(19) REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA
INTELEKTUALNO VLASNIŠTVO

(10) Identifikator dokumenta: HR P920777 A2

HR P920777 A2

(12) PRIJAVA PATENTA

(51) MKP:
C07J 1/00 (2006.01)
A61K 31/565 (2006.01)

(21) Broj prijave: P920777A
(22) Datum podnošenja prijave patenta: 01.10.1992.
(43) Datum objave prijave patenta: 31.08.1994.

(31) Broj prve prijave: 2359/89 (32) Datum podnošenja prve prijave: 11.05.1989. (33) Država ili organizacija podnošenja prve prijave: HU

(60) Podaci iz bivšeg SZP-a: (21)P-923/90; (22)01.05.1990.

(71) Podnositelj prijave: **Richter Gedeon Vegyeszeti Gyar RT, Gyoemroei ut 19-21, 1475 Budapest, HU**

(72) Izumitelj: **Gabor Ambrus, of 45/b Csalan u., 1025 Budapest, HU**
Andrea Maderspach, of 13., Vorosvari ut,, 1035 Budapest, HU
Antonia Jekkel nee Bokany, of 38., Damjanich u., 1071 Budapest, HU
Andras Javor, of 73., Villanyi ut,, 1113 Budapest, HU
Eva Ilkoy, of 37., Munkacsy M. utca,, 1046 Budapest, HU
Gyorgy Hajos, of 59., Gabor Aron u.,, 1026 Budapest, HU
Laszlo Szporny, Szabolcska M. u. 7, 1114 Budapest, HU
Jozsef Nagy, of 30., Bolyai u.,, 4032 Debrecen, HU
Gyula Horvath, of 4-6, Kigyo u., 1052 Budapest, HU
Irme Moravcsik, of 38, Mester u., 1095 Budapest, HU

(74) Zastupnik: CPZ - CENTAR ZA PATENTE d.d., Zagreb, HR

(54) Naziv izuma: **NOVI DERIVATI 9ALFA-HIDROKSI-3-OKSO-4,24(25)-STIGMASTADIEN-26-SKE KISELINE, POSTUPAK ZA DOBIVANJE ISTIH I FARMACEUTSKI PREPARATI KOJI SADRŽE ISTE**

(57) Sažetak: Izum se odnosi na derivate 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule



(I)

gdje M označuje vodik, C1-4alkil ili farmaceutski prihvatljiv kation.

Izum se odnosi na postupak za dobivanje ovih spojeva.

Novi spojevi opće formule I prikazuju antihiperkolestermični efekt.

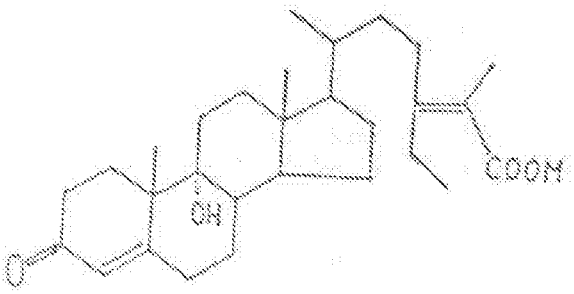
HR P920777 A2

Oblast tehnike

Izum je iz oblasti organske preparativne i farmaceutske kemije.

Tehnički problem

Ovaj izum se odnosi na nove derivate 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule I:



(I)

gdje M je vodik, C_{1-4}alkil ili farmaceutski prihvatljiv katjon, kao i na farmaceutske preparate koji sadrže ovi spojevi.

Izum se također odnosi na postupke za dobivanje spojeva opće formule I pomoću mikrobiološkog razlaganja beta-sitosterola ili sterola koji sadrže beta-sitosterola biljnog porijekla što je praćeno, ako se želi građenjem soli ili esterifikacojim i na postupke dobivanja farmaceutskih preparata koji sadrže spojeve opće formule I.

Stanje tehnike

Farmaceutski prihvatljive soli spojeva opće formule I uključuju one nagrađene sa neorganskim ili anorganske katjone, takve, kao natrij, kalij, kalcij, magnezij, aluminij, cink, amonij, etilendiamonij, tris(hidroksi metil)-aminometan ili tetrametil-amonij.

Spojevi opće formule I ovog izuma, gdje je M kao što je definirano naprijed, su nova i posjeduju vrijedna farmaceutska svojstva. Ona također služe kao polazni materijali za dobivanje farmaceutski važnih steroidnih derivata.

