



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

51 Int. Cl.³: C 07 J

1/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



(12) PATENTSCHRIFT A5

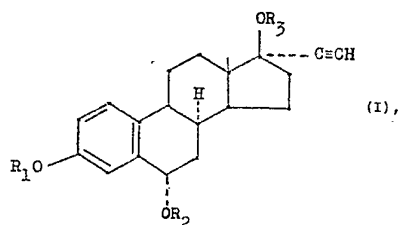
(11)

628 066

(21) Gesuchsnummer: 3110/77 (22) Anmeldungsdatum: 11.03.1977 (30) Priorität(en): 16.03.1976 DE 2611535 (24) Patent erteilt: 15.02.1982 (45) Patentschrift veröffentlicht: 15.02.1982	(73) Inhaber: Schering Aktiengesellschaft, Berlin & Bergkamen, Berlin 65 (West) (72) Erfinder: Dr. Karl Petzoldt, Berlin (West) Dr. Klaus Prezewowsky, Berlin (West) Dr. Hermann Steinbeck, Berlin (West) Prof. Dr. Rudolf Wiechert, Berlin (West) (74) Vertreter: E. Blum & Co., Zürich
---	---

(54) Verfahren zur Herstellung von 8 alpha-Oestratriolderivaten.

(57) 8α-Oestratriolderivate der allgemeinen Formel I



Die neuen erfindungsgemäss herstellbaren 8α-Oestratriolderivate der allgemeinen Formel I sind pharmakologisch wirksame Substanzen. Sie haben zum Beispiel eine starke östrogene Wirksamkeit, die die Wirksamkeit der entsprechenden 6α-Hydroxy-östradiole übertrifft. Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen weisen gewöhnlich eine günstige Dissoziation zwischen peripherer und zentraler Wirkung auf.

worin

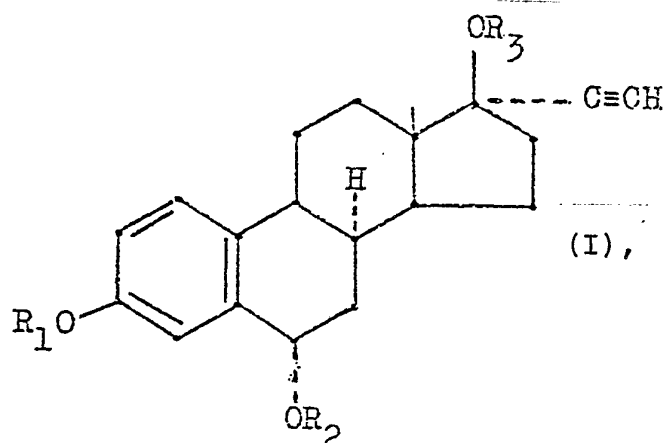
R₁ ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

R₂ ein Wasserstoffatom, und

R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, werden erhalten, indem man ein entsprechendes 8α-Oestratriolderivat mit einer Pilzkultur der Gattungen Botryodiplodia, Curvularia, Helminthosporium, Neurospora, Pellicularia, Diplodia, Cladosporium oder Rhizoctonia fermentiert. Freie Hydroxygruppen in den erhaltenen Verbindungen der Formel I können anschliessend verestert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 8 α -Oestratriolderivaten der allgemeinen Formel I

