

STEROIDE, LIX ¹⁾

TRITIUMMARKIERUNG EINES NEUEN HOCHWIRKSAMEN GESTAGENS: STS 557

 $[14\alpha, 15\alpha\text{-}^3\text{H}]-17\alpha\text{-CYANOMETHYL-}17\text{B-HYDROXY-ÖSTRA-}4,9\text{-DIEN-}3\text{-ON}$ H. Wagner, J. Römer[†], M. Hübner und K. Ponsold

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für
Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikro-
biologie und experimentelle Therapie, DDR - 69 Jena,
Beutenbergstraße 11

[†]Akademie der Wissenschaften der DDR, Zentralinstitut für
Kernforschung Rossendorf, DDR - 8051 Dresden

SUMMARY: The preparation of $[14\alpha, 15\alpha\text{-}^3\text{H}]-17\alpha\text{-cyanomethyl-}17\text{B-}$
hydroxy-estra-4,9-diene-3-one (X) starting with catalytic
tritiation of 3-methoxy-estra-1,3,5(10),8,14-pentaene-17B-ol
(I) and followed by a ten-step synthesis is described.
This new high effective gestagene STS 557 was obtained with
high specific activity and radiochemical purity better than
98 %. Radiolysis and storage conditions are examined.

KEY WORDS: $17\alpha\text{-Cyanomethyl-}17\text{B-hydroxy-estra-}4,9\text{-diene-}3\text{-one}$,
Gestagene, Tritium, Synthesis

EINFÜHRUNG

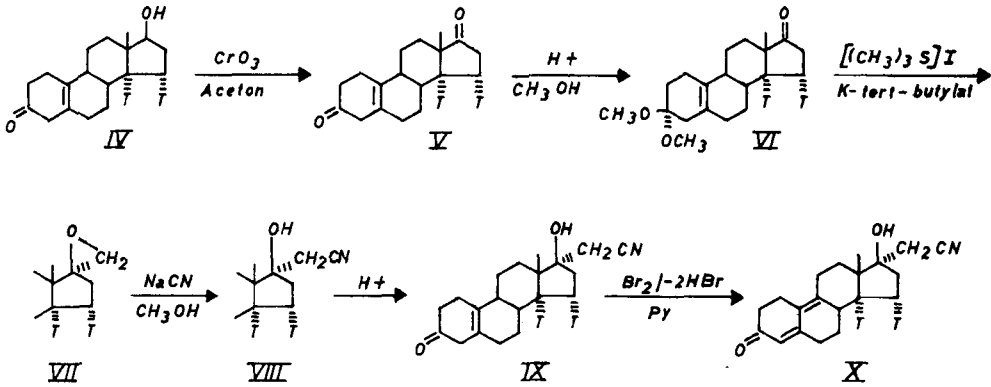
Im Rahmen unserer Arbeiten über Synthese und biologische Wir-
kung von Steroidhormonen befassen wir uns seit einigen Jahren
speziell mit solchen Verbindungen, die einen $17\alpha\text{-CH}_2\text{X}$ -Substi-

¹⁾58. Mitt.: M. Hübner, K. Ponsold, M. Oettel u. R. Freund

tuenten (X = funktionelle Gruppe) neben der 17 β -Sauerstoff-funktion besitzen. Nach Derivaten des Östradiols [1] wurden solche des Testosterons und 19-Nortestosterons hergestellt [2] und in jüngster Zeit synthetisierten wir analoge Derivate des von Perelman [3] erstmalig beschriebenen 17 β -Hydroxy-östra-4,9-dien-3-ons [4].

