



(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 146565 B

DIREKTORATET FOR  
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 5175/76

(22) Indleveringsdag: 17 nov 1976

(24) Løbedag: 30 sep 1975

(41) Alm. tilgængelig: 17 nov 1976

(44) Fremlagt: 07 nov 1983

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: 4400/75

(30) Prioritet: 18 okt 1974 DE 2450106 01 sep 1975 DE 2539261

(51) Int.Cl.<sup>3</sup>: C 07 J 1/00  
// C 12 P 33/06  
// A 61 K 31/565

(71) Ansøger: \*SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT; Berlin und Bergkamen, 1 Berlin 65, DE.

(72) Opfinder: Karl \*Petzoldt; DE, Walter \*Elger; DE.

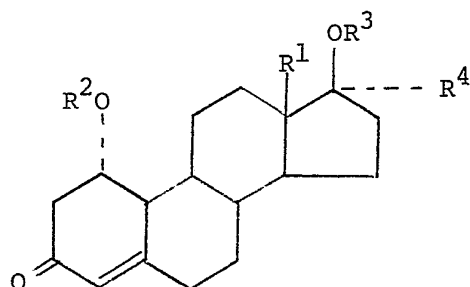
(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) 17alfa-ætynyl-17beta-hydroksy-4-østren-3-oner til anvendelse som kontræceptiva

Opfindelsen angår hidtil ukendte 17 $\alpha$ -ætynyl-17 $\beta$ -hydroksy-4-østren-3-oner til anvendelse som kontræceptiva.

De hidtil ukendte steroider er 17 $\alpha$ -ætynyl-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroksy-4-østren-3-oner med den almene formel I

DN 140303 D



(I)

hvor  $R^1$  er en metylgruppe eller en ætylgruppe,  $R^2$  og  $R^3$  er hydrogenatomer eller alkanoylgrupper med 1-8 kulstofatomer, og  $R^4$  er en ætynylgruppe.

I forbindelserne ifølge opfindelsen kan grupperne  $R^2$  og  $R^3$  være ens eller forskellige. Som egnede alkanoylgrupper  $R^2$  og  $R^3$  skal f.eks. nævnes: formylgruppen, acetylgruppen, propionylgruppen, butyrylgruppen, pentanoylgruppen, heksanoylgruppen, heptanoylgruppen og oktanoylgruppen.

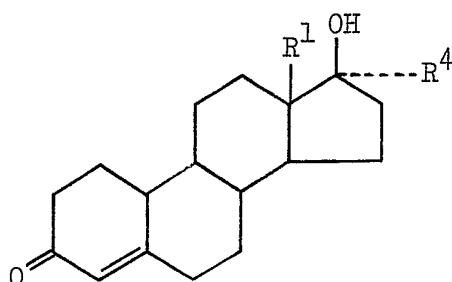
Forbindelserne ifølge opfindelsen har i sammenligning med de i 1-stilling usubstituerede forbindelser en meget stærk gestagen virkning. F.eks. er 17 $\alpha$ -ætynyl-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroksy-18-metyl-4- $\phi$ stren-3-on (A) ved Clauberg-prøven mindst 3 gange stærkere gestagent virksom end 17 $\alpha$ -ætynyl-17 $\beta$ -hydroksy-18-metyl-4- $\phi$ stren-3-on (B). Det samme gælder for 17 $\alpha$ -ætynyl-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydroksy-4- $\phi$ stren-3-on (C) i forhold til 17 $\alpha$ -ætynyl-17 $\beta$ -hydroksy-4- $\phi$ stren-3-on (D).

#### Clauberg-prøve på kastrerede infantile hunkaniner.

Dosis i mg	McPhail-værdi				
	p. o.	A	B	C	D
0,3		2,8	2,4	-	-
0,1		3,1	1,1	2,6	1,9
0,03		1,8	1,0	1,7	1,0

Den progestationale omdannelse af endometrium bedømmes her i de histologiske præparater efter en modificeret McPhail-skala (bedømmelsesgrad 1-4; 1 = ingen virkning; 4 = fuld omdannelse).