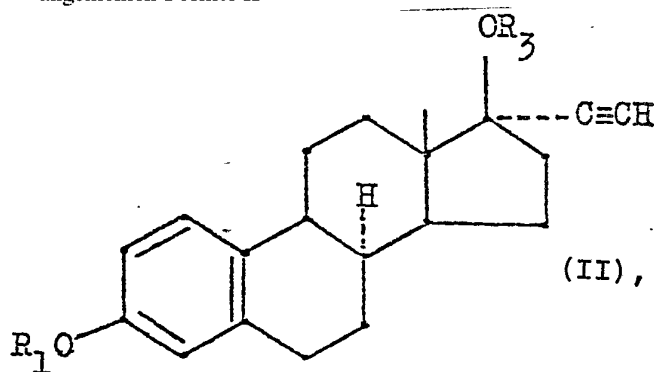


worin

R₁ ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

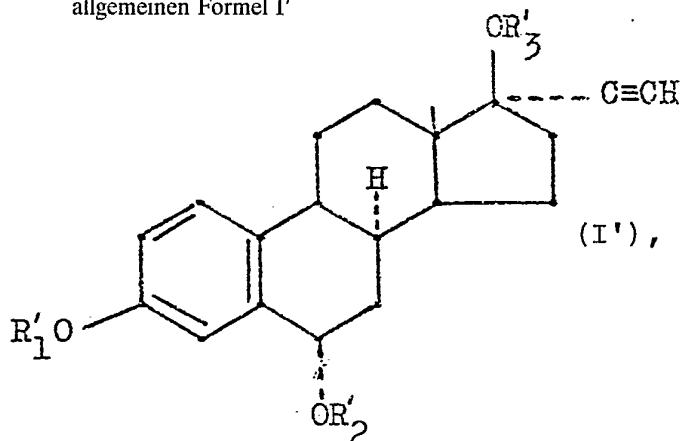
R₂ ein Wasserstoffatom, und

R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man ein 8 α -Oestradiolderivat der allgemeinen Formel II



worin R₁ und R₃ die oben angegebene Bedeutung haben, mit einer Pilzkultur der Gattungen Botryodiplodia, Curvularia, Helminthosporium, Neurospora, Pellicularia, Diplodia, Cladosporium oder Rhizoctonia fermentiert.

2. Verfahren zur Herstellung von 8 α -Oestratriolderivaten der allgemeinen Formel I'



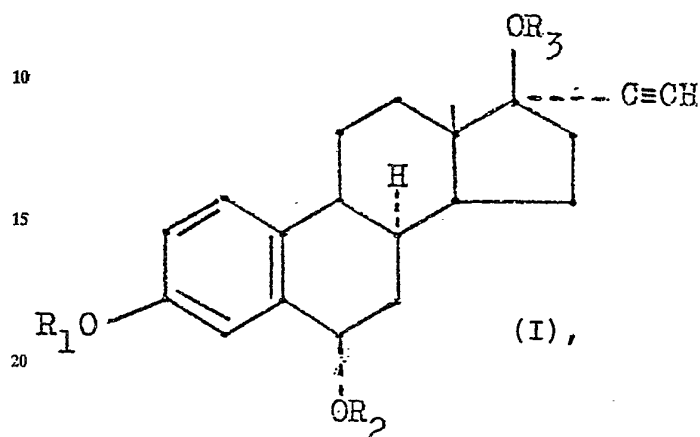
worin

R'₁ ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

R'₂ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe, und

R'₃ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, wobei mindestens eine der Gruppen R'₁, R'₂ und R'₃ eine Acylgruppe ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel I