Parallel zu diesen Arbeiten erfolgten Tritium-Markierungen ausgewählter Verbindungen für pharmakokinetische Untersuchungen [5]. Die bei den Östratrienen benutzte 9,11-Markierung - die auch für den 17 β -Azidokohlensäureester des 19-Nortestosterons Anwendung fand [6] - kam für das Östra-4,9-dien-3-on-System nicht in Frage (kein Proton in 9-Stellung; Instabilität der 11-Protonen durch Enolisierung). Mögliche Alternativen sind eine 6,7-Markierung, die im Fall des Methyltrienolons (R 1881) bzw. Trenbolons (Östra-4,9,11-trien-3-on-System) bei der Fa. Roussel-Uclaf durchgeführt wurde [7] oder eine 14,15-Markierung, wie sie bei Norgestrel bzw. Noräthisteron zur Anwendung kam [8, 9], allerdings ohne Publikation der Synthese durch die Fa. Schering. Gegen die 6,7-Markierung sprechen eine Metabolisierung in diesen Positionen sowie die Instabilität der Protonen in 6-Stellung (Allylposition), so daß wir uns für eine 14,15-Markierung entschieden, die keinen dieser Nachteile aufweist.

Bei der katalytischen Hydrierung eines 14,15-Dehydrosteroids muß der Angriff von der α -Seite erfolgen, um zur natürlichen 14 α -Konfiguration zu kommen. Das bedeutet die Nichtverwendbarkeit des 3-Methoxy-östra-1,3,5(10),14-tetraen-17-ons für diesen Zweck, da hier der Angriff von der β -Seite erfolgt [10].



Bei der katalytischen Hydrierung verbrauchten wir für 0,3 mMol I 0,32 mMol T_2 . Der Mehrverbrauch resultierte aus der Aufnahme des Katalysators (1 mg Pd bindet maximal $3, \mu\text{Mol H}_2$). Im Kondensat wurden nach Abtausch labilen Tritiums durch Behandeln mit Äthanol 0,92 Ci gefunden. Die Hydrierung verlief sehr rasch und kam nach 30 Minuten nahezu zum Stillstand. Chromatographisch wurde quantitative Umsetzung von I zu II und einer geringen Menge eines Nebenprodukts nachgewiesen. Hierbei handelte es sich um 8α -Östradiol-3-methyläther, entstanden infolge partiellen Angriffs auf die 8,9-Doppelbindung von der α -Seite analog zur gewünschten 14,15-Hydrierung [12]. Nach inaktiver Verdünnung und Bestimmung der spezifischen Aktivität ergab die Rückrechnung für II (inclusive des nichtabgetrennten Nebenprodukts) eine Ausgangsaktivität von 61,7 Ci/mMol, d. h. der theoretische Wert (58 Ci/mMol) erhöht durch die geringe, aber vierfach markierte Menge an 8α -Östradiol-3-methyläther und eine schwache katalytische Austauschmarkierung im aromatischen A-Ring von II.

Bei der zweistufigen Birch-Reduktion von II zu III erfolgte die Reduktion der 8,9-Doppelbindung zur gewünschten 8 β ,9 α -Konfiguration mit Anilin [12] und die Reduktion des so erhaltenen Östradiol-3-methyläthers mit Isopropanol [14, 6].

Infolge nichtquantitativer Umsetzung blieb Östradiol-3-methyläther als Verunreinigung von III zurück. Bei der Umsetzung des Enoläthers zu IV mit verdünnter Mineralsäure entstand als zweite Verunreinigung eine geringe Menge des konjugierten Ketons (3-Keto- Δ 4). Beide Nebenprodukte wurden bei der Jones-Oxydation zu V in die entsprechenden 17-Ketone überführt. Der entstandene Östron-3-methyläther reagierte unter den Bedingungen der Ketalisierung nicht und konnte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit in absolutem Methanol größtenteils abgetrennt werden. Das ebenfalls vorhandene Δ 4-Dion bildete kein Dimethylketal; sein Gehalt vergrößerte sich aber bei dieser Reaktion, da sich das nichtkonjugierte Δ 5(10)-Dion V unter Säureeinfluß teilweise in das konjugierte Δ 4-Dion umlagerte. Weiterhin verlief die Ketalisierung des Δ 5(10)-Dions V nicht absolut quantitativ, so daß sich die gefundene 70%ige radiochemische Reinheit von VI durch diese drei Verunreinigungen erklärte.

