

Herstellung und biologische Wirkung des 16 α -Methyl-desoxycorticosteron-acetats *

Über die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischen Wirkungen einiger Sterole wurde vor einiger Zeit referiert^{1,2}. Insbesondere wurden damals von uns die biologischen Folgen der 1,2-Dehydrierung und der 14 α -Hydroxylierung bei einigen, schwach glucocorticoid wirksamen Verbindungen untersucht, zur Kenntnis der für die corticoide Aktivität verantwortlichen Strukturen.

In letzter Zeit weckten die 16 α -methylierten Corticosteroide und besonders das 16 α -Methyl- $\Delta^{1,4}$ -pregnadien-11 β , 17, 21-triol-9 α -fluor-3,20-dion (Dexamethason) ein grosses Interesse. Wir verdanken OLIVETO einen wertvollen und relativ vollständigen Überblick über die Chemie dieser neuen Verbindungen³. Bekanntlich besitzt Dexamethason, im Gegensatz zum entsprechenden, den 16 α -Methylrest nicht enthaltenden Sterol, eine viel niedrigere mineralcorticoide Aktivität, wobei die bei den natürlichen und manchen 9-fluorierten Corticosteroiden vorkommende ungünstige Natriumretention zum grössten Teil aufgehoben wird^{4,5}. Somit spielt Dexamethason heute praktisch eine wichtige therapeutische Rolle bei rheumatischen Erkrankungen.

Die durch die 16 α -Methylierung verursachte Hemmung des Natriumchlorid-retentions haben wir jetzt bei Verwendung eines typischen mineralcorticoid wirkenden Stoffes, des Desoxycorticosteron-acetats (DCA) untersucht. Die biologische Aktivität des 16 α -Methyl- Δ^4 -pregnen-21-ol-3,20-dion 21-acetats (16 α -Methyl-DCA) wurde mit jenem des Desoxycorticosteronacetats durch die Bestimmung der Leberglykogenablage und der Elektrolytenausscheidung bei adrenaletomisierten Ratten verglichen. 16 α -Methyl-DCA wurde nach der Methode von RINGOLD und STORK⁶ aus 16 α -Methylprogesteron (16 α -Methyl- Δ^4 -pregnen-3,20-dion) hergestellt. Letzteres wurde nach MARKER und CROOKS⁷ aus Δ^{16} -Pregnadien-3 β -ol-20-on durch Einwirkung des Grignardreagenzes und anschliessende Oppenauer-Oxydation des erhaltenen 16 α -Methyl- Δ^5 -pregnen-3 β -ol-20-ons dargestellt. Die α -Stellung des Methylrestes am C-16 dieser Verbindungen haben ARTH *et al.*⁸ und GALLAGHER *et al.*⁹ bewiesen. 16 α -Methylprogesteron wird bei starker Belichtung, unter heftigem Rühren und bei Zimmertemperatur in Methanol-tetrahydrofuran-Lösung 6 h lang mit Jod und fein pulverisiertem Calciumoxyd behandelt. Die entfärbte Lösung wird in Eiswasser gegossen, mit Essigsäure angesäuert und das gebildete 21-Jodderivat mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die eingeeengten organischen Auszüge werden ohne jede weitere Reinigung mit geschmolzenem essigsaurem Kalium in Aceton 16 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Einengen wird das 21-Methyl-DCA mit CH_2Cl_2 extrahiert und dreimal aus Essigester umkristallisiert. Smp. 139 bis 142°C; $[\alpha]_{20}^D = +136,5$ ($c = 1,029$ Dioxan). Analyse für $\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_4$ (Mol.-Gew. 386,512). Gef. C% 74,5; H% 9,0. Ber. C% 74,58; H% 8,81. Das IR-Spektrum ist unten angegeben.