Poznato je da bakterije koje koriste sterole kao izvor ugljika razlazu kako steroidni skelet tako i bočni lanac. Mehanizam razlaganja bočnih lanaca sterola dao je C.J.Sih et al., /J.Am.Chem.Soc. 89,1957(1967), isto 104,4718(1982), isto 1=4,4720 (1982)/. Razlaganje bočnog lanca holesterola počinje sa hidroksilacijom na kraju bočnog lanca. Oksidacija hidroksilne grupe na atomu ugljika u položaju 26 dovodi do građenja karboksilne kiseline koja je razložena pomoću beta-oksidacionog mehanizma karakterističnog za masne kiseline, dajući postepeno skraćenje bočnog lanca. Razlaganje bočnog lanca beta-sistosterola koji ima etil grupu na ugljikovom atomu u položaju 24 razlikuje se od onoga za holesterol u tome bakterije koje razlazu bočni lanac dajući karboksilnu grupu na ugljikovom atomu u položaju 28 vezan na atom ugljika u položaju 24, zatim raskidaju vezu između atoma ugljika u položajima 24 i 28 pomoću beta-oksidacionog mehanizma.

Enzimatske transformacije steroidnog skeleta, koja se odvijaju paralelno sa zalaganjem bočnog lanca, dovode do raskidanja skeleta što je dalje praćeno potpunim razlaganjem sistema prstena. Raskidanje se odvija na takav način da se steroidni derivati sa strukturom 9alfa-hidroksi-l,4-dien-3-ona grade iz sterola što je dalje praćeno spontanim preuređivanjem i dobivanjem terapeutski bezvrijednih seko-steroida u kojima veza između atoma ugljika u položajima 9 i 10 u prstenu B skeleta se raskida /R.M.Dodson i R.D.Muir, J.Am.Chem.Soc. 83,4627(1961), K.Schubert et al., Z.Naturforsch 15b, 584 (1960)/.

Sedamdesetih godina dobivene su vrste sa izmijenjenim genetskim svojstvima iz bakterija koje koriste sterol pomoću mutogenih tretmana. Ove vrste, nemaju aktivne enzime za kataliziranje reakcija koje otpočinju razlaganje steroidnog skeleta.

Također je poznato da ćelijski zid bakterije može biti potpuno ili djelomično uklonjen enzimatskom hidrolizom pod izo-osmostkim uvjetima kada protoplasti Tomcsik i S. Guex-Holzer: Schweiz. Z.Allg. Path. Bact. 15, 517(1952), C.Weibull, J.Baceriol. 66,688 (1953)/ ili sferoplasti ?H.Sato i et al., Cand. J. Microbiol. 11, 807 (1965)/ grade ćelijski zid iz kojega se mogu obnoviti. Polietilen-glikol izazvana fuzija protoplasta ili sferoplasta obuhvaća slučajeve genetske rekombinacije koje daje ćelije sa novom genetskom informacijom K.Fodor i L.Alfoldi: proc. Natl. Acad. Sci. SAD

73,2147 (1976), P.Schaeffer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. SAD 73, 2151 (1976), N. Rastogi et al., J.Gen.Microbiol. 129, 1227 (1983), isto 137a, 135(1986)/.

Opis rješenja tehničkog problema sa primjerima realizacije

Koristeći postupak G.E.Teterson-a et al. /J.Lipid Research 3,275 (1962)/ izolirali smo mikroorganizme koji razlazu sitosterol iz raznih uzoraka zemljišta. Od mikroorganizamskih vrsta koje koriste sterole odabrali smo Mycrobacterium strain iz koje smo pomoću mutogenog tretmana koristeći UV ozračivanje proizveli mutantnu vrstu koja više ne razlaže steroidni skelet, ali transformira sitosterol do 9alfa-hidroksi-4-androsten-3,17diona kao glavnog proizvoda. Mutogenim tretmanom koristeći N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin izveli smo iz ove vrste genetički obilježene mutantne vrste, takve kao one koje zahtijevaju različite hranljive sastave (adenin, prolin, valin) ili one resistentne prema raznim antibioticima (npr. streptomicin). Pomoću in vivo genetske rekombinacije korištenjem sferoplastne fuzije sa ovim genetski obilježenim mutantnim vrstama razvili smo rekombinantne mikrobakterijske vrste koje djelomično razlazu sterolni bočni lanac. Pod kodnim brojem BCS Mycobacterijska vrsta ovog tipa koja proizvodi novo i nepublicirano sitisterol razlaganje proizvoda dajući kao glavne proizvode takve kao 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-sku kiselinu (gdje M označuje vodik) i 0alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-sku kiselinu metil estar (gdje M označuje metil grupu) je deponirana u "National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms" (Budapest) pod brojem NCAIm B (P) 0010.

Taksonomske karakteristike Mycobacterium strain deponirane pod brojem NCAIM B (P) 00103S su kao što slijedi: kolonije mikroorganizama su sivo bijele, ovaj organizam se razmnožava na 45°C, ali se ne razmnožava na 50°C i u odsustvu kisika. Efikasno koristi amonijev klorid, kalcijev nitrat, natrijev nitrat i amonijev hidrofosfat kao jedini izvor dušika, kao i glukozu, glicerol, fruktozu, maltozu, ksilozu, natrijev sukcinat, natrijev piruvat i natrijev acetat kao jedini izvor ugljika. Ne koristi saharozu, škrob i arabinozu. Vrsta ne može da razlaže tirozin i lišena je pigmentacije.

