

TRITIUMMARKIERUNG EINES NEUEN STEROIDS MIT FERTILITÄTSHEMMENDEN
EIGENSCHAFTEN : 3-METHOXY-14 β ,15 β -METHYLEN- $[\text{9}\alpha,11\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -
ÖSTRA-1,3,5(10)-TRIEN-17 β -OL

H. WAGNER, J. RÖMER⁺ und H. KASCH

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 synthesis of a $[\text{9}\alpha,11\alpha\text{-}]$ -tritium-labelled new
steroid with interceptive - post-coital antifertility -
activity, 3-methoxy-14 β ,15 β -methylene-estra-1,3,5(10)-
triene-17 β -ol, starting with the catalytic tritiation of
3-methoxy-estra-1,3,5(10),9(11)-tetraene-14 α ,17 β -diol, is
described.

3-Methoxy-14 β ,15 β -methylene- $[\text{9}\alpha,11\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -estra-1,3,5(10)-
triene-17 β -ol was obtained in a four-step synthesis with
high specific activity (3,8 Ci/mmole) and radiochemical
purity better than 99 %. Radiolysis and storage conditions
are examined.

KEYWORDS: 3-Methoxy-14 β ,15 β -methylene- $[\text{9}\alpha,11\alpha\text{-}^3\text{H}]$ -estra-
1,3,5(10)-triene-17 β -ol, Interceptive, Tritium, Synthesis.

EINFÜHRUNG

Im Rahmen unserer Arbeiten über Synthese und biologische Wirkung von Steroiden wurde eine neue Verbindung mit interzeptiver, d. h. postcoital fertilitätshemmender Wirkung, 3-Methoxy-14 β ,15 β -methylene-östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol [1,2], entwickelt. Die pharmakokinetische Untersuchung des Wirkstoffs machte seine Herstellung in spezifisch markierter Form erforderlich.

In Anlehnung an unsere früheren Arbeiten [3,4] wählten wir die Tritiummarkierung in 9,11-Stellung aus.

Als geeignetes Ausgangsmaterial erwies sich das 3-Methoxy-östra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14 α ,17 β -diol (1), das durch elektrochemische Oxidation hergestellt worden war [5].

Dieses Tetraen wurde in einer Vierstufensynthese in die gewünschte [9 α ,11 α -³H]-Verbindung (5) überführt.

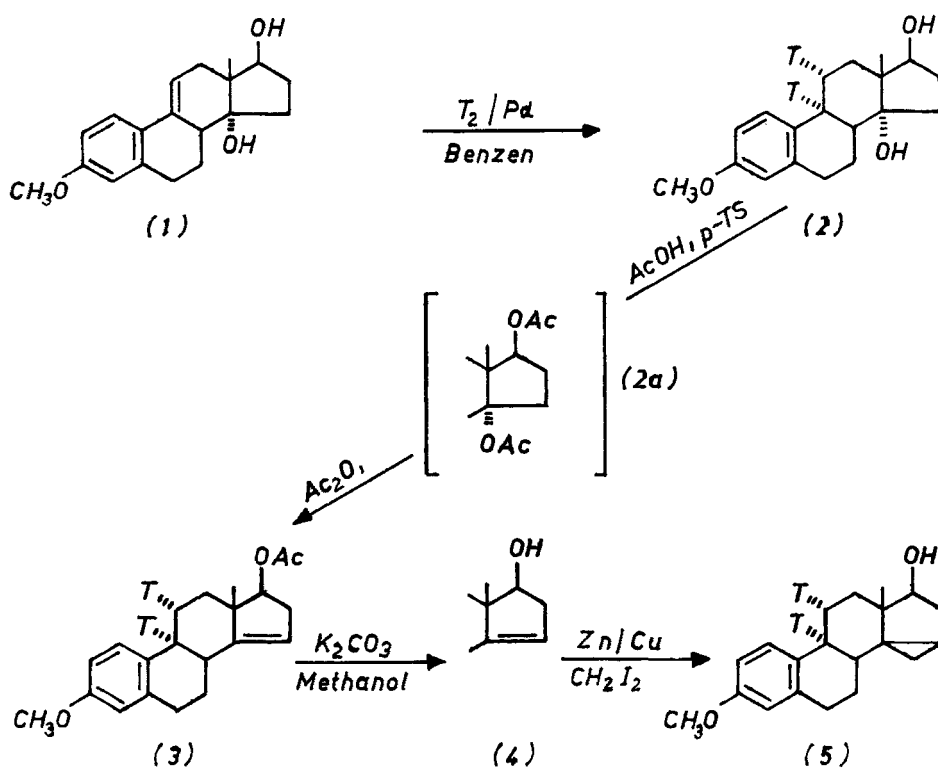
Das 9,11-Dehydroderivat von (5) wurde für die Markierung deshalb nicht benutzt, weil bei der direkten Synthese ein chromatographisch untrennbares Gemisch, bestehend aus der 9,11- und 8(9)-Dehydroverbindung, entstand.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Als Ausgangsprodukt der Synthese diente das bereits erwähnte 3-Methoxy-östra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-14 α ,17 β -diol (1).

