

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) 183 021

A bejelentés napja: (22) 17. 12. 76.

(21) (SchE-587)

A bejelentés elsőbbsége:

(33)

DE

(32)

19. 12. 75.

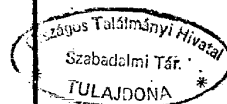
(31)

(P 25 58 090.9)

A közzététel napja: (41) (42) 83. 09. 28.

Megjelent: (45) 86. 04. 20.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,
C 12 P 33/00



Feltaláló(k): (72)

dr. WEBER Alfred, okl. vegyész, dr. KENNECKE Mario, okl. vegyész, dr. MÜLLER Rudolf, okl. vegyész, dr. EDER Ulrich, okl. vegyész, dr. WIECHERT Rudolf, professor, okl. vegyész, Nyugat-Berlin, WB

Szabadalmaz: (73)

Schering AG., Nyugat-Berlin, WB, és Bergkamen, DE.

(54)

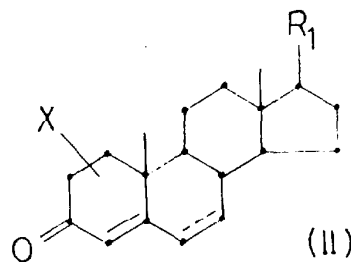
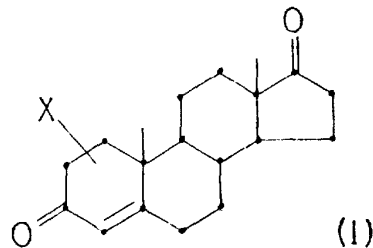
ELJÁRÁS 4-ADNROSZTÉN-3,17-DION-SZÁRMAZÉKOK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékok előállítására, ahol X 1,2-metilén-csoportot vagy 1- vagy 2-helyzetben kapcsolódó metilcsoportot jelent.

A találmány értelmében úgy járnak el, hogy valamely (II) általános képletű szterin-származékot – ahol X a fenti jelentésű, egyes vagy kettős kötést jelöl és R₁ valamely szterin 8–10 szénatomos szénhidrogén-csoportját jelenti – valamely, Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 mikroorganizmus-kultúrával fermentálnak.

A kapott vegyületek értékes, farmakológiai hatású vegyületek előállítására használhatók kiindulási anyagként.



A találmány tárgya eljárás az (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékok előállítására, ahol X a 1,2-metilén-csoportot vagy valamely 1- vagy 2-helyzetben kapcsolódó metilcsoportot jelent.

A találmány értelmében úgy járunk el, hogy valamely (II) általános képletű szterin-származékot – ahol X a fenti jelentésű, a kötés egyes vagy kettős kötést jelent és R₁ valamely szterin 8–10 szénatomos szénhidrogéncsoportját jelenti – Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 mikroorganizmus-kultúrával fermentálunk.

Valamely 8–10 szénatomos R₁ szénhidrogéncsoport olyan csoportot kell érteni, ahogyan az a természetben előforduló zoo- vagy fitoszterinek, például a koleszterin, sztigmaszterin, kampeszterin, brasszicaszterin vagy a szitoszterinek adott esetben hidrogénezett oldalláncában előfordul.

Alkalmas (II) általános képletű szterin-származékok például a (IIa) általános képlettel jellemezhető vegyületek, ahol X és a fenti jelentésű és R₂ hidrogénatomot, metil- vagy etilcsoportot jelent.

A találmány szerinti eljárásban kiindulási anyagként alkalmazhatunk például olyan szterineket, amelyekben az X szubsztituens 1 α -metilcsoportot, 1 β -metilcsoportot, 1 α ,2 α -metilén-csoportot vagy 1 β ,2 β -metilén-csoportot jelent. Alkalmas kiindulási anyag például az 1 α -metil-4-kolesztén-3-on, az 1 β -metil-4-kolesztén-3-on, 1 α ,2 α -metilén-4,6-kolesztadién-3-on, 1 α -metil-4-sztigmasztén-3-on, 1 α ,2 α -metilén-4-sztigmasztén-3-on, 1 α ,2 α -metilén-4,6-sztigmasztadién-3-on vagy a megfelelő szitoszterin-származékok.