Forbindelserne ifølge opfindelsen kan fremstilles ved, at man forgærrer en forbindelse af den almene formel II



(II)

hvor  $R^1$  og  $R^4$  har den ovennævnte betydning, med en svampekultur af slægterne *Rhizoctonia*, *Calonectria*, *Glomerella*, *Aspergillus*, *Corticium*, *Septomyxa*, *Mucor*, *Isaria*, *Irpex* eller *Fusarium* og om ønsket for-  
estrer frie hydroksygrupper.

Fremgangsmåden kan f.eks. udføres under anvendelse af følgende svam-  
pestammer:

<i>Rhizoctonia solani</i>	(ATCC 10154)
<i>Glomerella glycines</i>	(ATCC 11871)
<i>Glomerella fusaroides</i>	(ATCC 9552)
<i>Calonectria decora</i>	(ATCC 14767)
<i>Aspergillus clavatus</i>	(ATCC 9598)
<i>Aspergillus fumigatus</i> mut. <i>helvola</i>	(CBS 11046)
<i>Aspergillus carneus</i>	(CBS 49465)
<i>Aspergillus terreus</i>	(ATCC 10020)
<i>Aspergillus conicus</i>	(IFO 4047)
<i>Corticium sasakii</i>	(Univ. Tokio 9005)
<i>Septomyxa affinis</i>	(ATCC 6737)
<i>Mucor griseocyanus</i>	(ATCC 1207b)
<i>Mucor genevensis</i>	(ATCC 8976)
<i>Mucor spinosus</i>	(CBS 29563)
<i>Isaria farinosa</i>	(OUT 4098)
<i>Irpex lacteus</i>	(IFO 5367)
<i>Fusarium ciliatum</i>	(CBS 13235).

Fortrinsvis egnede er *Calonectria decora*, *Aspergillus clavatus* og *Mucor spinosus*.

Udførelsen af hydroksyleringen sker ved metoder, som man sædvanligvis anvender til mikrobiologisk hydroksylering af steroider med svampekulturer.

Således konstateres først ved alment sædvanlige forforsøg de gunstigste forgæringsbetingelser, som f.eks. udvalg af det gunstigste næringsmedium, det egnede substratopløsningsmiddel, substratkoncentrationen, de tekniske betingelser såsom temperatur, luftning, pH-værdi og den optimale tid til germination, substrattilsætning og substratkontakt med mikroorganismens enzym ad analytisk vej, især tyndtlagskromatografisk.

Derved har det vist sig, at det er hensigtsmæssigt at anvende koncentrationer på ca. 50-1000 mg substrat pr. liter næringsmedium. pH-værdien indstilles fortrinsvis til en værdi i området fra 5 til 7. Dyrkningstemperaturen ligger i området fra 20 til 40°C, fortrinsvis 25 til 35°C. Med henblik på luftningen tilføres ca. 1 liter luft pr. minut pr. liter kulturvæske. Omdannelsen af substratet følges hensigtsmæssigt ved tyndtlagskromatografisk analyse af prøveekstrakter. I almindelighed har der efter 20-120 timer dannet sig tilstrækkelige mængder hydroksyleret steroid.

Ved den mikrobiologiske hydroksylering dannes der ofte ved siden af  $1\alpha$ -hydroksysteroiderne af den almene formel I ifølge opfindelsen også de isomere  $1\beta$ -hydroksysteroider.

Isoleringen og rensningen af produktet sker på i og for sig kendt måde. F.eks. kan man ekstrahere det ved fremgangsmåden fremkomne produkt med et organisk opløsningsmiddel, såsom metylisobutylketon, inddampe ekstrakten og adskille de fremstillede produkter ved søjlekromatografi og rense dem.