5



25 worin

R₁ ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

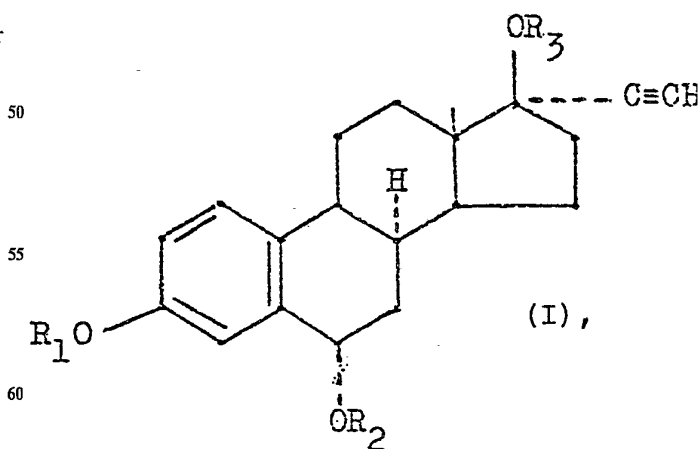
R₂ ein Wasserstoffatom, und

R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 herstellt und anschließend in der erhaltenen Verbindung, je nach der letztlich gewünschten Bedeutung von R'₁, R'₂ und R'₃ im Endprodukt mindestens eine freie Hydroxygruppe verestert.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man 17 α -Äthinyl-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-3,6 α ,17 β -triol herstellt.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 8 α -Oestratriolderivaten.

Das erste erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von 8 α -Oestratriolderivaten der allgemeinen Formel I



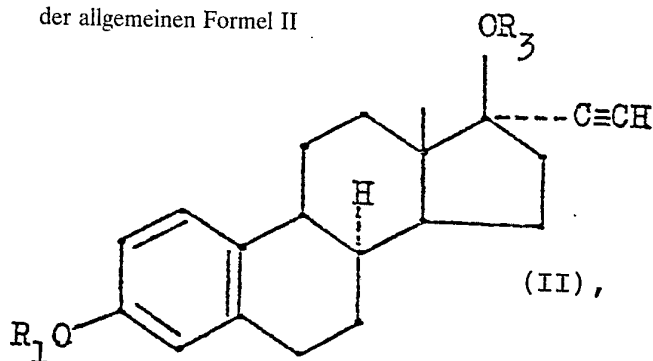
worin

R₁ ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

R₂ ein Wasserstoffatom, und

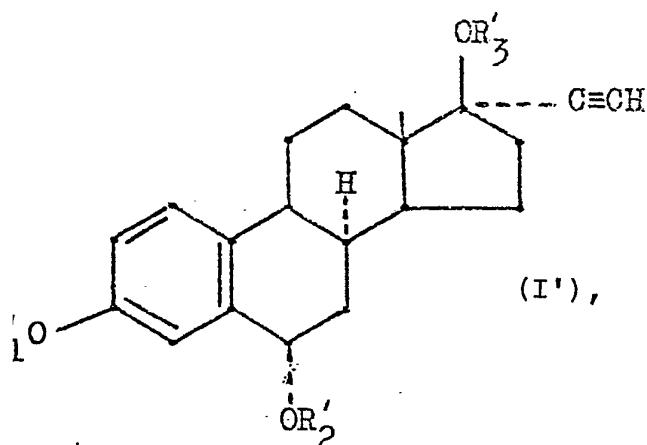
R₃ ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, ist dadurch gekennzeichnet, dass man ein 8 α -Oestradiolderivat

der allgemeinen Formel II



worin R_1 und R_3 die oben angegebene Bedeutung haben, mit einer Pilzkultur der Gattungen *Botryodiplodia*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Neurospora*, *Pellicularia*, *Diplodia*, *Cladosporium* oder *Rhizoctonia* fermentiert.

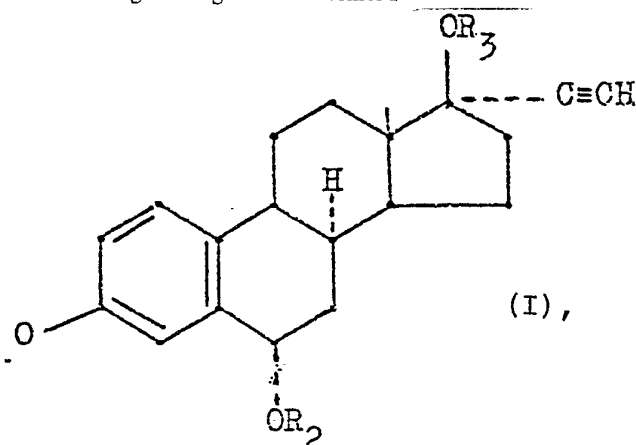
Das zweite erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von 8α -Oestratriolderivaten der allgemeinen Formel I'



worin

R'_1 ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

R'_2 ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe, und R'_3 ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, wobei mindestens eine der Gruppen R'_1 , R'_2 und R'_3 eine Acylgruppe ist, ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der allgemeinen Formel I



worin

R_1 ein Wasserstoffatom, eine Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppe,