Die katalytische Hydrierung mit T₂ an Pd-Mohr [6] in Benzen lieferte hauptsächlich 3-Methoxy-[9 α ,11 α -³H]-östra-1,3,5(10)-trien-14 α ,17 β -diol (2), das durch Behandeln mit Acetanhydrid und p-Toluolsulfonsäure in Eisessig [7] über das intermediäre Diacetat (2a) in 3-Methoxy-[9 α ,11 α -³H]-östra-1,3,5(10),14-tetraen-17 β -ol-acetat (3) überführt wurde.

Mittels Kaliumkarbonat in Methanol wurde (3) zum 3-Methoxy- $[9\alpha, 11\alpha-^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10),14-tetraen-17 β -ol (4) verseift und im Anschluß daran nach Simmons-Smith [8 - 11] an einem Zn-Cu-Katalysator [12] in das gewünschte 3-Methoxy-14 β ,15 β -methylene- $[9\alpha, 11\alpha-^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (5) umgewandelt.



Bei der Ausarbeitung der Synthese mit inaktiven Substanzen hatten wir gefunden, daß die katalytische Hydrierung des 14 α -Hydroxysteroids (1) wesentlich selektiver verläuft, als die der entsprechenden 14 β -Hydroxyverbindung. Während aus (1) das 9 α ,11 α -hydrierte Produkt mit etwa 90%iger Ausbeute zugänglich war, lagen die Ausbeuten bei Verwendung des 14 β -Epimeren von (1) bei nur 60 %.

Wir konnten feststellen, daß die Selektivität der Hydrierung in erheblichem Maße von den Bedingungen, und zwar von der Form des Katalysators (Pd auf Träger oder Pd-Mohr), dem Lösungsmittel (Benzen, Tetrahydrofuran, Essigester) und der Hydriergeschwindigkeit, abhängt. Je schneller die Hydrierung erfolgt, desto höher ist die Ausbeute an (2). Bei relativ langsamer Hydriergeschwindigkeit (Pd auf Träger) besteht die Möglichkeit der Wanderung der 9,11-Doppelbindung nach 8,9 [13]. Bei der katalytischen Hydrierung des 8(9)-Isomeren entstehen aber in der Regel nur die isomeren 8 α ,9 α - bzw. 8 β ,9 β -hydrierten Produkte.

Um die Bildung isomerer Nebenprodukte weitgehend auszuschalten, wäre es am günstigsten, mit Pd-Mohr in Benzen zu arbeiten und den Katalysator vor Zugabe des Steroids mit Wasserstoff zu beladen. Aus apparativen Gründen wurde jedoch so vorgegangen, daß Steroid, Lösungsmittel und Katalysator zusammengegeben wurden und anschließend die Hydrierung in einer Tritiumatmosphäre $p_{T_2} > 600$ Torr stattfand. Bei dieser Verfahrensweise war die Tritiumaufnahme erst nach 90 Minuten beendet, gegenüber 15 Minuten mit vorbeladenem Katalysator und Wasserstoff.