Da eine Umkristallisation von VI nur große Substanzverluste bei geringem Reinigungseffekt gebracht hätte, wurden die drei Nebenprodukte, die aufgrund ihrer 17-Ketogruppe sowohl der Oxiranbildung wie der Cyanidspaltung unterlagen, bis zur Endstufe im Reaktionsgemisch belassen. Die hier wegen der Bildung polarer Nebenprodukte vorgesehene präparative Plattentrennung

wurde gleichzeitig zur Abtrennung dieser unpolarerer Substanzen genutzt.

So wurden aus 200 mg Rohprodukt von X - bei etwa 70 % radiochemischer Reinheit entsprach das ca. 140 mg Reinsubstanz - nach der ersten präparativen Plattentrennung 92 mg X mit einer radiochemischen Reinheit von 92 % gewonnen. Das entspricht einer Ausbeute von 66 % (bezogen auf die 140 mg Reinsubstanz) bzw. einer Gesamtausbeute von 7,6 % (bezogen auf II). Eine zweite präparative Plattentrennung, bei der die Substanzzone wegen Mitlaufens polarer Verunreinigungen in drei Unterzonen 1, 2 und 3 (mit fallendem R_f -Wert) zerlegt wurden, ergab 20 mg X (Zone 1) und 18 mg (Zone 2) mit einer radiochemischen Reinheit von 98 % und 97 % sowie 28 mg X (Zone 3) mit einer radiochemischen Reinheit von 92 %. Von den 92 mg der ersten Plattentrennung (66 % Ausbeute) wurden bei der zweiten Trennung insgesamt 66 mg (72 % Ausbeute) zurückgewonnen.

Die spezifische Aktivität des Endprodukts X (Zone 1) betrug 4,1 Ci/mMol, die des Ausgangsprodukts II 4,7 Ci/mMol. Diese Abnahme erklärte sich aus dem Verlust der Austauschmarkierung im aromatischen A-Ring durch die Birch-Reduktion sowie die Entfernung des als Nebenprodukt entstandenen vierfachmarkierten 8α -Östradiol-3-methyläthers.

Zur Lagerung von Steroiden mit hoher spezifischer Aktivität sind nach Literaturangaben und eigenen Erfahrungen reines Benzol oder Mischungen von Benzol mit Methanol oder Äthanol geeignet. Bei genügender Verdünnung (10 - 50 mCi/ml) und

niedrigen Temperaturen ist die Zersetzungsrate bei den meisten Steroiden gering.

Wir lösten das aus den Zonen 1 und 2 eluierte Endprodukt X in Benzol:Methanol = 9 : 1 und lagerten diese Lösungen mit ca. 10 mCi/ml bei +5 °C. Das aus Zone 3 eluierte Produkt bewahrten wir als Feststoff bei derselben Temperatur auf.

Die Radiochemische Reinheit RP bestimmten wir, indem wir von Zeit zu Zeit Radiogramme auswerteten. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengestellt.

Tabelle: Abhängigkeit der radiochemischen Reinheit RP des markierten Endprodukts X von der Lagerzeit

Nr.	Lagerzeit in Wochen	radiochemische Reinheit (RP in %)		
		Zone 1 ^{a)}	Zone 2 ^{a)}	Zone 3 ^{b)}
1	0	98	97	ca. 92
2	1	94	97	
3	2	91,6	95,8	
4	7	90,3	95,2	
5	9	88	94	
6	10	86,1	93,4	41,4

a) als Lösung bei 5 °C gelagert; b) als Feststoff bei 5 °C gelagert.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, sinkt die RP von X bei allen drei Proben doch relativ schnell ab. Die Substanz aus Zone 1 liefert dabei schneller und mehr Nebenprodukte (4 % nach einer Woche!) als die aus Zone 2, obwohl beide zunächst etwa gleich sauber erschienen. Nach 7 Wochen war zudem ein deutlicher Startpeak bei der Substanz aus Zone 1 vorhanden.