Für die biologischen Versuche wurden männliche Ratten, 5 Tage nach Adrenaletomie, mit mittlerem Körpergewicht von 140 g verwendet. Nach 15 h Hungern wurden die Tiere einzeln in Urin-Sammelkäfige gestellt und subkutan mit 0,2 cm³ einer Sesamöl-Lösung des Sterols und gleich nachher intraperitoneal mit 5 cm³ einer bei 37°C erwärmten physiologischen Lösung behandelt. Der Elektrolytengehalt (Na und K) des Urins wurde spektrophotometrisch (Bayrd-Flammenspektrophotometer) und das Leberglykogen bei mit Phenobarbital (Na-Salz) getöteten Tieren 8 h nach Verabreichung des Produktes

Tab. I. Wirkung des DCA und des 16 α -Methyl-DCA auf Urinausscheidung und auf Natrium- und Kaliumgehalt im Urin von adrenaletomisierten Ratten.

	Behandlung $\mu\text{g/Ratte}$	Nr. der Tiere	Urin ^a	Na ^b	K ^b	Na/ K	\pm Standard Fehler
DCA	100	10	0,21	0,39	0,75	0,52	$\pm 0,09$
DCA	250	10	0,19	0,20	0,69	0,34	$\pm 0,04$
16 α -Methyl DCA	100	10	0,24	0,71	0,61	1,16	$\pm 0,19$
16 α -Methyl DCA	250	10	0,18	0,44	0,47	0,94	$\pm 0,10$
Kontrolle		10	0,30	0,81	0,59	1,37	$\pm 0,16$
^a cm ³ /h/100 g Tiergewicht ^b mg/h/100 g Tiergewicht							

Tab. II. Glykogenablage in der Leber adrenaletomierter Ratten.

	Behandlung $\mu\text{g/Ratte}$	Leberglykogen (mg/100 g Rattengewicht)	\pm Standard- Fehler
DCA	100	1,12	$\pm 0,17$
DCA	250	1,32	$\pm 0,04$
16 α -Methyl-DCA	100	1,10	$\pm 0,11$
16 α -Methyl-DCA	250	1,27	$\pm 0,12$
Kontrolle		1,00	$\pm 0,10$

nach OLSON *et al.*¹⁰ bestimmt. Die Verabreichung der Sterole erfolgte in Mengen von 100 γ und 250 γ , und mit jeder Dosierung wurden 10 Tiere behandelt, während die Kontrolltiere nur das Öl und die physiologische Lösung erhielten. Die Ergebnisse der Versuche sind in den Tabellen I und II zusammengestellt.

Aus den angegebenen Werten ist leicht zu erkennen, dass das 16 α -Methyl-desoxycorticosteronacetat auf die Elektrolytenausscheidung im Urin nur einen sehr geringen Einfluss hat, der auch nur mit den höheren Mengen (250 γ) signifikant wird. Im Glykogenablage-Test erweist sich das 16 α -Methyl-DCA, genau wie das DCA selbst, als praktisch inaktiv.

Man sieht daraus, dass die Natriumretentionshemmung, die bei Einführung eines α -Methylrestes am Kohlenstoff 16 des DCA eintritt, in auffallender Weise derjenigen ähnlich ist, welche die gleiche Strukturänderung des 9 α -Fluorprednisolons hervorruft: man kann deshalb wahrscheinlich von einer spezifischen Eigenschaft der α -Methylierung am C-16 sprechen. In der Tat ist im Falle des 16 α -Methyl-DCA jede gegenseitige Wirkung der glycocorticoiden Aktivität ausgeschaltet: andererseits fehlt im

* Britische Patentanmeldung Nr. 39037/58 vom 3. 12. 1958.

¹ G. MAFFII, E. SONCIN und R. VIRGA, *Lo Sperimentale* 107, 12 (1957).

² G. MAFFII und R. VIRGA, *Lo Sperimentale* 107, 24 (1957).

³ E. P. OLIVETO, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 82, 809 (1959).

⁴ R. H. SILBER, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 82, 821 (1959).

⁵ S. TOLKSDORF, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 82, 829 (1959).