Bei der Tritierung der 14α -Hydroxyverbindung (1) entstanden neben 70 % (2) isomere Nebenprodukte (6 Peaks im Radiogramm), davon eines mit 20 % und die restlichen fünf mit je 1 bis 3 % Aktivitätsanteil. Durch Umkristallisation aus Benzen konnten die Nebenprodukte leicht abgetrennt werden. Danach lag (2) in 94%iger radiochemischer Reinheit und mit einer spezifischen Aktivität von 50 Ci/mmol vor.

Für pharmakokinetische Untersuchungen genügen spezifische Aktivitäten von 2 bis 5 Ci/mmol. Vor der Umsetzung zu (3) verdünnten wir deshalb (2) mit inaktiver Substanz auf das Zehnfache.

Die Abspaltung der 14α -Hydroxygruppe verfolgten wir in üblicher Weise durch analytische Radiodünnschichtchromatographie (Radio-TLC). Nach 6 h war ein Umsatz von 96 % erreicht (1 h 80 %, 3 h 90 %). Bei Untersuchungen mit inaktivem Material hatten wir durch $^1\text{H-NMR}$ -Messungen nachweisen können, daß ausgehend von den isomeren 14α - und 14β -Hydroxyverbindungen nur das Δ^{14} -Produkt (3) und nicht das $\Delta^{8(14)}$ -Isomere entsteht. Nach Aufarbeitung wurde (3) mit einer spezifischen Aktivität von 4,22 Ci/mmol gewonnen.

Die Hydrolyse der 17β -Acetoxyverbindung (3) in einer methanolischen Kaliumcarbonatlösung verlief rasch und quantitativ. Auch sie wurde durch Radio-TLC verfolgt. Nach 0,5 h waren 40% (3) und nach 2 h 97 % umgesetzt. Wir brachen die Reaktion nach 3 h ab und isolierten das 17β -Hydroxy-tetraen (4) mit einer spezifischen Aktivität von 3,8 Ci/mmol.

Die Methylenierung von (4) zum gewünschten Endprodukt (5) verlief schleppend und mußte durch häufige Zugabe von Katalysator und Methylenjodid vorangetrieben werden. Wie die Radio-TLC auswies, waren nach 1 h 30 % (4), nach 4 h 41 %, nach 8 h 64 % und nach 9,5 h 80 % umgesetzt. Nach 10 h wurde aufgearbeitet und das Rohprodukt durch präparative Radio-TLC gereinigt. Wir erhielten (5) in 46%iger Ausbeute, bezogen auf eingesetztes (2). Das Produkt besaß eine radiochemische Reinheit > 99 % und eine spezifische Aktivität von 3,8 Ci/mmol.

Labiles Tritium entstand bei der Hydrierung aufgrund der vorhandenen zwei Hydroxy-Gruppen erwartungsgemäß in großer Menge. In zwei aufeinanderfolgenden Rücktauschreaktionen wurden zuerst 5 Ci, dann 0,26 Ci Tritium im Kondensat gefunden. Auch bei der sauren Abspaltung der 14α -Hydroxy-Gruppe (2) \rightarrow (3) und der alkalischen Hydrolyse der 17β -Acetat-Gruppe (3) \rightarrow (4) fanden wir labiles Tritium in den wäßrigen Filtraten (0,34 bzw. 0,16 Ci). Das stimmte mit der Abnahme der spezifischen Aktivität von 5 Ci/mmol (berechnet für zehnfache Verdünnung) über 4,22 Ci/mmol bei (3) auf 3,8 Ci/mmol bei (4) überein. Ursache dafür kann das 9α - ^3H sein, welches aufgrund seiner Aktivierung durch den aromatischen Ring eine semistabile Bindung besitzt und daher im sauren oder alkalischen Medium einem Austausch durch Protonen unterliegt. Wie die spezifischen Aktivitäten von (4) und (5) zeigen, geht unter neutralen Bedingungen kein Austausch vonstatten.

