura da reacção foi arrefecida à temperatura ambiente. Os sólidos foram filtrados, lavados com THF (100 ml) e o filtrado foi concentrado. O resíduo foi retirado em EtOAc (250 ml) e foi-lhe adicionado água (250 ml). A camada aquosa foi acidificada com 1 N HCl (aprox. 10 ml). As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com EtOAc (150 ml). As camadas orgânicas foram combinadas, secas (Na_2SO_4) e concentradas in vacuo. O resíduo foi triturado com heptanos/EtOAc (1:1, 100 ml), agitado durante 2 h e o precipitado branco resultante foi filtrado para dar o produto como um sólido branco (41 g, 94 mmol, 84%). O produto foi purificado por recristalização a partir de heptanos/acetato de etil/EtOH (2:1:1) três vezes para prover um sólido branco (21 g, 48.2 mmol, 43%). HPLC-MS: 99.5% $\beta\alpha\alpha$ -isómero; DSC: Mp. 159.3 °C, pureza 98.7%; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (m, 5H), 7.27 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 6.84 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz), 6.81

(d, 1H, J = 2.4 Hz), 5.11 (s, 2H), 4.45 (d, 1H, J = 4.4), 4.11 (m, 3H), 3.12 (m, 1H) 2.95 (m, 2H), 2.46-1.64 (m, 10H), 2.24 (s, 3H), 0.93 (s, 3H) ppm.

Exemplo 10 17-Acetil estetrol (composto 2; C = acetilo)

A uma solução de 17-acetil-3-benzil estetrol (composto 3; A = benzilo, C = acetilo; 21 g, 48.2 mmol) em MeOH (600 ml, grau de HPLC) foi adicionada uma suspensão pré-formada de 10% de paládio sobre carbono activado (2 g) em metanol (50 ml). A mistura foi colocada numa atmosfera de H₂ a 1 atm e agitada durante 24 h (TLC mostrou que a reacção estava completa) à temperatura ambiente. Ela foi filtrada sobre Celite® e o bolo da filtração foi lavado com MeOH (200 ml). O filtrado foi concentrado in vacuo para dar 17-acetil estetrol como um sólido branco (15 g, 43.4 mmol, 90%). TLC: R_f = 0.2 (heptanos/acetato de etil = 1/1); HPLC-MS: 99.2%, DSC: Mp. 212.2 °C, pureza 98.9%; ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD) δ 7.14 (d, 1H, J = 8.0 Hz), 6.60 (dd, 1H, J₁ = 2.6 Hz, J₂ = 8.8 Hz), 6.56 (d, 1H, J = 2.4 Hz), 4.81 (dd, 1H, J₁ = 3.4 Hz, J₂ = 6.4 Hz), 4.07 (m, 3H), 3.12 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.37 - 1.37 (m, 10H), 2.18 (s, 3H), 0.91 (s, 3H) ppm.

Exemplo 11 estetrol

17-Acetil-estetrol (composto 2; C = acetilo; 15 g, 43.4 mmol) e K₂CO₃ (6 g, 43.4 mmol) foram suspensos em MeOH (500 ml, grau de HPLC) e agitados durante 4 h à temperatura ambiente (TLC mostrou que a reacção estava completa). Os solventes foram evaporados in vacuo. Água (200 ml) e CHCl₃ (70 ml) foram adicionados e a mistura foi agitada e neutralizada com 0.1 N HCl (50 ml). O produto foi recolhido por filtração, lavado com água (100 ml) e CHCl₃ (100 ml) para dar estetrol como um sólido branco (12.2 g, 40.1 mmol, 92.5%, rendimento global da estrona 10.8%) depois de seca a 40 °C num forno ventilado por ar. TLC: R_f = 0.05 (heptanos/acetato de etil = 1/1); HPLC-MS: 99.1%, DSC: Mp. 243.7

°C, pureza 99.5%; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3OD) δ 7.14 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 6.61 (dd, 1H, $J_1 = 2.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz), 6.56 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 4.83 (m, 1H), 3.93 (m, 3H), 3.50 (d, 1H, $J = 5.2$), 3.38 (m, 2H), 2.84 (m, 2H), 2.32 (m, 3H), 1.97 (m, 1H), 1.68 - 1.24 (m, 5H), 0.86 (s, 3H) ppm.

Lisboa, 4 de Agosto de 2010

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo Titular tem como único objectivo ajudar o leitor e não forma parte do documento de patente europeia. Ainda que na sua elaboração se tenha tido o máximo cuidado, não se podem excluir erros ou omissões e a EPO não assume qualquer responsabilidade a este respeito.

Documentos de Pedidos de Patente citadas na descrição

- WO 02094276 A
- WO 02094279 A
- WO 02094278 A
- WO 02094275 A
- EP 1511496 A1
- EP 1511498 A1
- WO 03041718 A
- WO 03018026 A
- EP 1526856 A1
- WO 040278032 A

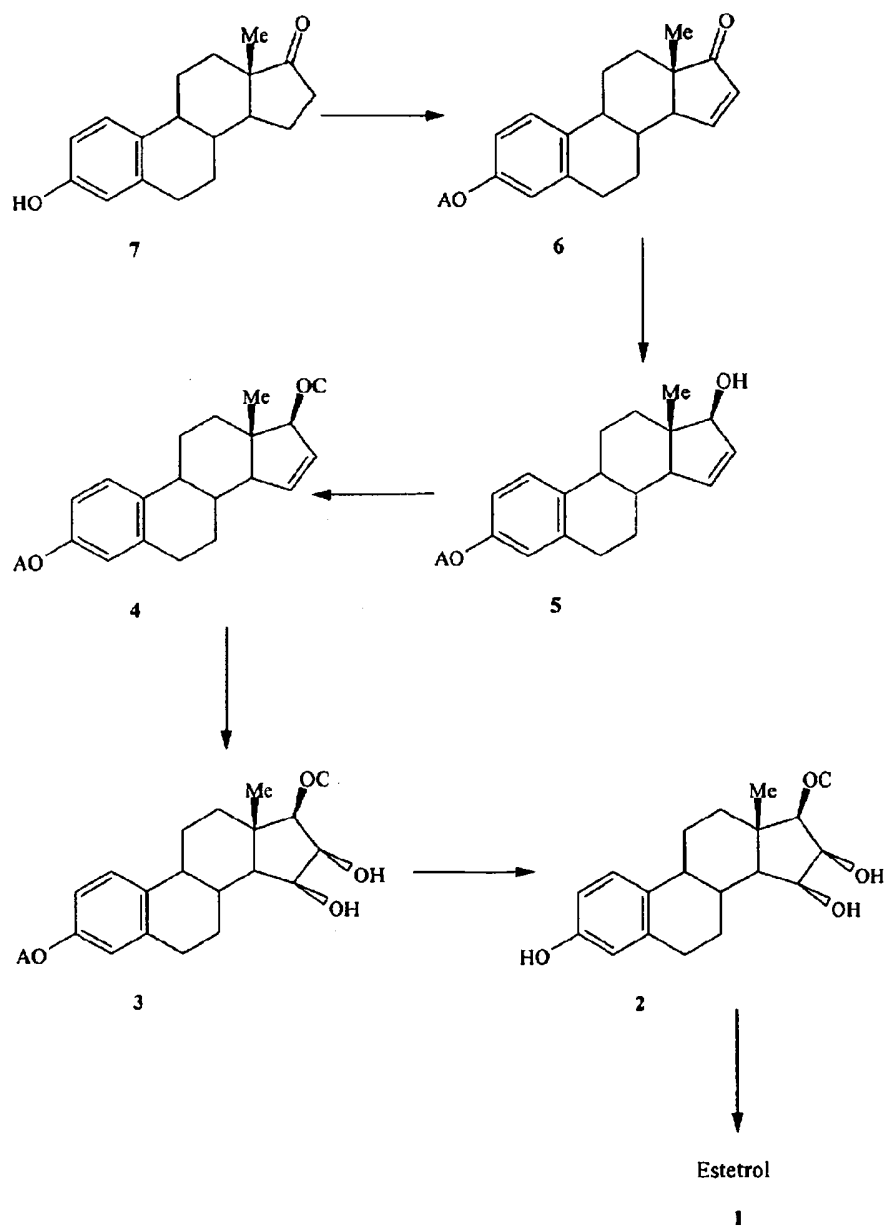
Literatura citada na descrição que não é Pedido de Patente

- Fishman J.; Guzik H. J. *Org. Chem.*, 1968, vol. 33, 3133-3135
- Nambara T. et al. *Steroids*, 1976, vol. 27, 111-121
- Suzuki E. et al. *Steroids*, 1995, vol. 60, 277-284
- Cantrall, E.W.; Littell, R.; Bernstein, S. J. *Org. Chem.*, 1964, vol. 29, 214-217
- Poirier D. et al. *Tetrahedron*, 1991, vol. 47, 7751-7766
- Dionne, P. et al. *Steroids*, 1997, vol. 62, 674-681
- Magnus, P. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, vol. 120, 12486-12499

- W. S. Johnson; W. F. Johns. 14-Isoestrone Methyl ether and its identity with totally synthetic material. J. Am. Chem. Soc., 1957, vol. 79, 2005-2009
- M. Sakakibara; A.O. Uchida. Synthesis of (14 β ,17 α)-14-Hydroxy- and (14 β ,17 α)-14-Dihydroxyestradiols and Their Activities. Biosci. Biotech. Biochem., 1996, vol. 60, 411-414

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo para a preparação de estra-1,3,5(10)-trien-3,15 α ,16 α ,17 β -tetraol (1) o qual compreende as fases de:



- 1) converter estrona (7) em 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6), em que A é um grupo protector;
- 2) reduzir o grupo 17-ceto de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17-ona (6) a 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17 β -ol (5);
- 3) proteger o grupo 17-OH de 3-A-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraen-17 β -ol (5) a 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4), em que C é um grupo protector;
- 4) oxidar a ligação dupla carbono-carbono do anel D de 3-A-oxi-17-C-oxi-estra-1,3,5(10),15-tetraeno (4) a estetrol protegido (3); e
- 5) remover os grupos protectores, em que preferencialmente o grupo protector A é removido primeiro para formar estetrol protegido 17-OC (2) e posteriormente o grupo protector C é removido para formar estetrol (1);

caracterizado por o grupo protector A ser seleccionado de um grupo alquilo C₁-C₅ ou um grupo benzílico C₇-C₁₂ e o grupo protector C ser seleccionado de entre os grupos protectores de hidróxilo monofuncionais alifáticos.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o grupo protector ser um grupo benzílico C₇-C₁₂.

3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o grupo protector ser um grupo benzilo.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado por o grupo protector C ser seleccionado de entre os grupos protectores de hidróxilo monofuncionais alifáticos.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o grupo protector de hidróxilo monofuncional alifático ser acetilo.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado por a redução do grupo carbonilo ser realizada usando um agente redutor seleccionado do grupo de compostos de hidreto de metal.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por o composto de hidreto de metal ser seleccionado do grupo constituído por LiAlH_4 , NaBH_4 , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, ZnBH_4 , e $\text{NaBH}_4/\text{CeCl}_3$.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o composto de hidreto de metal ser NaBH_4 em combinação com hidrato de CeCl_3 .

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado por a oxidação da ligação dupla carbono-carbono no anel D ser realizada com um agente oxidante que compreende tetróxido de ósmio.

10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o agente oxidante ser tetróxido de ósmio immobilizado sobre PVP ($\text{OsO}_4\text{-PVP}$).

11. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores de 1 a 10, caracterizado por a oxidação da ligação dupla carbono-carbono no anel D ser realizada com uma quantidade catalítica de $\text{OsO}_4\text{-PVP}$.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 9 a 11, caracterizado por $\text{OsO}_4\text{-PVP}$ ser usado em combinação com um co-oxidante.

13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o co-oxidante ser seleccionado do grupo constituído por trimetilamina-N-óxido, N-metilo morfolina-N-óxido ou peróxido de hidrogénio.

14. Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado por o co-oxidante ser trimetilamina-N-óxido.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado por o grupo benzílico C₇-C₁₂ protector ser removido com condições de hidrogenação catalíticas.

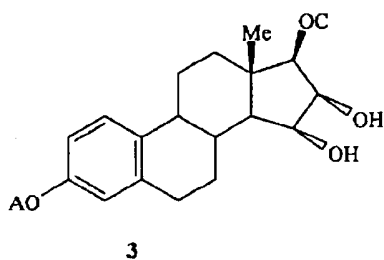
16. Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por as condições de hidrogenação catalíticas compreenderem uma reacção de hidrogenação usando Pd sobre carbono activado numa atmosfera de hidrogénio.

17. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizado por o grupo alquilo C₁-C₅ ser protector removido usando BBr₃.

18. Uso do produto obtido pelo processo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 17 para a fabricação de uma composição farmacêutica, preferencialmente para o seu uso num método seleccionado de entre um método de tratamento hormonal de substituição, um método para tratar a secura vaginal, um método contraceptivo, um método para estimular a libido, um método para o tratamento da pele, um método para estimular a cicatrização de uma ferida, e um método para tratar ou prevenir um transtorno seleccionado do grupo constituído por doenças auto-imunes, tumores da mama e tumores colo-rectais.

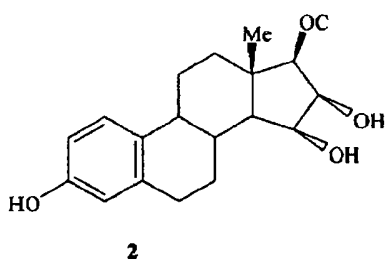
19. Um método cosmético para o tratamento da pele, caracterizado por o método compreender a administração tópica do produto obtido pelo processo de qualquer uma das reivindicações de 1 a 17.

20. Composto de acordo com a fórmula 3,



caracterizado por A ser seleccionado de um grupo alquilo C_1-C_5 ou um grupo benzílico C_7-C_{12} e C ser seleccionado de entre os grupos protectores de hidróxilo monofuncionais alifáticos.

21. Um composto de acordo com a fórmula 2,



caracterizado por C ser seleccionado de entre os grupos protectores de hidróxilo monofuncionais alifáticos.

Lisboa, 4 de Agosto de 2010