Ismert, hogy számos mikroorganizmus (így például az Arthrobacter, Brevibacterium, Microbacterium, Protamino bacter, Bacillus, Norcardia, Streptomycetes és különösen a Mycobacterium genus-hoz tartozó mikroorganizmus) természetéből adódóan képes a zoo- és fitoszterinek széndioxidra és vízre való lebontására, és ennek a lebontásnak a során 4-androsztén-3,17-dion és 1,4-androsztadién-3,17-dion közbenső termék képződik.

Ismert továbbá, hogy inhibitor adalékanyagok vagy mikroorganizmusok mutánsainak segítségével lehetőség van arra, hogy a szterinek lebontását úgy irányítsák, hogy elkerüljék a képződött 4-androsztén-3,17-dion vagy 1,4-androsztadién-3,17-dion lebomlását (1 543 269 és 1 593 327 számú német szövetségi köztársaságbeli nyilvánosságra hozatali irat és a 3 684 657 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A szakember számára is meglepő, hogy az ismert körülmények között a (II) általános képletű szterin-származékok oldalláncai is lebomlanak, minthogy ismert az, hogy a szterinek oldalláncának lebontását egy nagyon összetett enzimszisztéma befolyásolja, és nem volt előre várható, hogy a természetben előforduló szteroidok oldalláncának lebontását befolyásoló összes enzim rendelkezik azzal a képességgel, hogy a természetben elő nem forduló (II) általános képletű szterin-származékok oldalláncának lebontását is befolyásolja. Ezen túlmenően az sem volt előre várható, hogy az 1,4-androsztadién-3,17-dion és a 4-androsztén-3,17-dion lebontását befolyásoló enzimszisztéma nem képes az (I) általános képletű androsztén-3,17-dion-származékok lebontására.

A Δ^6 -kötést tartalmazó (II) általános képletű szterin-származékok fermentatív reakciója során ez a kötés meglepő módon hidrogéneződik.

Eltekintve attól, hogy más kiindulási anyagokat alkal-

mazunk és a reakciót inhibitorok távollétében valósítjuk meg, a találmány szerinti eljárás ugyanolyan fermentációs körülmények között valósítjuk meg, mint amilyen körülményeket a szterinek ismert mikrobiológiai oldal-

5 lánclétező reakcióinak esetén is alkalmazunk. Az irodalom számos törzset ismert szteroidok 17-alkil-oldalláncának lebontására. Az ilyen mikroorganizmusokról részletes ismertetést ad W. Charney és H. L. Herzog Microbiological Transformation of Steroids. Academic Press., New York, és London című munkája. Az eljárásban előnyösen használható a Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 törzs.

A Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 törzset a 3 759 791 sz. amerikai szabadalmi leírás ismerteti; a 15 törzset az A.R.S. Culture Collection Investigations Fermentation Laboratory, 1815 N. University Ave, Peoria, Ill. 61604 intézettől szereztük be. E törzsek kiterjedt irodalommal rendelkeznek és alkalmasak például koleszt-5-én-3 β -ol. (24R)-metil-koleszt-5-én-3 β -ol, 20 sztigmaszt-5-én-3 β -ol, sztigmaszt-4-én-3-on, sztigmaszt-5,22-dién-3 β -ol, sztigmaszt-4,22-dién-3-on és hasonló szteroidok androszt-4-én-3,17-dionná történő átalakítására.

A fentiekben említett további törzsek ugyancsak bárki számára hozzáférhetők a megfelelő törzsgyűjteményekből.