3-Methoxy- $14\beta, 15\beta$ -methylen- $[9\alpha, 11\alpha$ - $^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10)-trien- 17β -ol lagerten wir als Stammlösung mit 100 mCi/ml in Benzen/Ethanol (1 : 1) bei 5 °C. Es ist bemerkenswert stabil. Nach 12 Wochen betrug die radiochemische Reinheit > 98 %, nach 24 Wochen noch 95 %. Es konnte eine leichte Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden.

EXPERIMENTELLES

Geräte, Chemikalien, Hilfsmittel

Alle aktiven Versuche wurden in Boxen durchgeführt. Die Hydrierung mit T_2 erfolgte in einer Markierungsapparatur [14], die bereits bei früheren Arbeiten [3,4,15-17] benutzt wurde. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde das Flüssigkeitsszintillationsspektrometer LS-23 (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 PF₂₅₄ Merck, BRD) oder Silufolplatten (Kavalier, CSSR) dienten Cyclohexan : Essigester = 1 : 1 (1. - 3. Reaktionsstufe) und Benzol : Aceton = 9 : 1 (4. Stufe). Die analytischen Platten wurden nach der Entwicklung entweder mit Vanillinschwefelsäure besprüht und zur Sichtbarmachung der Flecke auf 180 °C erhitzt oder unter UV-Licht gebracht; die präparativen Platten wurden unter UV-Licht ausgewertet.

3-Methoxy- $[9\alpha, 11\alpha-^3H]$ -östra-1,3,5(10)-trien- $14\alpha, 17\beta$ -diol (2)

63 mg (0,21 mmol) (1) wurden in einem 25 ml-Kölbchen mit 10 ml wasserfreiem Benzol und 31 mg Palladiummohr versetzt und unter Rühren bei Zimmertemperatur mit T_2 von p >600 Torr hydriert. Die Tritiumaufnahme war nach etwa 90 Minuten zum Stillstand gekommen. Die benzolische Lösung wurde leicht erwärmt - (2) fällt bei Zimmertemperatur bereits aus - und vom Katalysator abfiltriert. Der verbleibende Rückstand wurde zweimal mit je 5 ml Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate zum Rücktausch labilen Tritiums 30

Minuten auf 70 °C erwärmt. Nach Gefriertrocknung wurden 62,2 mg (2) als Rohprodukt erhalten, die einem zweiten Abtausch innerhalb von 30 Minuten in 5 ml Methanol bei 70 °C unterzogen wurden. Nach erneuter Gefriertrocknung wurde das Rohprodukt (Radiogramm zeigte 7 Peaks) aus 3,5 ml Benzol umkristallisiert. Im Endergebnis wurden 43,2 mg (2) (Ausbeute 68 %) in Form weißer Kristalle mit einer radiochemischen Reinheit von 94 % und einer spezifischen Aktivität von 50 Ci/mmol gewonnen.

Das erste Kondensat enthielt 5 Ci, das zweite 0,26 Ci labiles Tritium.

3-Methoxy- $[9\alpha, 11\alpha-^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10),14-tetraen-17 β -acetat (3)

Die erhaltenen 43,2 mg (2) wurden mit 389 mg inaktivem (2) versetzt und mit 6 ml Essigsäure, 3 ml Essigsäureanhydrid und einer Spatelspitze p-Toluolsulfonsäure zur Reaktion gebracht. Nach 6 Stunden wurde bei einer Umsetzungsrate von 96 % durch Eingießen in Eiswasser abgebrochen. Nach einigem Stehen im Kühlschrank wurde der gebildete Niederschlag von (3) abgesaugt und getrocknet. Es wurden 430 mg (Ausbeute 92 %) mit einer spezifischen Aktivität von 4,22 Ci/mmol erhalten. Im Waschwasser fand sich eine Aktivität von 340 mCi.