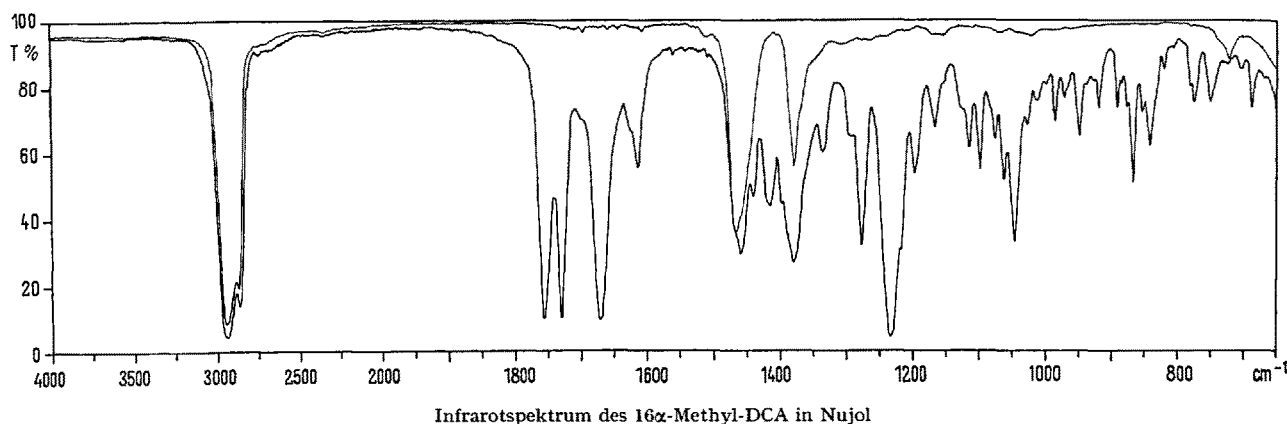
⁶ H. J. RINGOLD und G. STORK, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 250 (1958).

⁷ R. E. MARKER und H. M. CROOKS JR., *J. Amer. chem. Soc.* 64, 1280 (1942).

⁸ S. A. ARTH, D. B. R. JOHNSTON, J. FRIED, W. W. SPOONER, D. R. HOFF und L. H. LERRET, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 3160 (1958).

⁹ T. F. GALLAGHER und T. H. KRITCHEVSKY, *J. Amer. chem. Soc.* 72, 882 (1950).

¹⁰ R. E. OLSON, F. A. JACOBS, D. RICHERT, S. A. THAYER, L. J. KOPP und N. J. WADE, *Endocrinology* 35, 430 (1944).



Vergleichsprodukt (DCA) ein 9α-Fluorrest, der die mineralcorticoide Aktivität anregen könnte, und gegen welche der 16α-Methylrest eine intramolekulare gegenseitige Wirkung ausüben könnte.

Da nun das 16α-Methyl-DCA keine nennenswerte glyco-corticoide Wirkung auf die Leberglykogenablage bei der Ratte zeigt, glauben wir bewiesen zu haben, dass der 16α-Methylrest als solcher kein «Träger» der glycocorticoiden Aktivität beim Dexamethason, 16α-Methylprednisolon und weiteren 16α-Methyl-Sterolen sein kann.

Nachschrift: Nachdem die Arbeit zum Druck geschickt worden war, haben auch V. PETROW und D. M. WILLIAMSON, J. Chem. Soc. 1959, 3595, über die Herstellung durch andere Verfahren des 16α-Methyl-desoxycorticosteron-acetats referiert.

G. MAFFII, L. FONTANELLA,
P. SCHIATTI und E. TESTA

*Forschungslaboratorien der Lepetit S. p. A. Milano
(Italien), 4. Dezember 1959.*

Summary

The introduction of a 16α-methyl group in desoxycorticosterone acetate, a typical mineral-corticoid hormone, abolishes the sodium retention activity of desoxycorticosterone acetate. Since the same effect of 16α-methylation had been previously noted by other authors in 9α-fluoroprednisolone, our results further support the hypothesis that the 16α-methyl group is responsible for this specific change of metabolic activity in steroids.