A mikroorganizmusokat az ilyen mikroorganizmusok esetében szokásos körülmények között, valamely alkalmas táptalajban, levegőztetett, szubmersz kultúrákban tenyésztjük. Ezután hozzáadjuk a kultúrához a szubsztátumot (valamely alkalmas oldószerben feloldva vagy 30 előnyösen emulgeált alakban), és addig fermentáljuk, amíg maximális szubsztátum átalakulást nem értünk el.

A szubsztátum alkalmas oldószerrei például a metanol, etanol, glikolmonometiléter, dimetilformamid vagy 35 dimetilszulfoxid. A szubsztátum emulgeálását például úgy valósíthatjuk meg, hogy a szubsztátumot mikronizált alakban vagy valamely vízzel elegyedő oldószerben (így metanolban, etanolban, acetonban, glikolmonometiléterben, dimetilformamidban vagy dimetilszulfoxidban) feloldva, erős keverés közben az emulgeálás általános alkalmazott segédanyagait tartalmazó (előnyösen 40 mesztelenített) vízbe adagoljuk. Az emulgeálás segédanyagait nem ionos emulgeátorok, így például etilénoxid-adduktumok vagy poliglikolok zsírsavészterei. Az alkalmas emulgeátorok példáulként megnevezzük a kereskedelemben Tegin, Tagat, Tween és Span névvel kapható nedvesítőszereket.

A szubsztátum optimális koncentrációja, beadagolásának ideje és a fermentáció tartama az alkalmazott szubsztátum szerkezetétől és a felhasznált mikroorganizmus fajtájától függ. Ezeket az értékeket, ahogyan ez a szteroidok mikrobiológia átalakításának esetében általában szükséges, az egyes esetekben a szakember által 55 jól ismert előkísérletekkel kell meghatározni.

A találmány szerinti eljárással előállítható (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékokat farmakológiailag hatásos szteroidok előállítására használhatjuk kiindulási anyagokként.

60 Így például a 4-androsztén-3,17-dion-származékok 17-ketocsoportját adott esetben a 3-oxo-csoport ketállá történő átalakítása után redukálhatjuk, vagy valamely (IV) általános képletű szerves fém-vegyülettel reagáltathatjuk – ahol R₄ valamely rövidszénláncú telített vagy 65 telítetlen szénhidrogéncsoportot jelent és Me valamely

alkálifématomot vagy magnéziumhalogenidcsoportot képvisel –, így az adott esetben jelenlévő ketálcsoport lehasítása után a (III) általános képletű 17 β -hidroxi-4-androsztén-3-on-származékokat kapjuk, ahol X a fenti jelentésű és R₃ jelentése megegyezik R₄ jelentésével vagy jelenthet még hidrogénatomot is.

R₃ jelentésében rövidszénláncú felített vagy telítetlen szénhidrogéncsoporton előnyösen metil-, etil-, vinil- vagy etinilcsoportot kell érteni.

Az (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékok 17-ketocsoportjának redukcióját a szakember számára ismert eljárásokkal végezzük [lásd például Fried, John: Organic Reactions in Steroid Chemistry, van Nostrand Reinhold Comp., New York, 1. kötet 61. oldal (1972)]. Így például ezeket a vegyületeket ketállá történő átalakítás után nátriumbórhidriddel vagy lítium-alumíniumhidriddel reagáltatjuk, és a ketálcsoport elbontása után a megfelelő (III) általános képletű 17 β -hidroxi-4-androsztén-3-on-származékokat kapjuk, amelyek ismert módon anabolikus és/vagy androgén hatásúak.

Ugyanígy ismertek módszerek a 17-ketocsoport alkilezésére [lásd például Fried, John: Organic Reactions in Steroid Chemistry, van Nostrand Reinhold Comp., New York, 2. kötet 53. oldal (1972)]. Így az (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékokat adott esetben a 3-oxocsoport ketálcsoporttá történő átalakítása után például alkilmagnéziumhalogenidekkel, vinillítiummal vagy alkálifémacetilidekkel reagáltathatjuk, és az adott esetben jelenlévő ketálcsoportok lehasítása után a (III) általános képletű 17 α R-17 β -hidroxi-4-androsztén-3-on-származékokat kapjuk, amelyek ismert farmakológiailag hatásos anyagok vagy farmakológiailag hatásos szteroidok előállítására használhatók kiindulási anyagokként.