Dalje smo neočekivano našli da novi spojevi opće formule I gdje M ima ista značenja kao naprijed su snažni inhibitori biosinteze holesterola kod sisara i znatno snižava nivoe holesterola u serumu.

1980 epidemiološka proučavanja su potvrdila činjenicu da povišeni nivoi holesterola u serumu su glavni faktor rizika u razvijanju ateroskleroze u koronarnim arterijama. Glavni organ biosinteze holesterola je jetra. Polazni materijal za sintezu je octena kiselina i sinteza holesterola uključuje mevalonsku kiselinu i skualen sa terpenskom strukturom kao intermedijere /K.Block:Angew.Chem. 77,944 (1965), F.Lynen, Angew.Chem. 77, 929 (1965)/.

Medu supstancama koje inhibiraju biosintezu holesterola najveći značaj je pripisan 8(14)-dehidro-15-okso-sterol derivatima, od kojih najefikasnije sredstvo je 3beta-hidroksi-5alfa-holest-8(14)-en-15-on (holestelon) čiji je značajan efekt sniženja serumskog holesterola potvrđen kod više životinjskih vrsta i također kod ljudi G.J.Schroepfer jr. et al., J.Biol.chem. 263, 4110 (1988), G.J. Schroepfer jr. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.SAD, 79, 3042 (1982)/.

Inhibirajući efekat biosinteze holesterola spojeva prema izumu je ilustriran primjerom 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25).

Inhibitorski efekat ovog spoja je usporeden sa onim za 3beta-hidroksi-5alfa-holest-8(14)-en-15-on (kolestolon) postupkom A.Endo-a et al., /Eur.J.Biochem. 77,31 (1977), Biochem. Biophys. Acta 486,71 (1977)/ proučavanjem ugrađivanjem u homogenat jetre štakora radioobilježene octene kiseline u holesterolu.

Hannover Wistar su koristili mužjake štakora mase 50-60g za eksperiment. Prije eksperimenata, životinje su hranjene jedan tjedan sa hranom za štakore obogaćenom sa 5% holestiramina. povratnom dnevnom ciklusu (dan od 4 ujutro do 4 popodne) i noć od 4 po podne do 4 prije podne. Voda i hrana su bili dostpni ad libitum.

Životinje su ubijene jedan dan prije eksperimenata. Jetre su im uronjene u ledom ohlađen Krebs/Ringer-ov pufer (pH 7,4) i isječene na male komade. Korištenjem homogenizatora pri umjerenom načinu rada dobili smo sirovi jetreni homogenat od kojega su dijelovi ekvivalentni sa 100mg mokre jetre odmjereni staklene zatvorene epruvete. Operacije se izvode pod uvjetima konstantnog hlađenja. Inkubaciona smjesa je sadržavala jetreni homogenat. Krebs/Ringer bikarbonatni pufer, natrij-(1-^{14}C)acetar (dobijen od IZINTA, specifične aktivnosti 14,86 MBq/mg) i (^{3}H)holesterol oleat (dobijen od Du Pont, specifične aktivnosti 3067 GBq/mmol). Steroidi koji inhibiraju biosintezu holesterola su dodani inkubacionoj smjesi u alkoholnoj otopini koja sadrži albumin, kao što je opisao GJ.Schoepfer et al., ?J.Biol.Chem. 24,8975 (1977)/. Konačna zapremina inkubacione smjese je bila 2,0ml. Inkubacija se odvijala 2 sata u vodenoj kupaoni na 37°C, zatim je dodano 2ml alkohola koji sadrži 15% mas. KOH i smjesa je držana daljih 2 sata na 70-75°C. Lipidi su ekstrahirani iz alkalne smjese pomoću petroleum etra. Poslije isparavanja otapala u struji dušika, suhi ostatak je otopljen u smjesi acetona i etanola, zatim je holesterol staložen pomoću otopine digitonina. Talog je centrifugiran i otopljen u scintilacionom koktelu. Aktivnost je mjerena za 5 minuta koristeći Hitachi scintilacioni spektrometar. Dobiveni rezultati su prikazani u Tabeli I.

Tabela I

Spoj	Koncentracija μM	% Inhibicije
3beta-hidroksi-5alfa-holest-8(14)-15-on (usporedni)	2,5	16,6
	10,0	55,0
9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-sigmastadien-26-ska kiselina	2,5	65,3
	10,0	86,3

Podaci u Tabeli I pokazuju da efekat inhibicije biosinteze holesterola spoja prema izumu znatno prelazi inhibicioni efekt poznatog spoja 3beta-hidroksi-5alfa-holest-8(14)-en-15-on (kolestolon) u estu sa homogenatom jetre štakora.