Den eventuelle efterfølgende forestring af de frie hydroksygrupper sker på metoder, som man sædvanligvis anvender indenfor steroidkemi til forestring af sekundære og tertiære hydroksygrupper. Som egnet forestringsmetode skal f.eks. nævnes omsætningen af steroiderne med

syreanhydrider eller syreklorider i nærværelse af basiske katalysatorer, såsom natriumbikarbonat, kaliumbikarbonat, kaliumkarbonat, natriumhydroksyd, kaliumhydroksyd, pyridin, lutidin, kollidin eller 4-dimethylaminopyridin.

De hidtil ukendte  $\alpha$ -hydroksysteroider af den almene formel I udviser et lignende virkningsspekturm som de i 1-stilling ikke-hydroksylerede steroider, hvoraf de fremstilles, d.v.s. at de hidtil ukendte forbindelser er meget stærkt gestagent virksomme. Sammenlignet med de i 1-stilling ikke-hydroksylerede forbindelser er den androgene bivirkning dog tydeligt svækket. Desuden optræder der en østrogen virkning hos forbindelserne ifølge opfindelsen. På grund af disse egenskaber er de hidtil ukendte forbindelser meget værdifulde virksomme stoffer til anvendelse som kontrceptiver.

Til kontrceptiv brug forarbejdes de hidtil ukendte forbindelser til de sædvanlige former med de sædvanlige tilsætninger, bærestoffer og smagskorrigerer på i og for sig kendte måder. Til oral applikation kan der især være tale om tabletter, drageer, kapsler, piller, suspensioner eller opløsninger, og til parenteral applikation især olieagtige opløsninger som f.eks. sesamolie og ricinusolieopløsninger, der eventuelt yderligere kan indeholde et fortyndingsmiddel som f.eks. benzylbenzoat eller benzylalkohol. Koncentrationen af det virksomme stof er afhængig af applikationsformen.

De hidtil ukendte forbindelser egner sig som orale kontrceptiva. De kan også anvendes som orale kontrceptiva uden en tilsætning af østrogener. Naturligvis kan der også anvendes kombinationer af de hidtil ukendte gestagener med kendte østrogener.

De følgende eksempler tjener til at belyse fremgangsmåden til fremstilling af forbindelserne ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

En 2 liter Erlenmeyerkolbe, der indeholder 500 ml af en i 30 minutter ved 120°C i autoklav steriliseret næringsopløsning af 5% glukose, 0,5% majsstøbevæske, 0,2% natriumnitrat, 0,1% kaliumdihydrogenfosfat, 0,05% kaliumklorid, 0,05% magniumsulfat og 0,002% jern(II)-sulfat, podes med en lyofilkultur af *Calonectria decora* (ATCC 14767) og rystes i 5 dage ved 30°C på en rotationsryster. Med denne forkultur podes så en 20 liter forgæringsbeholder, der er fyldt med 15 liter af et ved 121°C og 1,1 ato steriliseret medium af samme sammensætning som forkulturen. Under tilsætning af Silicon SH som antiskummiddel germineres ved 29°C under luftning og omrøring i 24 timer. 1 liter af kulturvæsken bliver under sterile betingelser overført til 14 liter af et som ovenfor steriliseret næringsmedium af samme sammensætning og dyrkes under samme betingelser. Efter 12 timer tilsættes en sterilfiltreret opløsning af 7,5 g 17β-hydroksy-17α-ætynyl-4-østren-3-on i 75 ml dimetylformamid og inkuberes videre.

Efter fuldstændig omdannelse af substratet (38 timers berørings-tid) udrøres forgæringsbeholderens indhold to gange med hver 10 liter metylisobutylketon, og ekstrakten inddampes ved 50°C badtemperatur i vakuum. Med henblik på fjernelse af antiskummidlet vaskes remanensen flere gange med heksan og kromatograferes til slut over en kiselgelsøjle ved hjælp af gradienten metylenklorid-metylenklorid/acetone 8+2. Efter krystallisation af acetone/isopropylæter får man 1α,17β-dihydroksy-17α-ætynyl-4-østren-3-on, smeltepunkt 207-208°C.