A találmány szerinti eljárásban kiindulási anyagokként alkalmazott (II) általános képletű szterin származékokat a megfelelő szterinekből állíthatjuk elő olyan módszerek segítségével, amelyeket a megfelelő 1- és/vagy 2-helyzetben levő szubsztituensek szteroidokba történő bevitelére általánosan alkalmaznak.

A találmány szerinti eljárás foganatosítására az alábbi kiviteli példákat adjuk meg.

A) Oldallánc mikrobiológiai lebontása

1. példa

2 literes Erlenmeyer lombikban levő, 500 ml térfogatú steril táptalajt, amely 1% élesztőextraktumot, 0,45% dinátriumhidrogénfoszfátot, 0,34% káliumdihidrogénfoszfátot és 0,2% Tween 80 emulgeátort tartalmaz, és amelynek pH-értékét 6,7-re állítottuk, a Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 törzs száraz kultúrájának szuszpenziójával beoltunk, és három napon át rázzuk 30 °C hőmérsékleten, percenként 190 fordulattal.

20 darab, Erlenmeyer-lombikban levő 100–100 ml steril táptalajt, amely 2,0% kukoricalevárt, 0,3% diammóniumhidrogénfoszfátot és 0,25% Tween 80 emulgeátort tartalmaz, és amelynek pH-értékét 6,5-re állítottuk be, beoltunk a Mycobacterium spec. tenyészkultúrájának 5–5 ml-ével és 24 órán át rázzuk 30 °C hőmérsékleten, percenként 220 fordulattal.

Ezután mindegyik kultúrához hozzáadunk 100 mg, 1 ml dimetilformamidban oldott 1 α ,2 α -metilén-4,6-

kolesztadién-3-ont, és további 96 órán át fermentáljuk 30 °C hőmérsékleten.

Az egyesített kultúrákat etilénkloriddal extraháljuk, az extraktumot vákuumban bepároljuk, a maradékot kovasav oszlopon végzett kromatográfálással tisztítjuk, és így diizopropiléterből való átkristályosítás után 0,9 g 1 α ,2 α -metilén-4-androsztén-3,17-diont kapunk, amelynek olvadáspontja 155 °C.

A kiindulási anyagot az alábbi módon állítjuk elő.

a) 111 g 3 β -hidroxi-5-kolesztént 2,2 liter toluol és 111 ml ciklohexán elegyében az elegy forráspontjára melegítünk, hozzácsöpögtetjük 55,5 g alumíniumizopropilát 666 ml toluollal készített oldatát, majd 90 percen át tovább melegítjük lassú ledesztillálás közben. A lehűlt reakcióelegyet éterrel felhígítjuk, híg kénsavval és vízzel mossuk és bepároljuk. A maradékot vízgőzdesztillációnak vetjük alá, és a metilénkloriddal végzett extrakcióval kapott nyersterméket szilikagélen kromatográfáljuk. Metanolból való átkristályosítással 70 g 4-kolesztén-3-ont kapunk, amelynek olvadáspontja 79–80,5 °C.

b) 60 g 4-kolesztén-3-ont feloldunk 2 liter éter és 1 ml, brómhidrogénsavat tartalmazó 37%-os ecetsav elegyében, keverés közben hozzáadjuk 52,4 g bróm 300 ml ecetsavval készített oldatát, és a reakcióelegyet 15 percen át keverjük. Ezután további kis mennyiségű éterrel felhígítjuk, és egymást követően vízzel, nátriumhidrogénkarbonát-oldattal és vízzel mossuk. Szárítás és bepárlás után 90 g nyers 2,6-dibróm-4-kolesztén-3-ont kapunk olajszerű anyag alakjában.