U drugom aspektu ovaj izum se odnosi na postupak za dobivanje novih derivata 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule I, gdje M označuje vodik, C_{1-4}alkil ili farmaceutski prihvatljiv katjon, pomoću arobne frementacije Mycobacterium sp. BCS-394 mikroorganizamske vrste deponirane pod brojem NCAIM B (P) ili mutanata iste sa beta-sitosterolom ili sterolne smjese biljnog porijekla koja sadrži beta-sitosterol u hranljivoj sredini koja sadrži iskoristive izvore ugljika i dušika kao i mineralne soli, i, ako se želi, izoliranjem iz fermentacionog variva spoja opće formule I, gdje M označuje vodik i/ili metil grupu, i, ako se želi prevođenjem spoja opće formule I gdje M označuje vodik u spoju opće formule I gdje M označuje farmaceutski prihvatljiv katjon ili C_{1-4}alkil grupu.

Prema poželjnoj realizaciji ovog izuma Mycobacterium strain BCG 394 deponirana pod brojem NCAIM B (P) 001038 je kultivirana u hranljivoj sredini koja sadrži iskoristive izvore ugljika i dušika kao i mineralne soli i koja je podesna za kultiviranje brzo-rastućih Mycobakteria.

Od izvora ugljika, glukoze i glicerol; od organskih izvora dušika, soja, urea i ekstrakt kvasca; od neorganskih izvora dušika amonijevog klorida su podesno primjenljivi. Podesno je izmiješati sterol koji će biti preveden u oblik suspenzije dobivene sa Tween-80 i polipropilen glikolom, izmiješati sa hranljivom sredinom. Čist beta-sitosterol ili sterolna smjesa koja sadrži beta-sitosterol, npr. sirovi sitosterol dobiven iz sojinog ulja, koji je smjesa beta-sitisterola i kampesterola, služe kao substrati za mikrobiološku transformaciju.

Kultivacija mikroorganizama i transformacija sterola se izvodi između 28 i 37°C, poželjno na 32°C.

Glavna proporcija proizvoda sterolne transformacije je apsorbirana na mikrobakterijskim ćelijama, manja proporcija je otopljena u hranljivoj tečnosti. Steroidi su apsorbirani iz ćelija korištenjem organskih otapala miješanih sa vodom, poželjno metanol, dok proizvodi sterolne transformacije iz filtrata fermentacione smjese poželjno su izolirani ekstrakcijom sa etil acetatom ili kloriranim ugljikovodicima, takvim kao dihlorometan. Dodatno glavnim proizvodima 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-karboksilna kiselina i njezin metil estar, sirovi proizvod dobiva poslije isparavanja otapala također sadrži više sterolnih degradacionih proizvoda prisutnih u minornim količinama. Za razdvajanje proizvoda sterolne transformacije koriste se kromatografija na kolini i/ili tankoslojna kromatografija poželjno. Strukture proizvoda su dane pomoću UV, IV, ^{1}H-NMR i ^{13}C-NMR kao i masene epktrometrije.

Od spojeva dobivenih postupkom ovog izuma i koja imaju opću formulu I gdje M označuje vodik mogu se nagraditi soli za terapeutsku primjenu. Ove soli se mogu dobiti na poznati način iz spojeva opće formule I gdje M označuje vodik i baze koja daje odgovarajući katjon.

Estarski derivati prema izumu mogu se također dobiti na poznati način iz spojeva opće formule I, gdje M označuje vodik i podesnog C_{1-4}alkohola. Čak što više, reprezentativni spojevi prema izumu, gdje M označuje metil grupu u općoj formuli I, mogu biti direktno izolirana iz fermentacione smjese.

Spojevi opće formule I prema izumu, gdje M označuje H, C_{1-4}alkil grupu ili farmaceutski prihvatljiv katjon, su veoma korisni kao aktivne supstance u antihiperholestermičnim farmaceutskih preparatima za tretiranje npr. ateroskleroze ili hiperlipemie kod ljudi. Ovi se mogu unositi oralno ili parenteralno, u obliku npr. tableta, kapsula ili njekcibilnih preparata. Oralni način unošenja je uopšteno poželjan. Doza može prirodno zavisiti od više faktora takvih kao starost, tjelesna težina, ozbiljnost zdravstvenog problema osobe koja se tretira i nekih drugih faktora, ali dnevna doza za odrasle može biti obično u oblasti između oko 100 i 3000 mg, poželjno između 300 i 1000 mg, ali se također podesno mogu koristiti više doze, ako je potrebno.

Za terapeutske primjene, aktivni spojevi prema izumu su podesno transformirani u farmaceutske preparate miješanjem sa netoksičnim, inertnim, čvrstim ili tečnim nosačima i/ili aditivima obično korištenim za unutrašnje ili parenteralno unošenje.

Prema izumu, čvrsti oblici farmaceutskih preparata podesnih za oralno unošenje mogu se dobiti od 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ska kiseline derivati opće formule I, gdje M ima naprijed dana značenja, pomoću slijedećeg postupka:

Otprašena aktivna supstanca sa prosječnom veličinom čestica od 0,05-l,0mm je homogenizirana sa aditivima slične veličine čestica, korištenih u dobivanju tableta i kapsula, zatim se smjesa unosi u tvrde kapsule želatina ili preša u oblik tableta direktno ili poslije suhe ili vlažne granulacije.