3-Methoxy- $[9\alpha, 11\alpha-^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10),14-tetraen-17 β -ol (4)

430 mg (3) wurden in 15 ml Methanol gelöst und nach Zusatz von 100 mg Kaliumkarbonat auf 70 °C erwärmt. Die Hydrolyse

der 17 β -Acetatgruppe war nach 3 Stunden beendet. Es wurde in Eiswasser eingerührt und der entstandene Niederschlag nach einigem Stehen im Kühlschrank abgesaugt. Auflösung des gallertartigen Produkts in einem Benzol-Methanol-Gemisch und anschließende Gefrierdrying ergab 368 mg (4) (Ausbeute 98 %) mit einer spezifischen Aktivität von 3,8 Ci/mmol. Im Waschwasser fand sich eine Aktivität von 165 mCi.

3-Methoxy-15 β ,16 β -methylene- $[9\alpha,11\alpha-^3\text{H}]$ -östra-1,3,5(10)-trien-17 β -ol (5)

15 ml Methylenchlorid, 1 ml Methylenjodid und 1 g Zn-Cu-Katalysator [12] wurden 15 Minuten bei 50 °C gerührt. Dazu wurden 365 mg (4), gelöst in 10 ml Methylenchlorid, und 0,3 ml Methylenjodid gegeben und weiter bei 50 °C gerührt. Durch häufiges Hinzugeben kleiner Mengen an Katalysator und Methylenjodid wurde nach 10 Stunden eine Umsetzungsrate von 80 % erreicht. Der Katalysator wurde abfiltriert und das rötliche Filtrat dreimal mit gesättigter Ammoniumchloridlösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die nun hellgelbe Lösung wurde gefriergetrocknet und das erhaltene Rohprodukt der chromatographischen Trennung auf präparativen Kieselgelplatten (20 x 20 cm; 1 mm Schichtdicke) unterzogen. Dreimalige Entwicklung mit Benzol : Aceton = 9 : 1 ergab eine gute Trennung zwischen dem Reaktionsprodukt (5) (80 %) und nicht umgesetztem (4) (20 %). Die mit (5) angereicherten Kieselgelzonen wurden abgetrennt und mit Benzol : Methanol = 1 : 1 eluiert. Gefrierdrying ergab 191 mg (5) (Ausbeute 62 %; bezogen auf (2) 46 %) mit einer radiochemischen Reinheit >99 % und einer spezifischen Aktivität von 3,8 Ci/mmol.

LITERATUR

- [1] Prousa, R. - WP C 07 J/206 323
- [2] Strecke, J., Oettel, M. und Koch, M. - Pharmazie: 34:
325 (1979)
- [3] Ponsold, K., Römer, J. und Wagner, H. - J. Lab. Comp.
10: 533 (1974)
- [4] Römer, J. und Wagner, H. - Radiochem. Radioanal. Letters
25: 255 (1976)
- [5] Kasch, H. - unveröffentlicht
- [6] Wieland, H. - Ber. dtsh. chem. Ges. 45: 489 (1912)
- [7] Kamano, Y. - Chem. Pharm. Bull. 17: 1711 (1969)
- [8] Simmons, H. E. und Smith, R. D. - J. Am. Chem. Soc. 80:
5323 (1958)
- [9] Simmons, H. E. und Smith, R. D. - J. Am. Chem. Soc. 81:
4256 (1959)
- [10] Winstein, S. und Sonnenberg, J. - J. Am. Chem. Soc. 83:
3235 (1961)
- [11] Dauben, W. G. und Berezin, G. H. - J. Am. Chem. Soc. 85:
468 (1963)
- [12] Le Goff, E. - J. Org. Chem. 29: 2049 (1964)
- [13] Lajliev, A. O., Kosoev, K. K., Ananchenko, S. N. und
Torgov, I. V. - Isv. Akad.Nauk SSSR. Ser. chim.: 1976:
948
- [14] Römer, J. - ZfK-Report 251: 1973
- [15] Wagner, H. und Römer, J. - Radiochem. Radioanal. Letters
30: 155 (1977)
- [16] Wagner, H. und Römer, J. - J. Lab. Comp. Radiopharm. 14:
873 (1978)
- [17] Wagner, H., Römer, J., Hübner, M. und Ponsold, K. -
J. Lab. Comp. Radiopharm. 17: 317 (1980)