Die Zersetzung des Feststoffs ging erwartungsgemäß wesentlich schneller vonstatten.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß RP im Fall von X nicht allein von den Lagerungsbedingungen abhängen kann. Auch besondere Strukturmerkmale (Dienonsystem, 17α -Substituent) können die Stabilität der Verbindung beeinträchtigen. Vor Verwendung von X zu pharmakokinetischen Untersuchungen macht sich daher eine chromatographische Reinigung unbedingt erforderlich.

EXPERIMENTELLES

Geräte, Chemikalien, Hilfsmittel

Alle aktiven Versuche wurden in Boxen durchgeführt. Die Hydrierung mit T_2 erfolgte in einer Markierungsapparatur [18], die schon bei früheren Arbeiten zum Einsatz kam [5,6,19,20]. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde das Flüssigkeitsszintillationsspektrometer LS-233 (Beckmann, USA), zur Auswertung von Radiodünnschichtchromatogrammen der Scanner II (Berthold-Frieseke, BRD) verwendet. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p. A. Als Laufmittel auf Kieselgelplatten (H und FF₂₅₄ Merck, BRD) oder Silufolplatten (Kavalier, CSSR) dienten Petroläther:Aceton = 4 : 1 für die Reaktionsstufen 1 bis 7 und Benzol:Essigester:Chloroform = 6 : 3 : 1 für die Reaktionsstufen 8 und 9. Die Platten wurden nach der Entwicklung getrocknet und zur Sichtbarmachung der Flecken entweder unter UV-Licht gebracht oder mit Vanillinschwefelsäure besprüht und auf 180 °C erhitzt.

[14 α , 15 α -³H]-3-Methoxy-östra-1,3,5(10), δ -tetraen-17 β -ol (II)

84,6 mg (0,3 mMol) I wurden in einem 30 ml-Kolben mit 5 ml wasserfreiem Benzol und 60 mg Katalysator (10 % Pd auf BaSO₄) versetzt und unter Rühren bei Zimmertemperatur mit T₂ von p > 600 Torr hydriert. Die Tritiumaufnahme kam nach etwa 30 Minuten zum Stillstand. Der Katalysator wurde abzentrifugiert und mit Benzol gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit ca. 1 g inaktivem II und 20 ml Äthanol versetzt und unter Rühren zwei Stunden bei erhöhter Temperatur (40 - 50 °C) zur Entfernung labilen Tritiums gehalten. Nach Gefriertrocknung lagen 1,100 g II mit einer spezifischen Aktivität von 4,72 Ci/mMol und einer radiochemischen Reinheit > 98 % vor.

[14 α , 15 α -³H]-3-Methoxy-östra-2,5(10)-dien-17 β -ol (III)

1,100 g (3,8 mMol) II wurden in einer Mischung aus 25 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran, 0,75 ml Anilin und 75 ml flüssigem Ammoniak gelöst. Unter kräftigem Rühren wurden 1,5 g Natrium portionsweise zugegeben und die tiefblaue Lösung 30 Minuten weitergerührt. Anschließend wurde 3 ml wasserfreies Isopropanol zugetropft. Nach einstündigem Rühren wurde die Lösung durch Zugabe überschüssigen Isopropanols entfärbt, auf Zimmertemperatur erwärmt, das Steroid durch Wasserzusatz ausgefällt und mit Benzol extrahiert. Nach der üblichen Aufarbeitung (Waschen und Trocknen der Benzolphase, Gefriertrocknung) wurde der verbleibende Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Dabei wurden 850 mg III mit einer Beimengung von etwa 16 % Östradiol-3-methyläther infolge nicht quantitativer Reduktion erhalten.