Eksempel 2

Til 100 mg 1α,17β-dihydroksy-17α-ætynyl-4-østren-3-on sættes 3 ml pyridin og 0,3 ml eddikesyreanhydrid, og der omrøres i 20 timer ved 30-35°C. Man inddamper blandingen i højvakuum, optager remanensen i eddikeester, vasker eddikeesterfasen, tørrer den, inddamper den i vakuum og får 17β-hydroksy-1α-acetoksy-17α-ætynyl-4-østren-3-on som en farveløs olie, smp. 98-101°C (dietylæter/hexan).

Eksempel 3

En 2 liter Erlenmeyerkolbe, der indeholder 500 ml af en i 30 minutter ved 120°C i autoklav steriliseret næringsopløsning af 3,0% glukose,

1,0% majsstøbevæske, 0,2%  $\text{NaNO}_3$ , 0,1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,05%  $\text{MgSO}_4$ , 0,002%  $\text{FeSO}_4$  og 0,05%  $\text{KCl}$ , podes med en lyofilkultur af stammen *Aspergillus clavatus* (ATCC 9598) og rystes i 2 dage ved  $30^\circ\text{C}$  på en rotationsryster. Med denne forkultur podes en 50 liter forgæringsbeholder, der er fyldt med 30 liter af et ved  $121^\circ\text{C}$  og 1,1 ato steriliseret medium af samme sammensætning som forkulturen. Under tilsætning af Silicon SH som antiskummemiddel germineres ved  $29^\circ\text{C}$  under luftning og omrøring i 72 timer.

900 ml af kulturvæsken bliver under sterile betingelser overført til 14 liter af et som ovenfor steriliseret næringsmedium af samme sammensætning og dyrkes under samme betingelser. Efter 24 timer tilsættes en i nærværelse af vandig Tween<sup>®</sup> 80 meget fint formålet steriliseret suspension af 7,5 g  $17\alpha$ -ætynyl- $17\beta$ -hydroksy-18-metyl-4-østren-3-on i destilleret vand, og der germineres videre.

Forløbet af omdannelsen følges ved tyndtlagskromatografisk analyse af metylisobutylketonekstrakter af forgæringsprøver. Efter ca. 90 timers berørings-tid er omdannelsen fuldstændig. Svampemyceliet frafiltreres, og kulturfiltratet ekstraheres to gange med hver 10 liter metylisobutylketon. Parallelt dermed udrøres det frafiltrerede mycelium flere gange med en blanding af metylisobutylketon, acetone og vand og ekstraheres herved.

De organiske ekstraktopløsninger forenes og inddampes til tørhed i vakuum ved en badtemperatur på  $50^\circ\text{C}$ . Den tilbageblevne remanens vasker man flere gange med heksan og kromatograferer til slut over en kiselgelsøjle. Med henblik på yderligere rensning krystalliserer man produktet af metylenklorid/benzol, og med henblik på fjernelse af benzolen opløser og udfælder man benzolsolvatet endnu en gang af ætanol/vand. Den rene  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha,17\beta$ -dihydroksy-18-metyl-4-østren-3-on smelter ved  $180^\circ\text{C}$ .

#### Eksempel 4

500 mg  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha,17\beta$ -dihydroksy-18-metyl-4-østren-3-on opløses i 10 ml pyridin, der tilsættes 0,5 ml eddikesyreanhydrid, og man lader henstå i køleskab i 30 timer. For at gøre reaktionen fuldstændig omrører man derefter endnu nogle timer ved stuetemperatur. Derpå inddampes reaktionsblandingen i højvakuum, remanensen optages i eddike-

ester og vaskes neutral med destilleret vand. Efter tørring over natriumsulfat og inddampning af eddikeesteropløsningen får man  $1\alpha$ -acetoksy- $17\alpha$ -ætynyl- $17\beta$ -hydroksey- $18$ -metyl- $4$ -østren- $3$ -on, smp.  $173-175^{\circ}\text{C}$  (acetone/vand).