Nosači korišteni u dobivanju tableta i kapsula primijenjeni kao aditivi su, poželjno škrob, tribarni kalcijev fosfat, kalcijev hidrofosfat, laktoza, glukoza, celuloza, saharoza, manitol, sorbitol ili njihove smjese; apsorbenti poželjno koloidni silicijev dioksid (zaštitna imena: Aerosil, Gesilite, Cab-o-sil, Syloid, Neosyl).\ ekscepienti poželjno želatina, akacia. celulozni etri (metilceluloza, karboksi-metil celuloza, etilceluloza, etil-hidroksietil-celuloza, hidroksipropil-metil celuloza), pektin, natrijev alginat, tragakant, polivinilpirolidon, polivinilalkohol ili njihove smjese; dizintegranti poželjno škrob, natrijev karboksimetil-škrob. ultra-amilopektin, alginska kiselina i alginati. formaldehid-želatin, formaldehid-kasein, pektin, bentonit, mikrokristalna celuloza ili njihove smjese; glidanti, lubrikanti i antiadhezioni materijali poželjno sapuni metala, magnezijev i kalcijev stearat, glicerol monostearat, stearilalkohol, centilalkohol, polietilen glikol, talk ili njihove smjese.

Izum je ilustriran detaljno pomoću slijedećih Primjera.

Primjer 1

Dobijanje 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline i njenog metil estra

Ćelijska suspenzija je dobivena sa 10ml sterilne vode od 5 dana stare kulture Mycobacterium sp. BCS-394 (NCAIM B (P) 001038) rasle na krumpir-glukoza kosom agaru. 5ml ove suspenzije je korišteno za inokuliranje 800ml sterilne Mi inoculum-sredine u Erlenmajernoj boci od 3000ml. MI sredina je imala slijedeći sastav:

glukoza	8,0g
soja	l,6g
urea	0,4g
ekstrakt kvasca	0,8g
amonijev klorid	2,4g
kalijev dihidrofosfat	0,4g
magnezijev sulfat $7H_2O$	0,4g
feri klorid $6H_2O$	0,4g

Tween-80 0,4g
u 800ml česmenske vode.

pH hranljive sredine je podešeno na 7,0 prije sterilizacije i smjesa je sterilizirana na 121°C tokom 45 minuta.

Boca je inkubirana na 32°C dva dana na rotirajućoj mućkalici (250 ob/m promjera 2,5cm). Sadržaji ove boce su uzeti radi inokuliranja u laboratorijskom fermentatoru od 10 litara, 4,2 litre sredine MF sterilizirane na 121°C tokom 45 minuta.

MF sredina je dobivena kao što slijedi:

50g glukoze, lOg soje, 2,5g uree, 15g amonijevog klorida i 2,5g kalijevog dihidrofosfata je kuhano u 1,5 1 česmenske vode. Bazna sredina dobivena na ovaj način je dodana i pod konstantnim miješanjem u istopljenu smjesu 100g beta-sitosterola, 40g polipropilen glikola, 10g Tween-80 i 800ml česmenske vode, sterilizirane na 121°C 1 sat, a zatim je zapremina smjese dovedena na 41 sa kuhanom vodom. Hranljiva sredina tako dobivena je sterilizirana na 121°C 1 sat.

Inokulirana kultura je miješana na 32°C 24 sata pri 750 ob/min, dok je uvođen zrak pri protoku od 100 l/sat u fermentatoru. Fermentacija je sastavljena 6 dana uz aeraciju od 300 l/sat kroz juhu miješanu na 750 ob/min. Po završetku fermentacije, proizvodi transformacije sterola su izolirani kao što slijedi:

Ćelije iz 1 l juhe, koja je početno sadržavala 20g beta-sitosterola su profiltrirane, zatim su ljepljivi proizvodi sterolne konverzije, i nepromijenjeni beta-sitosterol isprani tri puta sa 200ml metanola. Filtrat juhe je ekstrahiran sa 200ml etil acetata.

Poslije isparavanja ukupnog metanola i etil acetatnih ekstrakta pod sniženim pritiskom, 22g sirovog proizvoda je dobiveno koji je podvrgnut kromatografiji na koloni dobivenoj od 400g silicilne kiseline. Eluiranje je izvedeno sa etil

acetat-n-hcptan smjesom u kojoj je proporcija etil acetata postepeno uvećavana. Frakcije eluirane sa etil acetat-n-heptan smjesom koja sadrži 10% etil acetata su uparene. Poslije kristalizacije ostatak iz metanola dobiveno je 0,15g 4-stigmastadien-3-ona, tt: 89-90°C.