[14 α , 15 α -³H]-17 β -Hydroxy-östr-5(10)-en-3-on (IV)

850 mg ungereinigten Enoläthers III wurden in 10 ml Aceton suspendiert und mit 0,25 ml verdünnter Schwefelsäure versetzt. Unter häufigem Umschwenken bei Zimmertemperatur ging III in Lösung und IV schied sich nach einigem Stehen kristallin ab. Zur Vervollständigung der Kristallisation wurde auf -10 °C abgekühlt und anschließend abgesaugt. Es wurden 660 mg IV mit der gleichen prozentuellen Verunreinigung an Östradiol-3-methyläther wie III zuzüglich eines weiteren Nebenprodukts (s. Diskussion) erhalten. Radiochemische Reinheit 82 %.

[14 α , 15 α -³H]-Östr-5(10)-en-3,17-dion (V)

660 mg Rohprodukt von IV wurden in 25 ml gereinigtem Aceton (KMnO₄-Destillation) suspendiert und unter Rühren bei 0 bis 5 °C mit Jones-Reagenz [16] bis zur bleibenden Gelbfärbung tropfenweise versetzt. Nach Zersetzung des Reagenzüberschusses mit einigen Tropfen Isopropanol wurde zur Reaktionslösung die sechsfache Menge kalten Wassers gegeben. Das nach Zusatz von NaCl vollständig ausfallende Diketon wurde abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Es ergaben sich 500 mg Diketon V, das laut chromatographischem Befund zwei Nebenprodukte enthielt (s. Diskussion). Die radiochemische Reinheit betrug 81 %.

[14 α , 15 α -³H]-3,3-Dimethoxy-östr-5(10)-en-17-on (VI)

Die erhaltenen 500 mg verunreinigtes Dion V wurden in 5 ml absolutem Methanol suspendiert und 5 mg wasserfreie p-Toluolsulfonsäure zugesetzt. Innerhalb von 10 - 15 Minuten löste

sich V unter Ketalbildung auf, während der mitgeschleppte Östron-3-methyläther zurückblieb. Nach Filtration wurde die saure methanolische Lösung in gesättigte wässrige NaHCO_3 -Lösung eingerührt und das ausgefallene Dimethylketal VI mit Benzol extrahiert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden 500 mg VI in fester Form und mit einer radiochemischen Reinheit von etwa 70 % gewonnen (s. Diskussion).

$[14\alpha, 15\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -3,3-Dimethoxy-östr-5(10)-en-17 β -spirooxiran (VII)

Die 500 mg Ketal VI wurden ohne weitere Reinigung in 8 ml Dimethylformamid gelöst und mit 900 mg Trimethylsulfoniumjodid sowie 900 mg K-tert.-butylat versetzt. Die unter Schütteln entstehende rotbraune Lösung wurde nach einstündigem Stehen in viel kaltes Wasser eingerührt und das ausgefallene Oxiran VII mit Benzol extrahiert. Die übliche Aufarbeitung lieferte 440 mg VII als Rohprodukt in öliger Form; radiochemische Reinheit wie VI.

$[14\alpha, 15\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -17 α -Cyanomethyl-3,3-dimethoxy-östr-5(10)-en-17 β -ol (VIII)

Die gewonnenen 440 mg Rohprodukt von VII wurden in 20 ml Methanol gelöst und mit 1 g NaCN versetzt. Nach einstündigem Erwärmen auf 60 °C wurde die methanolische Lösung in viel kaltes Wasser eingerührt und das nach NaCl-Zusatz ausgeflockte Steroid mit Benzol extrahiert. Nach der üblichen Aufarbeitung wurden 390 mg VIII in fester Form mit einer radiochemischen Reinheit von etwa 70 % und einer spezifischen Aktivität von 4,52 Ci/mMol erhalten.