#### Eksempel 5

650 mg  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha$ , $17\beta$ -dihydroksey- $18$ -metyl- $4$ -østren- $3$ -on optages i 15 ml pyridin, der tilsættes 2 ml ønantsyreanhydrid og omrøres i 16 timer ved stuetemperatur. Derpå inddamper man blandingen i højvakuum, optager remanensen i eddikeester og vasker neutral med destilleret vand. Efter inddampning af den tørrede eddikeesterfase bliver der tilbage  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha$ -heptanoyloksy- $17\beta$ -hydroksey- $18$ -metyl- $4$ -østren- $3$ -on som en svagt gullig olie, smp.  $185-186^{\circ}\text{C}$  (acetone/vand).

#### Eksempel 6

Til 300 ml  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha$ , $17\beta$ -dihydroksey- $4$ -østren- $3$ -on sættes 10 ml pyridin og 1,5 ml eddikesyreanhydrid, og der omrøres i 4 dage ved stuetemperatur under nitrogen. Derpå inddampes reaktionsblandingen i højvakuum, remanensen optages i eddikeester og vaskes neutral med destilleret vand. Efter tørring over natriumsulfat og inddampning af eddikeesteropløsningen i vakuum får man  $17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha$ , $17\beta$ -diacetoksy- $4$ -østren- $3$ -on, smp.  $163-165^{\circ}\text{C}$  (diætylæter/heksan).

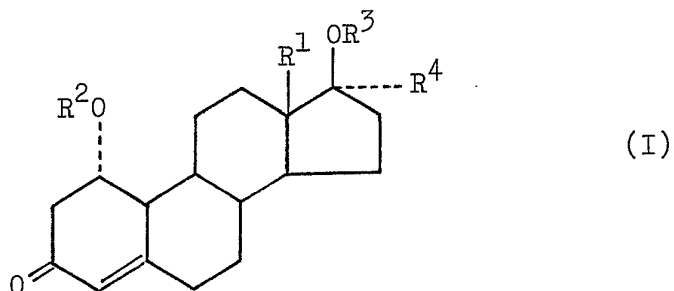
#### Eksempel på sammensætning af et kontraceptivt middel i form af drageer.

0,075 mg	$17\alpha$ -ætynyl- $1\alpha$ , $17\beta$ -dihydroksey- $18$ -metyl- $4$ -østren- $3$ -on
0,030 mg	$17\alpha$ -ætynyl-østradiol
31,900 mg	mælkesukker
18,420 mg	majsstivelse
2,060 mg	polyvinylpyrrolidon 25
0,010 mg	p-hydroxybenzoesyremetylester
0,005 mg	p-hydroxybenzoesyrepropylester
2,500 mg	talkum
<hr/>	
55,000 mg	samlet vægt af tablet, der drageres med sædvanlig sukkerblanding til ca. 90 mg.

P a t e n t k r a v.

-----

17 $\alpha$ - $\text{\AA}$ tynyl-17 $\beta$ -hydroksey-4- $\text{\AA}$ stren-3-oner til anvendelse som kontracep=  
tiva, k e n d e t e g n e t ved, at de er 17 $\alpha$ - $\text{\AA}$ tynyl-1 $\alpha$ ,17 $\beta$ -dihydrok=  
sy-4- $\text{\AA}$ stren-3-oner med den almene formel I



hvor R<sup>1</sup> er en metylgruppe eller en  $\text{\AA}$ tylgruppe, R<sup>2</sup> og R<sup>3</sup> er hydrogen=  
atomer eller alkanoylgrupper med 1-8 carbonatomer, og R<sup>4</sup> er en  $\text{\AA}$ ty=  
nylgruppe.

Fremdragne publikationer:

US patent nr. 3418415.