R_2 ein Wasserstoffatom, und

R_3 ein Wasserstoffatom oder eine Acylgruppe bedeuten, wie weiter oben beschrieben, herstellt und anschließend in der erhaltenen Verbindung, je nach der letztlich gewünschten

Bedeutung von R'_1 , R'_2 und R'_3 im Endprodukt, mindestens eine freie Hydroxygruppe verestert.

Als Acylreste kommen im allgemeinen solche von physiologisch verträglichen Säuren infrage. Bevorzugte Säuren sind organische Carbonsäuren und Sulfonsäuren mit 1–15, insbesondere 1–8, Kohlenstoffatomen, die der aliphatischen, cycloaliphatischen, aromatischen, aromatisch-aliphatischen oder heterocyclischen Reihe angehören. Diese Säuren können auch ungesättigt und/oder mehrbasisch und/oder in üblicher Weise substituiert sein. Als Beispiele für die Substituenten seien Alkyl-, Hydroxy-, Alkoxy-, Oxo- oder Aminogruppen oder Halogenatome erwähnt.

Beispielsweise seien folgende Carbonsäuren genannt: Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Isobuttersäure, Valeriansäure, Isovaleriansäure, Capronsäure, Önanthensäure, Caprylsäure, Pelargonsäure, Caprinsäure, Undecylsäure, Laurinsäure, Tridecylsäure, Myristinsäure, Pentadecylsäure, Trimethyllessigsäure, Diäthyllessigsäure, tert.-Butyllessigsäure, Cyclopentyllessigsäure, Cyclohexyllessigsäure, Cyclohexan-carbonsäure, Phenyllessigsäure, Phenoxylessigsäure, Mono-, Di- und Trichloroessigsäure, Aminoessigsäure, Diäthylaminoessigsäure, Piperidinoessigsäure, Morpholinoessigsäure, Milchsäure, Bernsteinsäure, Adipinsäure, Benzoesäure, Nikotinsäure, Isonikotinsäure, Furan-2-carbonsäure.

Als Sulfonsäuren kommen beispielsweise Methansulfonsäure, Äthansulfonsäure, β -Chloräthansulfonsäure, Isopropan-sulfonsäure, Butansulfonsäure, Cyclopentansulfonsäure, Cyclohexansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, p-Chlorbenzolsulfonsäure, N,N-Dimethylaminosulfonsäure, N,N-Diäthylaminosulfonsäure, N,N-Bis-(β -Chloräthyl)-aminosulfonsäure, Pyrrolidino-, Piperidino-, Piperazino-, N-Methylpiperazino- und Morpholinosulfonsäure infrage.

Als Alkylgruppen R_1 kommen vorzugsweise Niedrigalkylgruppen mit 1–5 Kohlenstoffatomen in Betracht, die verzweigt oder in üblicher Weise substituiert sein können. Als Beispiele für die Substituenten seien Halogenatome und Niederalkoxygruppen genannt. Besonders bevorzugt sind die Methyl- und Äthylgruppe.

Als Cycloalkylgruppen R_1 sollen gewöhnlich solche mit 3–8 Kohlenstoffatomen verstanden werden, von denen die Cyclopentylgruppe bevorzugt ist.

Die 6α -Hydroxylierung gelingt mit Pilzkulturen der Gattungen *Botryodiplodia*, *Curvularia*, *Helminthosporium*, *Neurospora*, *Pellicularia*, *Diplodia*, *Cladosporium* und *Rhizoctonia*.