c) 90 g nyers 2,6-dibróm-4-kolesztén-3-ont 20 órán át keverünk 100 °C hőmérsékleten 900 ml dimetilformamidban 36,9 lítiumkarbonáttal és 43,3 g lítiumbromiddal. Ezután jeges vízbe keverjük, a csapadékot leszűrjük, vízzel mossuk és metilénkloridban felvesszük. Szárítás és bepárlás után a maradékot szilikagélen kromatográfáljuk, így 42 g 1,4,6-kolesztatrién-3-ont kapunk olajszerű anyag alakjában.

d) 31,9 g trimetilszulfonóxi-jodidot 2 órán át keverünk szobahőmérsékleten 1 liter dimetilszulfidban 5,6 g elporított nátriumhidriddel. Ezt az oldatot azután 40 g, 200 ml abszolút tetrahidrofuranban oldott 1,4,6-kolesztatrién-3-onhoz adjuk, és a reakcióelegyet 24 órán át keverjük szobahőmérsékleten. Ezután ecetsavat tartalmazó jeges vízbe keverjük, a kivált olajszerű anyagról dekantáljuk, és ezt éterben felvesszük. Szárítás és bepárlás után kromatográfiásan tisztítjuk, majd metanolból átkristályosítjuk a terméket. Így 10,5 g 1 α ,2 α -metilén-4,6-kolesztadién-3-ont kapunk, amelynek olvadáspontja 68–69 °C.

2. példa

20 darab Erlenmeyer-lombikban az 1. példa szerinti körülmények között 100–100 mg 1 α -metil-4-kolesztén-3-ont a Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 törzs kultúrájával reagáltatunk és feldolgozzuk. Így 1 α -metil-4-androsztén-3,17-diont kapunk, amelynek olvadáspontja 134–137 °C.

A kiindulási anyagként alkalmazott 1 α -metil-4-kolesztén-3-on ismert [C. A. 61., 8367 (1964)].

B) A 4-androsztén-3,17-dion-származékok további átalakítása

I. példa

3,2 g $1\alpha,2\alpha$ -metilén-4-androsztén-3,17-diont 50 ml abszolút etanolban feloldunk, 0°C -ra hűtjük, és részletekben összekeverjük 0,5 g nátriumbórhidriddel. A reakcióelegyet 3 órán át reagáltatjuk jeges hűtés közben, majd 50 ml félig telített nátriumdihidrogénfoszfát-oldatba belekeverjük, a kivált terméket leszűrjük és vízzel kimossuk. Etanolból végzett átkristályosítás után 1,95 g 17β -hidroxi- $1\alpha,2\alpha$ -metilén-4-androsztén-3-ont kapunk. ezt szobahőmérsékleten ecetsavanhidrid-piridin eleggyel acetilezve 17β -acetoxi- $1\alpha,2\alpha$ -metilén-4,6-androsztén-3-ont kapunk, amely erős anabolikus hatású vegyület [Arzneim. Forschung 15., 1168. (1965)].

II. példa

1α -Metil-4-androsztén-3,17-diont az I. példa szerinti módon alakítunk erősen anabolikus hatású 17β -acetoxi-

1α -metil-4-androsztén-3-onná [Arzneim. Forschung 15., 1168. (1965)].

5

SZABADALMI IGÉNYPONT

- Eljárás az (I) általános képletű 4-androsztén-3,17-dion-származékok előállítására – ahol
- X $1,2$ -metilén-csoportot vagy 1 - vagy 2 -helyzetben kapcsolódó metil-csoportot jelent –, *azzal jellemezve*, hogy valamely (II) általános képletű szterin-származékot – ahol X a fenti jelentésű,
 15 egyes vagy kettős kötést jelöl és R_1 valamely szterin 8 - 10 szénatomos szénhidrogéncsoportját jelenti – valamely, a Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 mikro-organismus-kultúrával fermentálunk.

1 db ábraoldallal