UV spektar (u etanolu):	λ_{max} 243 nm (ε = 14090);
IC spektar (u KBr):	νC=0 1678, νC==C 1616 cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar (u $CDC1_3$,δ):	5.56 s (H-4), 1.16 s (3 H-19), 0.68 s 3 H-18) ppm;
maseni spektar : molekul-ion (m/z):	412
Karakteristični ioni (m/z):	412, 229, 135, 109, 95, 55, 43.

Koristeći smjesu otapala koja sadrži 20% etil acetata u n-heptanu, 1,05g nepromijenjenog beta-sitosterola je eluirano iz kolone.

Frakcije eluirane sa smjesom eluenta koja sadrži 30% etil acetata u n-heptanu su isparene pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizcije, ostatka iz metanola dobiveno je 1,8g 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26ske kiseline metil estra, tt: 187-189°C.

Uv spektar (u etanolu):	λ_{max}239 nm (ε = 21530);
IC spektar (u KBr):	νOH 3600-3400, ν_{max} 3487 (9α-hydroxylna grupa), γC= 0 1717 (konjugirani cstar), 1678 (kcton u položaju 3), γC=C 1615 cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar u C_6D_6, δ):	5.92 s (H-4), 3.46 s (3 H, OCH_3), 2.58 q (2 H-28), 1.96 s (3 H-27), 1.22 t (3 H-29), 0.95 d (3 H-21), 0.8 s (3-19), 0.55 s (3 H -18) ppm.
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	470;
Karakteristični ioni (m/z):	470, 438, 410, 137, 136, 134.

Frakcije eluirane sa eluentskom smjesom koja sadrži 35% etil acetata u n-heptanu su uaprene pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizacije ostatka iz metanola dobiveno je 0,15g 9alfa-hidroksi-27-nor-4-holesten-3,24-diona, tt: 208-211 °C.

UV spektar (etanolu)	λ_{max} 241 nm (ε = 14800);
IC spektar (u KBr):	γOH 3555, γC=0 1705 keton u položaju 24), 1660 (keton u položaju 3) γC=C 1614CIH^{-1},
^{1}H-NMR spektar (u $CDCl_3$, δ):	5.86 s (H-4), 1.32 s (3 H-19), 1.05 t (3 H-26), 0.90 d (3 H-21), 0.72 s (3 H-18) ppm;
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	400,
Karaktcristični ioni (m/z)	400, 151, 136, 122, 109, 57.

Frakcije eluirane sa eluentskom smjesom koja sadrži 40% etil acetata u n-heptanu su uparene. Poslije rekristalizacije ostatka iz acetona dobijeno je 0,2g 9alfa-hidroksio-okso-23,24-dinor-4-holen-22-ske kiseline metil estra, tt: 212-216°C.

UV spektar (u etanolu):	λ_{max} 242 nm (ε = 15860);
IC spektar (u KBr):	γOH 3395, γC-0 1730 (ester), 1650 (keton u položaju 3), γC=C 1615 cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar (u $CDCl_3$, δ):	5.8 s (H-4), 3.6 s (OCH_3), 1.3 s (3 H-19), 1.2 d (3 H-21), 0.7 s (3 H-18) ppm;
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	374
Karakteristični ioni (m/z):	374, 180, 151, 137, 136, 124, 109, 81.

Frakcije eluirane sa eluentskom smjesom koja sadrži 42% etil acetata u n-heptanu su isparene. Poslije rekristalizacije ostatka iz metanola dobijeno je 0,25g 3-okso-4-stigmastadien-26-ske kiseline, tt: 164-168°C.

UV spektar (u etanolu):	λ_{max} 242 nm (ε = 14010);
IC spektar (u KBr):	γC=0 C=0 1736, 1650 (karboksilna kiselina u položaju 26 i okso grupa u položaju 3); γC=C 1616 cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar (u CDCI3, δ):	5.73 s (H-4), 1.19 s (3 H-19), 0.7 s (3 H-18) ppm;
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	442;
Karakteristični ioni (m/z):	442, 424, 229, 147, 124, 123, 95, 55.

Frakcije eluirane sa etil acetat-n-heptan smjesom koja sadrži 45% etil acetata su uparene pod sniženim pritiskom. 2,5g tako dobivenog ostatka je otopljeno u 10ml metanola koji sadrži 10% mas. HCl, i dodano je 50ml etil acetata. Tako dobivena otopina je isprana dva puta sa 30ml destilirane vode i tada uparen pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizacije ostataka iz metanola 2,2g 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ska kiseline je dobiveno, tt: 242-248°C.

UV spektar (u etanolu):	λ_{max} 239 (ε = 21230);
IC spektar (u etanolu):	γOH 3650-3350, γ_{max} 3483 (9α-hidroksi grupa), 3200-2200 (karboksilna kiselina u položaju 26), γC=0 1676 (keton u položaju 3 i karboksilna kiselina u položaju 26), γC=C 1616cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar (u C_5O_5N, δ);	6.15 d (H-4), 2.83 q (2 H-28), 2.28 s (3 H-27), 1.39 s (3 H-19), 1.39 t (3 H-29), 1.14 d (3 H-21), 0.89 s (3 H-18) ppm;
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	456
Karakteristični ioni (m/z):	456, 438, 410, 137, 136, 124, 123, 110.