Geeignete Stämme sind beispielsweise *Botryodiplodia malorum* (CBS 113 450), *Curvularia lunata* (NRRL 2380), *Helminthosporium spec.* (ATCC 20 154), *Neurospora crassa* (ATCC 10 336), *Pellicularia filamentosa* (ATCC 13 289), *Diplodia natalensis* (ATCC 9055), *Cladosporium spec.* (ATCC 13 026), *Rhizoctonia solani* (ATCC 13 250).

Die Durchführung der Fermentation erfolgt im allgemeinen unter den gleichen Bedingungen, die man bei den bekannten fermentativen Umwandlungen von Steroiden mit Pilzkulturen anwendet.

So werden üblicherweise zunächst in allgemein üblichen Vorversuchen die günstigsten Fermentationsbedingungen, wie zum Beispiel Auswahl des günstigsten Nährmediums, des geeigneten Substratlösungsmittels, der Substratkonzentration, der technischen Bedingungen – wie Temperatur, Belüftung, pH- und der optimalen Zeiten für Germination, Substratzugabe und Substratkontakt am Enzym des Mikroorganismus analytisch, insbesondere dünn-schichtchromatographisch, ermittelt.

Dabei hat sich beispielsweise gezeigt, dass es zweckmässig ist, Konzentrationen von etwa 50–1000 mg Substrat pro Liter Nährmedium einzusetzen. Der pH-Wert wird vorzugsweise auf einen

Wert im Bereich von 5 bis 7 eingestellt. Die Züchtungstemperatur liegt normalerweise im Bereich von 20 bis 40°C, vorzugsweise von 25 bis 35°C. Zur Belüftung werden in der Regel etwa 1 Liter Luft pro Minute pro Liter Kulturbrühe zugeführt. Die Umwandlung des Substrats wird zweckmässigerweise durch dünnschichtchromatographische Analyse von Probeextrakten verfolgt. Im allgemeinen haben sich nach 20 bis 50 Stunden ausreichende Mengen an hydroxyliertem Steroid gebildet.

Nach erfolgter Fermentation werden normalerweise die Fermentationsprodukte in an sich bekannter Weise isoliert. Die Isolierung kann zum Beispiel in der Weise erfolgen, dass man die Fermentationsansätze mit einem polaren, nicht wasserlöslichen Lösungsmittel, wie Äthylacetat, Butylacetat oder Methylisobutylketon, extrahiert, die Extrakte einengt und die so erhaltenen Rohprodukte gegebenenfalls durch Chromatographie und/oder Kristallisation reinigt. Freie Hydroxygruppen können anschliessend verestert werden.

Für die Veresterung kommen normalerweise die üblicherweise in der Steroidchemie angewendeten Verfahren infrage. Da die Hydroxygruppen in 3-, 6- und in 17-Stellung verschiedene Reaktionsfähigkeit aufweisen, können die Hydroxygruppen stufenweise verestert werden. Je nach Wahl der Reaktionsbedingungen gelangt man gewöhnlich zu den 3,6-Di- oder 3,6,17-Triacylverbindungen. Die Acylierung in 3- oder 6-Stellung erfolgt vorzugsweise mit Pyridin/Säureanhydrid bzw. Pyridin/Säurehalogenid bei Raumtemperatur. Zur Acylierung der 17β-Hydroxygruppe in 3,6-Diacylaten lässt man auf das Steroid zum Beispiel Säureanhydride in Gegenwart starker Säuren, wie p-Toluolsulfonsäure oder Perchlorsäure, bei Raumtemperatur oder Pyridin/Säureanhydrid in der Wärme einwirken. Diese Methoden können auch benutzt werden, um die freie Trihydroxyverbindung unmittelbar in das Triacylat zu überführen.

In 3-Stellung verätherte Verbindungen können anschliessend in 6-Stellung mit Carbon- oder Sulfonsäuren verestert werden.