Studies on Wound Healing:

1. Metabolism of ³⁵S in 'Repair Tissue' of Skin Wounds during the various Phases of Healing¹

It is well known that 95% of ³⁵S parenterally injected in the form of Na₂S³⁵O₄ is rapidly eliminated through feces and urines (DZIEWIATKOWSKI²); the remaining 5% is distributed in the various organs according to a tropism which differs greatly from tissue to tissue (DZIEWIATKOWSKI³, CAMPBELL *et al.*⁴, BOSTRÖM⁵, JORPES *et al.*⁶, ASBOE-HANSEN⁷, BOSTRÖM *et al.*⁸).

The maximal amount of ³⁵S stored by the organism is taken up by the bone tissue, bone marrow, and cartilage, chiefly in the form of chondroitinsulphuric acid (DZIEWIATKOWSKI *et al.*^{9,10}).

BOSTRÖM¹¹ demonstrated that the dermis is also capable of taking up ³⁵S, though in much smaller quantity than the above-mentioned tissues, incorporating it almost

entirely into the chondroitinsulfuric acid of the ground substance.

It was observed by LAYTON¹² that embryonic tissues, especially granulation tissues, have a property of taking up much larger amounts of ³⁵S than the corresponding normal adult tissues.

He observed also that the uptake of ³⁵S is influenced by some hormones: thus cortisone, for instance, reduces considerably such ability.

The present investigations aim at studying the metabolism of ³⁵S in 'repair tissue' of skin wounds experimentally produced in laboratory animals.

Materials and Methods. 7 guinea pigs of both sexes weighing from 220 to 295 g were used in these experiments. Throughout the investigation, the animals were fed on a diet containing sufficient amounts of proteins and vitamins to cover the organism requirements.

After back-shaving and skin-disinfection, each guinea pig was inflicted a quadrangular wound of 2 cm side in the intrascapular region. The wounds, involving both skin and underlying subcutaneous tissue, were inflicted so that at a given moment the animals presented at the same time differently dated wounds, therefore different stages of repair tissue.

Two days before the animals were sacrificed, each guinea pig was intravenously injected with 5.678 μc of ³⁵S (in the form of Na₂S³⁵O₄ in aqueous solution)/1 g body weight. The wound-covering tissue, as well as a sheet of normal skin and subcutaneous tissue (taken as control), were excised, carefully weighed, then mineralized for 18 h with H₂SO₄ at 95–96% in 50 ml Kieldahl flasks. Each solution was then vaporized until a dry residue was obtained, which was diluted into 10 ml distilled boiling water and, after cooling, was put into a Geyger-Müller

¹ For 'repair tissue' we mean that tissue (first granulation, then scar tissue) which fills up and repairs any loss of substance in the soft tissues of the animal organism.

² D. D. DZIEWIATKOWSKI, J. biol. Chem. 178, 197 (1949).

³ D. D. DZIEWIATKOWSKI, J. exp. Med. 93, 451 (1951).

⁴ D. CAMPBELL and H. PERSSON, Exper. 7, 304 (1951).

⁵ H. BOSTRÖM, *On the Sulphate Exchange of Sulpho-mucopolysaccharides*, in *Connective Tissue in Health and Disease* (Munksgaard ed., Copenhagen 1954), p. 97.

⁶ E. JORPES, E. ODEBLAD, and H. BOSTRÖM, Acta haemat. 9, 273 (1953).

⁷ G. ASBOE-HANSEN, Cancer Res. 13, 587 (1953).

⁸ H. BOSTRÖM and S. AGVIST, Acta chem. scand. 6, 1551 (1953).

⁹ D. D. DZIEWIATKOWSKI, J. biol. Chem. 189, 187 (1951).

¹⁰ D. D. DZIEWIATKOWSKI, R. E. BENESCH, and R. BENESCH, J. biol. Chem. 178, 931 (1949).

¹¹ H. BOSTRÖM, Arch. Kemi 6, 43 (1954).

¹² L. L. LAYTON, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 73, 718 (1950).