Primjer 2

Dobivanje 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline metil estra.

Ćelijska suspenzija je dobivena sa 10ml sterilne vode iz 5 dana stare kulture Mycobaceterium sp, BCS-394 izrasle na krumpir-glukoza kosom agaru. 100ml obroka svake sterilne MY-5 inoculum-sredine u 10 Erlenmajerski boca od 500ml su inokulirane sa 1ml svaka od gornje ćelijske suspenzije.

MY-5 sredina je dobivena kao što slijedi:

10g glicerola, 1g soje, 0,5g uree, 1g amonijevog klorida, 0,5g dikalijevog hidrofosfata, 0,5g magnezijevog sulfata, $7H_2O$, 1g natrijevogcitrata i 0,05g $FeCl_3$.

$6H_2O$ su dovedeni do ključanja u 300ml česmenske vode. Bazna sredina dobivena na ovaj način je dodana uz miješanje u otopljenu smjesu 30g sirovog sitosterola (2:2 smjesa beta-sitosterola i kampesterola), 8g polipropilenglikola, 2g Tween-80 i 150ml česmenske vode i sterilizirana na 121 °C, zapremina smjese je tada dovedena do 1 l sa ključalom česmenskom vodom.

Boce su mućkane na 32°C 7 dana na horizontalnoj mućkalici (250 ob/min, promjera 2,5cm), zatim su ćelije odvojene od juhe pomoću centrifuge. Proizvodi sterolne konverzije i neizmijenjen sirovi sitosterol su isprani od ćelija ispiranjem ovih tri puta sa po 200ml metanola. Metanolna otopina je uparena pod sniženim pritiskom. Supernatant fermentacione juhe je ekstrahiran sa 200ml etil acetata i ekstrakt je isparen pod sniženim pritiskom. Objedinjavanjem ostataka ekstrakta dobiveno je 32g sirovog proizvoda. Sirovi proizvod je podvrgnut kromatografiji na koloni dobivenoj od 500g silicinske kiscline. Eluiranje je izvedeno sa etil-acetat-n-heptan smjesom u kojoj je proporcija etil acetata stupnjevito uvećavana. Korištenjem eluentske smjese koja sadrži 25% etil acetata u n-heptanu eluirano je sa kolone 2,5g nepromijenjenog polaznog materijala (2:1 smjesa beta-sitosterola i kampasterola).

Frakcije eluirane sa smjesom koja sadrži 30% etil acetata u h-heptanu su uparena pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizacije ostataka iz metanola dobiveno je 3,4g 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26ske kiseline metil estra, tt: 187:189°C.

Spektralne karakteristike proizvoda su iste kao one dane u Primjeru 1.

Frakcije eluirane sa smjesom koja sadrži 35% etil acetata u n-heptanu su uparene pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizacije ostataka iz metanola dobiveno je 9,43g 9alfa-hidroksi-27-nor-4-holesten-3,24-diona, tt: 208-211°C.

Spektralne karakteristike proizvoda su iste kao one prikazane u Primjeru 1.

Frakcije eluirane sa smjesom koja sadrži 37% etil acetata u n-heptanu su uparene. Poslije rekristalizacije ostatka iz acetona dobiveno je 0,49g 9alfa-hidroksi-3-okso-23,24-dinor-4-holen-22-ske kiseline metil estra, tt: 212-216°C.

Spektralne karakteristike proizvoda su iste kao one prikazane u Primjeru 1.

Frakcije eluirane sa smjesom koja sadrži 40% etil acetata u n-heptanu su uparene. Poslije rekristalizacije ostatka iz metanola dobiveno je 0,25g 9alfa-hidroksi-26,27-dinor-4-holesten-3,24-diona, tt: 201-204°C.

UV spektar (u etanolu) :	λ_{max} 241 nm, (ε=14200);
IC spektar (u KBr) :	γOH 3550, γC=0 1705 (keton u položaju 24), 1660 (keton u položaju 3), υC=C 1610 cm^{-1};
^{1}H-NMR spektar (u $CDC1_3$, δ):	5.85 s (H-4), 2.12 s (3 H-25), 1.3 s (3 H-19), 0.90 d (3 H-21), 0.7 s (3 H-18) ppm;
Maseni spektar: molekul-ion (m/z):	386
Karakteristični ioni (m/z):	386, 151, 137, 136, 124, 109, 43.

Frakcije eluirane sa smjesom koja sadrži 45% etil acetata u n-heptanu su uparene pod sniženim pritiskom. Ostatak je prečišćen koristeći preparativnu tankoslojnu kromatografiju sa slijedećom otopinom razvijača: etil acetat u n-heptanu u odnosu od 4-6. 4g proizvoda tako dobivenog je otopljeno u 10ml metanola, otopina je zakiseljena sa 10ml 10% metanolne otopine HCl, zatim je razblažen sa 50ml etil acetata. Otopina tako dobivena je isprana dva puta sa po 30ml destilirane vode i zatim je uparen pod sniženim pritiskom. Poslije rekristalizacije ostatka iz metanola dobiveno je 3,5g 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24-(25)-stigmastadien-26-ske kiseline, tt: 242-248°C.