Wird die Trihydroxyverbindung mit einem Sulfonsäurehalogenid in Gegenwart eines tertiären Amins bei Raumtemperatur umgesetzt, so erhält man üblicherweise den 3,6-Disulfonsäureester. Im Falle der Umsetzung mit Methansulfonsäurechlorid ist es zweckmässig, die 17-Hydroxygruppe zu schützen, beispielsweise durch Überführen in den 17-Tetrahydropyranyläther, denn eine in 17-Stellung ungeschützte Hydroxygruppe kann bei der Einwirkung von Methansulfonsäurechlorid leicht abgespalten werden. Ausserdem ist es dann normalerweise günstig, bei Temperaturen von etwa -10 bis +15°C zu arbeiten.

Die neuen erfindungsgemäss herstellbaren 6α-Hydroxy-8α-östradiole der allgemeinen Formel I sind beispielsweise pharmakologisch wirksame Substanzen. Sie haben zum Beispiel eine starke östrogene Wirksamkeit, die die Wirksamkeit der entsprechenden 6α-Hydroxy-östradiole übertrifft. Die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen weisen gewöhnlich eine günstige Dissoziation zwischen peripherer und zentraler Wirkung auf. So zeigt zum Beispiel 17α-Äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-3,6α,17β-triol im Allen-Doisy-Test eine östrogene Wirkung in der Grössenordnung von 17α-Äthinyl-östradiol und ist in der Ovulationshemmung (zentrale Hemmung) nur ein Drittel so stark wirksam wie 17α-Äthinyl-östradiol.

Aufgrund der günstigen Eigenschaften können die neuen 6α-Hydroxy-8α-östradiole zum Beispiel in Form von Tabletten oder Lösungen zur Behandlung von Frauen in der Menopause eingesetzt werden. Ferner können die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen in Form von Vaginalsalben bei Östrogenmangelerscheinungen, wie zum Beispiel bei atrophischer Vaginitis, angewendet werden.

Die Herstellung der Arzneimittelspezialitäten kann in üblicher Weise erfolgen, indem man die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen beispielsweise mit den in der galenischen Pharmazie gebräuchlichen Trägersubstanzen, Verdünnungsmitteln, Geschmackskorrigentien usw. in die gewünschte Applika-

tionsform, wie Tabletten, Dragées, Kapseln, Lösungen, Salben usw., überführt. Die Wirkstoffkonzentration in den so formulierten Arzneimitteln ist üblicherweise abhängig von der Applikationsform. So enthält eine Tablette vorzugsweise 0,01 bis 10 mg; Lösungen zur parenteralen Applikation enthalten beispielsweise 0,1 bis 20 mg/ml Lösung und Vaginalsalben gewöhnlich etwa 0,5 bis 20 mg pro 100 ml Salbe.

Die Dosierung der erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen kann sich mit der Form der Verabfolgung und der jeweiligen ausgewählten Verbindung ändern. Darüber hinaus kann sie sich nach dem jeweiligen Behandelten ändern. Im allgemeinen werden die erfindungsgemäss herstellbaren Verbindungen in einer Konzentration verabfolgt, die wirksame Ergebnisse bewirken kann, ohne irgendwelche nachteilige oder schädliche Nebenwirkungen zu verursachen; so werden sie zum Beispiel in einer Dosishöhe verabfolgt, die im Bereich von ungefähr 0,02 mg bis ungefähr 20 mg liegt, obgleich unter Umständen Abänderungen vorgenommen werden können, so dass einer Dosishöhe von mehr als 20 mg, zum Beispiel bis zu 50 mg, verwendet wird. Jedoch wird eine Dosishöhe im Bereich von ungefähr 0,05 mg bis ungefähr 10 mg vorzugsweise verwendet.