[14 α , 15 α -³H]-17 α -Cyanomethyl-17 β -hydroxy-östr-5(10)-en-3-on (IX)

390 mg VIII wurden ohne Reinigung in 10 ml Aceton gelöst und mit 0,2 ml verdünnter Schwefelsäure versetzt. Nach 10 - 15 Minuten wurde die saure Lösung in gesättigte wäßrige NaHCO₃-Lösung eingerührt. Extraktion des ausgefallenen Steroids mit Benzol und die übliche Aufarbeitung lieferten 300 mg IX in fester Form mit einer spezifischen Aktivität von 4,0 Ci/mMol und einer radiochemischen Reinheit von 70 %.

[14 α , 15 α -³H]-17 α -Cyanomethyl-17 β -hydroxy-östra-4, 9(10)-dien-3-on (X)

300 mg IX wurden in der erhaltenen verunreinigten Form (70 %) in 5 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und tropfenweise mit 0,67 ml einer 1,1 molaren Lösung von Br₂ in wasserfreiem Methanol bei -5 °C unter Rühren versetzt. Nach beendeter Zugabe wurde die Reaktionslösung bei Zimmertemperatur etwa 12 Stunden belassen, danach in 25 ml kalte 2n-HCl eingerührt. Extraktion des ausgefallenen Steroids mit Methylenchlorid ergab 200 mg Rohprodukt X (radiochemische Reinheit etwa 62 %). Die erste Reinigung auf einer präparativen TLC-Platte (20 x 20 cm, 2 mm Schichtdicke) führte zu 92 mg X mit einer radiochemischen Reinheit von etwa 92 %; die zweite Reinigung zu 20 mg X (Zone 1) mit einer radiochemischen Reinheit von 98 %, 18 mg X (Zone 2) mit einer radiochemischen Reinheit von 97 % sowie 28 mg X (Zone 3) mit einer radiochemischen Reinheit von 92 %.

Das Produkt aus Zone 1 besaß eine spezifische Aktivität von 4,1 Ci/mMol.

LITERATUR

- [1] Ponsold, K., Hübner, M., Kasch, H. und Noack, I. -
Z. Chem. 11: 106 (1971)
- [2] Ponsold, K., Hübner, M., Schade, W. und Wagner, H. -
Z. Chem., im Druck
- [3] Perelman et al. - J. Am. Chem. Soc. 82: 2402 (1960)
- [4] Ponsold, K., Hübner, M., Oettel, M. und Freund, R. -
Arzneimittelforsch., in Vorbereitung
- [5] Ponsold, K., Römer, J. und Wagner, H. - J. Lab. Comp.
10: 533 (1974)
- [6] Römer, J. und Wagner, H. - Radiochem. Radioanal. Letters
25: 255 (1976)
- [7] Bonne, C. und Raynaud, J.-P. - Steroids 26: 227 (1975)
- [8] Zaldivar, A. und Gallegos, A.J. - Contraception 4: 169
(1971)
- [9] Kappus, H. und Bolt, H. M. - Steroids 27: 29 (1976)
- [10] Johnson, W. S. und Johns, W. F. - J. Am. Chem. Soc.
79: 2005 (1957)
- [11] Torgov, J. V. - Pure and appl. Chem. 6: 525 (1963)
- [12] Douglas, G. H., Graves, J. M. H. et al. - J. Chem. Soc.
1963: 5072
- [13] Mozingo, R. - Org. Synthesis 26: 77 (1946)
- [14] Birch, A. J. und Smith, H. - Quart. Rev. 12: 17 (1958)
- [15] Wilds, A. L. und Nelson, N. A. - J. Am. Chem. Soc. 75:
5366 (1953)

- [16] Bowden, K., Heilbron, T. M. und Jones, E. R. H. -
J. Chem. Soc. 1946: 39
- [17] Ueberwasser, H. et al. - Helv. Chim. Acta 46: 344
(1963)
- [18] Römer, J. - ZfK-Report 251: (1973)
- [19] Wagner, H. und Römer, J. - Radiochem. Radioanal. Letters
30: 155 (1977)
- [20] Wagner, H. und Römer, J. - J. Lab. Comp., im Druck