Spektralne karakteristike proizvoda su iste kao one dane u Primjeru 1

Primjer 3

Natrijeva sol 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26ske kiselinc

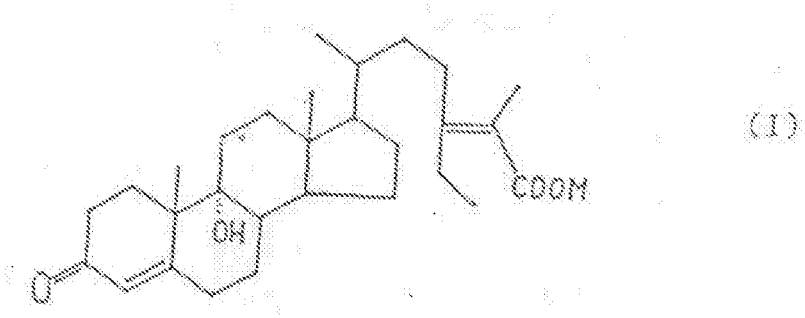
U otopinu 100mg 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline u 25ml etanola dodano je 2,2ml 0,1M natrijevog hidroksida. Poslije stanja 30 minuta na sobnoj temperaturi, otopina je uparena na vakuumu. Dobiveni uljani ostatak je uzet u 10ml etanola i otopina je uparena. Ostatku je dodano 5ml acetona i dobivena natrijeva sol 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline je profiltriran.

IC spektar (u KBr): υOH 3495, υC=0 1660 (okso grupa u položaju 3), υCOO^- 1572cm^{-1};

Maseni spektar sa brzo bombardirajućim atomom (FAB): /M+NA/$^+$=501.

PATENTNI ZAHTJEVI

1. Derivati 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule I



(I)

gdje M označuje vodik, C_{1-4}alkil ili farmaceutski prihvatljiv katjon.

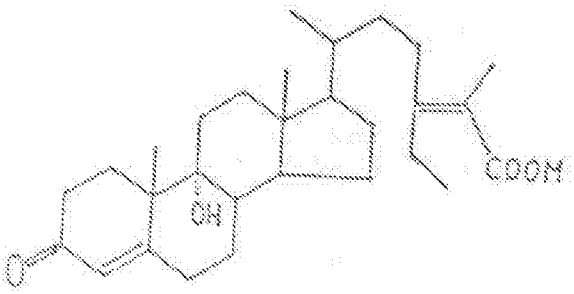
2. 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ska kiselina.
3. C_{1-4}alkil estri 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline.
4. Metil estar 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline.
5. Farmaceutski prihvatljive soli 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline.
6. Postupak za dobivanje derivata 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule I, gdje M označuje vodik, C_{1-4}alkil ili farmaceutski prihvatljiv katjon, **naznačen time**, što obuhvaća fermentaciju beta-sitostera ili sterolne smjese koja sadrži beta-sitosterol biljnog porijekla potapanjem aerobične kulture Mycobacterium sp. BCS-394deponirane pod brojem NCAIM B (P) 001038 ili njenog mutanta u hranljivu sredinu koja sadrži iskoristive izvore dušika i ugljika kao i mineralne soli, ako se želi, izoliranje iz juhe spoja opće formule I, gdje M označuje H i/ili metil grupu, i ako se želi, prevođenje spoja opće formule I gdje M označuje H u spoju gdjc M jc Cj^alkil grupa ili farmaccutski prihvatljiv katjon.
   C_{1-4}alkil grupa ili farmaceutski prihvatljiv katjon.
7. Farmaceutski preparat, **naznačen time**, što obuhvaća kao aktivni sastav 9alfa-0hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline derivate opće formule I, gdje M označuje vodik, C_{1-4}alkil grupu ili farmaceutski

prihvatljiv katjon u smjesi sa nosačima i/ili aditivima opće korištenim u dobivanju lijekova.

8. Postupak za dobivanje uglavnom antihiperkolestermnih farmaceutskih preparata, **naznačen time**, što obuhvaća transformiranje spojeva opće formule I, gdje M ima ista značenja, kao što je definirano u zahtjevu 6 u farmaceutski preparat poznatim postupkom u dobivanju lijekova.

SAŽETAK

Izum se odnosi na derivate 9alfa-hidroksi-3-okso-4,24(25)-stigmastadien-26-ske kiseline opće formule



(I)

gdje M označuje vodik, C_{1-4}alkil ili farmaceutski prihvatljiv kation.

Izum se odnosi na postupak za dobivanje ovih spojeva.

Novi spojevi opće formule I prikazuju antihiperkolestermični efekt.