Beispiel 1

Ein 2l-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Minuten bei 120°C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung aus 1 % Stärkzucker und 1 % Sojabohnenmehl, pH 6,2, enthält, wird mit einer Lyophilkultur von *Botryodiplodia malorum* (CBS 13 450) beimpft und 72 Stunden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler geschüttelt. Mit dieser Vorkultur werden 10 2l-Erlenmeyerkolben beimpft, wovon jeder 500 ml Medium der oben angegebenen Zusammensetzung enthält. Nach einer Anwachsphase von 6 Stunden bei 30°C auf der Schüttelmaschine werden 1000 mg 17α-Äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol, gelöst in 20 ml Dimethylsulfoxid, auf die 10 Kolben verteilt und weitergeschüttelt. Nach 44 Stunden Kontaktzeit wird der Inhalt der Kolben vereinigt, das Mycel über Papierfilter abgesaugt und das Kulturfiltrat dreimal mit Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten Extrakte engt man ein zur Trockne und reinigt den Rückstand durch Chromatographie an einer Kieselgelsäule. Nach Kristallisation der Hauptfraktion aus Isopropyläther erhält man 232 mg reines 17α-Äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-3,6α,17β-triol vom Schmelzpunkt 210–212°C.

Beispiel 2

Die Lösung von 200 mg 17α-Äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-3,6α,17β-triol in 10 ml Essigester wird bei Raumtemperatur nach-
einander mit 2 ml Essigsäureanhydrid und 1 Tropfen Perchlorsäure (70%ig) versetzt. Nach 3 Minuten wird 1 Tropfen Pyridin zugegeben, mit gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen, getrocknet, und eingedampft. Man erhält 162 mg 3,6α,17β-Triacetoxy-17α-äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien als amorphe Substanz.

Beispiel 3

Zu der Lösung von 150 mg 17α-Äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-3,6α,17β-triol in 3 ml Pyridin gibt man 1 ml Essigsäureanhydrid und lässt 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Der Ansatz wird unter Zugabe von Cyclohexan zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in Methylenchlorid aufgelöst und durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule mit Methylenchlorid/Aceton (linearer Gradient) gereinigt. Nach Kristallisation aus Äther/Hexan erhält man 95 mg 3,6α-Diacetoxy-17α-äthinyl-8α-östra-1,3,5(10)-trien-17β-ol vom Schmelzpunkt 154–156°C.

Bei Einsatz von Önanthsäureanhydrid bzw. Caprylsäureanhydrid anstelle von Essigsäureanhydrid werden erhalten: 3,6α-

Diheptanoyloxy-17 α -äthiny-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol bzw.
3,6 α -Diocanoyloxy-17 α -äthiny-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol.

Beispiel 4

500 mg 17 α -Äthiny-8 α -Östra-1,3,5(10)-trien-3,6 α ,17 β -triol werden in 5 ml Pyridin gelöst, 1,5 ml Buttersäureanhydrid zugegeben und 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Lösung in 100 ml gekühlte 8%ige Schwefelsäure eingerührt und der ausgefallene Niederschlag neutralgewaschen. Zur weiteren Aufreinigung wird das Produkt über eine Kieselgelsäule chromatographiert und aus Äther/Hexan umkristallisiert. Man erhält 310 mg 3,6 α -Dibutyryloxy-17 α -äthiny-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol vom Schmelzpunkt 101–104°C.

Beispiel 5

Die Lösung von 350 mg 17 α -Äthiny-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-3,6 α ,17 β -triol in 35 ml absolutem Benzol wird mit 5 ml Triäthylamin bei Raumtemperatur unter starkem Rühren mit 2 ml Isopropylsulfonsäurechlorid versetzt. Man lässt 38 Stunden bei Raumtemperatur rühren, giesst dann auf Eis und extrahiert mit Äther, die Ätherphase wird mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt wird durch Gradientenchromatographie gereinigt, man erhält 125 mg 17 α -Äthiny-3,6 α -bisisopropylsulfonyloxy-8 α -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol.