

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 J 1/00
C 12 P 33/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

624 415

⑳① Gesuchsnummer: 9656/76

⑳② Anmeldungsdatum: 28.07.1976

⑳③ Priorität(en): 01.08.1975 DE 2534911

⑳④ Patent erteilt: 31.07.1981

⑳⑤ Patentschrift veröffentlicht: 31.07.1981

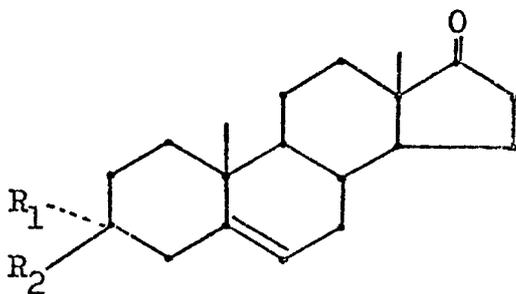
⑳⑦ Inhaber:
Schering Aktiengesellschaft, Berlin & Bergkamen,
Berlin 65 (West)

⑳⑧ Erfinder:
Dr. Ulrich Eder, Berlin (West)
Dr. Gregor Haffer, Berlin (West)
Dr. Gerhard Sauer, Berlin (West)
Dr. Günter Neef, Berlin (West)
Prof. Rudolf Wiechert, Berlin (West)
Dr. Alfred Weber, Berlin (West)
Dr. Mario Kennecke, Berlin (West)
Dr. Alfred Popper, Berlin (West)
Dr. Rudolf Müller, Berlin (West)

⑳⑨ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von 5-Androsten-17-on-Derivaten.**

⑤⑦ 5-Androsten-17-on-Derivate der allgemeinen Formel I



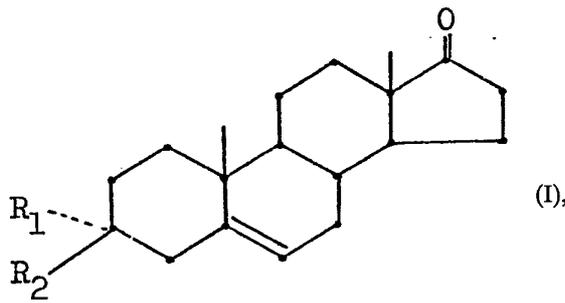
worin

R₁ ein Wasserstoffatom und R₂ eine niedere Alkoxygruppe oder

R₁ und R₂ gemeinsam eine niedere Alkylendioxygruppe bedeuten, werden erhalten, indem man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert.

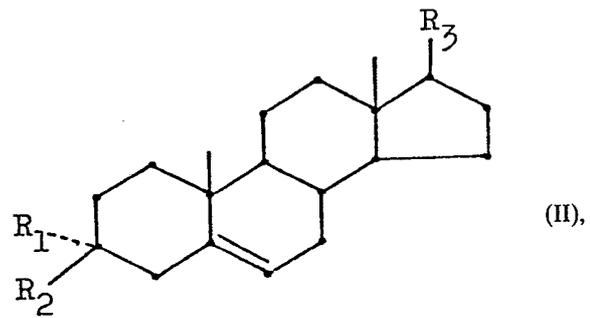
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 5-Androsten-17-on-Derivaten der allgemeinen Formel I



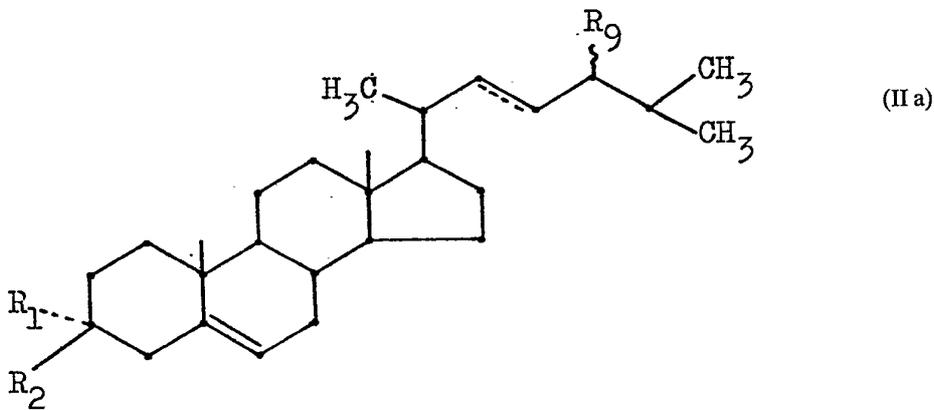
worin

R_1 ein Wasserstoffatom und R_2 eine niedere Alkoxygruppe oder R_1 und R_2 gemeinsam eine niedere Alkylendioxygruppe bedeuten, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II



worin R_1 und R_2 die obengenannte Bedeutung besitzen und R_3 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert.

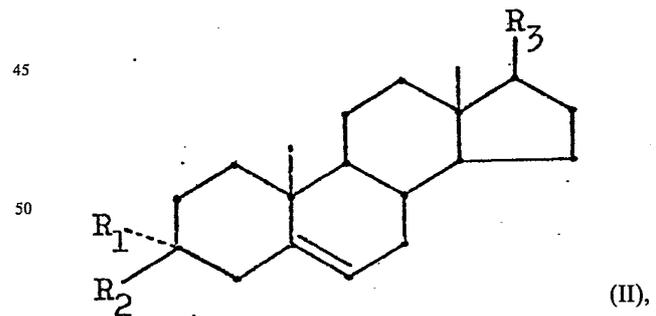
2. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II a



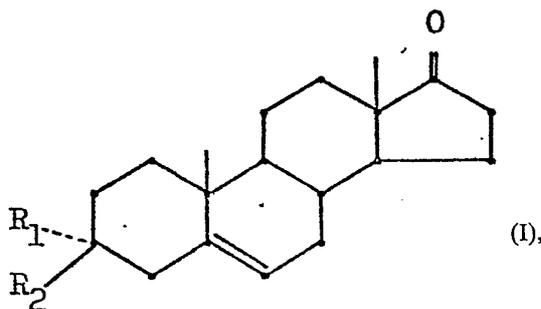
worin R_1 ein Wasserstoffatom und R_2 eine niedere Alkoxygruppe oder R_1 und R_2 gemeinsam eine niedere Alkylendioxygruppe, die Bindung eine Einfachbindung oder eine Doppelbindung und R_9 ein Wasserstoffatom, eine Methylgruppe oder eine Äthylgruppe bedeutet, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert.

R_1 ein Wasserstoffatom und R_2 eine niedere Alkoxygruppe oder R_1 und R_2 gemeinsam eine niedere Alkylendioxygruppe bedeuten, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II

3. Verfahren gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Fermentation eine zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigte Mikroorganismenkultur der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus Norcardia*, *Streptomyces* oder insbesondere der Gattung *Mycobacterium* verwendet.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 5-Androsten-17-on-Derivaten der allgemeinen Formel I



worin

worin R_1 und R_2 die obengenannte Bedeutung besitzen und R_3 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert.

Unter einem niederen Alkoxyrest R_2 soll vorzugsweise ein 1 bis 4 Kohlenstoffatome enthaltender Alkoxyrest verstanden werden. Geeignete Alkoxyreste sind beispielsweise der Propyloxyrest und der Butyloxyrest oder insbesondere der Methoxyrest und der Äthoxyrest.

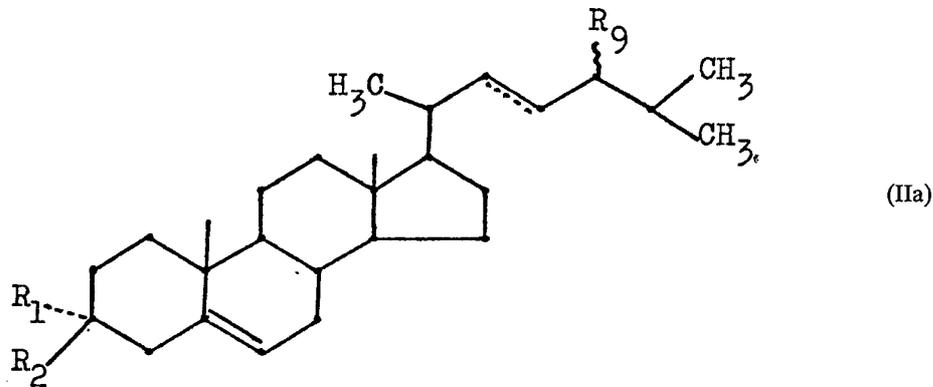
Unter einem Alkylendioxyrest R_1 und R_2 soll vorzugsweise ein 2 bis 6 Kohlenstoffatome enthaltender Alkylendioxyrest verstanden werden. Geeignete Alkylendioxyreste sind beispiels-

weise der 1,2-Äthylendioxyrest, der 1,3-Propylendioxyrest, der 2-Methyl-1,3-propylendioxyrest, der 2,2-Dimethyl+1,3-propylendioxyrest der 2,3-Butylendioxyrest oder der 1,4-Butylendioxyrest.

Unter einem 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest R_3 soll ein Rest verstanden werden, wie er beispielsweise in den Seitenketten von natürlich vorkommenden

Zoo- oder Phytosterinen, wie zum Beispiel Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin, Brassicasterin oder den Sitosterinen vorliegt.

Geeignete Sterin-Derivate der allgemeinen Formel II sind beispielsweise solche Verbindungen, die durch die allgemeine Formel II a



worin R_1 und R_2 die obengenannte Bedeutung besitzen, die Bindung eine Einfachbindung oder eine Doppelbindung darstellt und R_9 ein Wasserstoffatom, eine Methylgruppe oder eine Äthylgruppe bedeutet charakterisiert werden können.

Es ist bekannt, dass zahlreiche Mikroorganismen (so zum Beispiel solche der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* und insbesondere sonders *Mycobacterium*) die natürliche Fähigkeit besitzen, Zoo- und Phytosterine zu Kohlendioxyd und Wasser abzubauen und dass bei diesem Abbau intermediär 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion gebildet werden.

Da zahlreiche Zoo- und Phytosterine (wie zum Beispiel das Cholesterin, das Stigmasterin, das Campesterin, das Brassicasterin oder die Sitosterine) in der Natur weit verbreitet und somit leicht zugängliche Rohstoffe für die Synthese pharmakologisch wirksamer Steroide sind, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, den Abbau der Sterine so zu lenken, dass bei der Fermentation ein weiterer Abbau des gebildeten 4-Androsten-3,17-dions und des 1,4-Androstadien-3,17-dions verhindert wird.

So war es beispielsweise möglich, den weiteren Abbau von 1,4-Androstadien-3,17-dion und 4-Androsten-3,17-dion dadurch zu verhindern, dass man den Fermentationsansätzen Inhibitoren zusetzt. (Siehe deutsche Offenlegungsschriften 1 543 269 und 1 593 327, sowie die US-Patentschrift 1 208 078). Durch die Verwendung von Inhibitoren wird aber eine technische Durchführung dieser Umsetzungen sehr aufwendig; dies nicht zuletzt deshalb, weil die verwendeten Inhibitoren nach erfolgter Umsetzung aus den Fermentationskulturen entfernt werden müssen um zu vermeiden, dass diese Stoffe in die Abwässer gelangen. Darüberhinaus haben diese bekannten Umsetzungen den Nachteil, dass bei ihnen stets 1,4-Androstadien-3,17-dion oder Gemische von 1,4-Androstadien-3,17-dion und 4-Androsten-3,17-dion gebildet werden. Das gebildete 1,4-Androstadien-3,17-dion ist aber als Ausgangssubstanz für die Synthese zahlreicher pharmakologisch wirksamer Steroide wenig geeignet.

Andererseits konnte der weitere Abbau von 1,4-Androstadien-3,17-dion und von 4-Androsten-3,17-dion auch dadurch verhindert werden, dass man zur fermentativen Umwandlung der Sterine mutierte Mikroorganismen der Gattung *Mycobacterium* verwendete. (Siehe US-Patentschrift 3 684 657). Die bisher gezüchteten Mutanten haben aber den Nachteil, dass sie nur

25 eine sehr begrenzte Fähigkeit besitzen, aus Sterinen 1,4-Androstadien-3,17-dion oder 4-Androsten-3,17-dion zu bilden.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zum Seitenkettenabbau Sterinen zu erstellen, dem die Nachteile der bekannten Verfahren nicht anhaftet.

30 Diese Aufgabe wurde durch die Bereitstellung eines Verfahrens gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert.

35 Für den Fachmann ist es gewöhnlich sehr überraschend, dass bei dieser fermentativen Umwandlung in hohen Ausbeuten die 5-Androsten-17-on-Derivate der allgemeinen Formel I gebildet werden. Dies deshalb, weil beispielsweise bekannt ist, dass der Seitenkettenabbau von Sterinen durch ein sehr komplexes Fermentsystem bewirkt wird und man nicht erwarten konnte, dass alle am Seitenkettenabbau natürlicher Steroide mitwirkenden Enzyme die Fähigkeit besitzen, auch den Seitenkettenabbau der in der Natur nicht vorkommenden Sterin-Derivate der allgemeinen Formel II zu bewirken. Darüberhinaus 45 konnte man beispielsweise nicht vorhersehen, dass die den Abbau des 1,4-Androstadien-3,17-dions und des 4-Androsten-3,17-dions bewirkenden Enzymsysteme nicht befähigt sind, die 5-Androsten-17-on-Derivate der allgemeinen Formel I abzubauen.

50 Abgesehen von der Verwendung anderer Ausgangsverbindungen und von der Tatsache, dass die Umsetzung in Abwesenheit von Inhibitoren durchgeführt werden kann, wird das erfindungsgemäße Verfahren vorzugsweise unter den gleichen Fermentationsbedingungen durchgeführt, welche man auch bei den 55 bekannten mikrobiologischen Seitenkettenabbau-Reaktionen von Sterinen anwendet.

Erfindungsgemäss wird die fermentation unter Verwendung der Mikroorganismenkulturen durchgeführt, welche man üblicherweise zum Seitenkettenabbau von Sterinen verwendet.

60 Geeignete Kulturen sind beispielsweise zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigte Bakterienkulturen der Gattungen *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* oder insbesondere der Gattung *Mycobacterium*. Als geeignete Mikroorganismen seien beispielsweise genannt:

65 *Microbacterium lactum* IAM-1640, *Protaminobacter alboblavus* IAM-1040, *Bacillus roseus* IAM-1257, *Bacillus sphäricus* ATTC-7055, *Nocardia gardneri* IAM-105, *Nocardia minima* IAM-374, *Nocardia corallina* IFO-3338, *Streptomyces rubescens*

cens IAM-74 oder insbesondere die Mikroorganismen *Mycobacterium avium* IFO-3082, *Mycobacterium phlei* IFO-3158, *Mycobacterium phlei* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr. 29), *Mycobacterium phlei* ATCC-354, *Mycobacterium smegmatis* IFO-3084, *Mycobacterium smegmatis* ATCC-20, *Mycobacterium smegmatis* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr. 27), *Mycobacterium smegmatis* ATCC-19979, *Mycobacterium fortuitum* CBS-49566, *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 und *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3683.

Unter den für diese Mikroorganismen üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen werden in einem geeigneten Nährmedium unter Belüften, Submerskulturen angezüchtet. Dann setzt man in der Regel den Kulturen das Substrat (in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst oder vorzugsweise in emulgierter Form) zu und fermentiert, bis eine maximale Substratumwandlung erreicht ist.

Geeignete Substratlösungsmittel sind beispielsweise Methanol, Äthanol, Glykolmonomethyläther, Dimethylfomamid oder Dimethylsulfoxyd). Die Emulgierung des Substrats kann beispielsweise bewirkt werden, indem man dieses in mikronisierter Form oder in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel (wie Methanol, Äthanol, Aceton, Glykolmonomethyläther, Dimethylfomamid oder Dimethylsulfoxyd) gelöst unter starker Turbulenz in (vorzugsweise entkalktem) Wasser, welches die üblichen Emulgationshilfen enthält, eindüst. Geeignete Emulgationshilfen sind nichtionogene Emulgatoren, wie zum Beispiel Äthylendioxydaddukte oder Fettsäureester von Polyglykolen. Als geeignete Emulgatoren seien die handelsüblichen Netzmittel Tegin^(R), Tagat^(R), Tween^(R) und Span^(R) Beispielsmässig genannt.

Insbesondere bei der Fermentation der 3-Alkoxyverbindungen der allgemeinen Formel II ermöglicht die Emulgierung der Substrate normalerweise einen erhöhten Substratumsatz und somit eine Steigerung der Substratkonzentration. Es ist aber selbstverständlich beispielsweise auch möglich, bei dem erfindungsgemässen Verfahren andere Methoden zur Steigerung des Substratumsatzes, wie sie dem Fermentationsfachmann wohl bekannt sind, anzuwenden.

Die optimale Substratkonzentration, Substratzugabezeit und Fermentationsdauer ist im allgemeinen von der Struktur des verwendeten Substrates und der Art des verwendeten Mikroorganismus abhängig. Diese Grössen müssen, wie dies bei mikrobiologischen Steroidumwandlungen allgemein erforderlich ist, im Einzelfall normalerweise Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, ermittelt werden.

Die weitere Umsetzung von 5-Androsten-17-on-Derivaten der allgemeinen Formel I mit R₁ und R₂ in der Bedeutung einer niederen Alkylendioxygruppe zu beispielsweise pharmakologisch wirksamen Steroiden bereitet gewöhnlich keine Schwierigkeiten. So kann man die Ketalgruppe dieser Verbindungen beispielsweise, gegebenenfalls nach Reduktion der Ketogruppe mit Natriumborhydrid, mittels Säuren hydrolytisch abspalten und erhält so die bekannten Steroide 4-Androsten-3,17-dion und Testosteron.

Demgegenüber enthalten die 5-Androsten-17-on-Derivate der allgemeinen Formel I mit R₁ in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms und R₂ in der Bedeutung einer niederen Alkoxygruppe normalerweise eine relativ schwer spaltbare Äthergruppe. Es sind zwar zahlreiche Methoden zur Spaltung von Ätherbindungen bekannt, die meisten bekannten Methoden zur Ätherspaltung eignen sich aber in der Regel nicht zur Spaltung dieser Verbindungen.

Die Reaktion der 17-Ketogruppe der 5-Androsten-17-on-Derivate der allgemeinen Formel I kann üblicherweise mittels der dem Fachmann wohlbekannten Arbeitsmethoden erfolgen. (Siehe zum Beispiel John Fried: Organic Reactions in Steroid Chemistry-van Nostrand Reinhold Comp. New York etc. 1972, Volume 1, Seite 61 ff). So kann man diese Verbindungen bei-

spielsweise mit Natriumborhydrid oder Lithiumaluminiumhydrid umsetzen und erhält die entsprechenden 17 β -Hydroxy-5-androsten-Derivate.

Ebenso bekannt sind die Methoden: die 17-Ketogruppe zu 5 alkylieren (siehe zum Beispiel John Fried: Organic Reactions in Steroid Chemistry - van Nostrand Reinhold Comp., New York etc. 1972, Volume 2, Seite 53 ff).

Die als Ausgangsverbindungen im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten 3-Alkoxyverbindungen der allgemeinen Formel II können aus den entsprechenden 3-Hydroxyverbindungen hergestellt werden, indem man diese beispielsweise nach der Methode J.P. Duszo et al. (Steroids 1966, 495-509) mit Trialkylorthoameisensäureestern in Gegenwart von Perchlorsäure umsetzt.

Die als Ausgangsverbindungen im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten 3-Ketale der allgemeinen Formel II lassen sich beispielsweise aus den 3-Hydroxyverbindungen herstellen, indem man diese beispielsweise nach der Methode von Oppenauer oxydiert und die gebildeten 3-Keto- Δ^4 -steroide mit den Alkandiolen in Gegenwart von p-Toluolsulfonsäure ketalisiert (C. Djerassi: Steroid Reactions Holden Day Inc., San Francisco 1963, Seite 3 bis 8 und 92 bis 101).

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1

a) Ein 2 l Erlenmeyerkolben wird mit 500 ml einer sterilen Nährlösung enthaltend 1% Hefeextrakt, 0,45% Dinatriumhydrogenphosphat, 0,34% Kaliumdihydrogenphosphat und 0,2% Tween^(R)80 – eingestellt auf pH 6,7 – beschickt mit einer Trockenkultur von *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 beimpft und 3 Tage lang mit 190 Umdrehungen pro Minute bei 30 °C geschüttelt.

b) 50 g Cholesterin werden in 120 ml Dichlormethan und 50 ml Orthoameisensäuretriäthylester unter Argon suspendiert, mit 0,5 ml 70%iger Perchlorsäure versetzt und 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann giesst man die Mischung in Wasser, rührt zwei Stunden lang, extrahiert mit Dichlormethan, wäscht die Dichlormethanphase, engt sie im Vakuum ein, kristallisiert den Rückstand aus Methanol um und erhält 43,25 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten vom Schmelzpunkt 82 bis 83 °C.

25,0 g der so dargestellten 3-Äthoxy-5-cholestens werden mit 10 g Tegin^(R) und 750 ml Wasser mit Natronlauge auf pH-11,3 eingestellt bei 95 °C mit einem Ultra-Turrax^(R) (Firma Jahnke und Kunkel, BRD) 5 Minuten emulgiert. Man sterilisiert die Emulsion 20 Minuten lang bei 120 °C.

c) Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 85 ml steriler Nährlösung enthaltend 2,0% Cornsteep liquor, 0,3% Diammoniumhydrogenphosphat und 0,25% Tween 80 – eingestellt auf pH – 7,0 – wird mit 5 ml der *Mycobacterium spec.* Vorkultur beimpft, mit 14 ml der 3 β -Äthoxy-5-cholesten-Suspension (dies entspricht 0,5 g 3-Äthoxy-5-cholesten) versetzt und 120 Stunden lang mit 220 Umdrehungen pro Minute bei 30 °C geschüttelt.

Dann extrahiert man die Fermentationskultur mit Tetra-chloräthan, engt die organische Phase nach Waschen ein, reinigt den Rückstand durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule und erhält neben 0,025 g 3-Äthoxy-5-cholesten, nach Umkristallisation aus Äthylacetat 0,25 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 146 bis 147 °C.

Beispiel 2

a) 50 g eines Stigmasterin-Rohprodukts werden unter den im Beispiel 1 b beschriebenen Bedingungen in den 3 β -Äthyläther überführt.

25,0 g des so erhaltenen 3 β -Äthoxy-stigmasterin-Rohprodukts (Reinheit 92%ig) werden, wie im Beispiel 1 b beschrieben emulgiert.

b) 14 ml der so dargestellten 3 β -Äthoxy-stigmasterin-Suspension (dies entspricht 0,46 g 3-Äthoxy-stigmasterin) werden unter den im Beispiel 1 c beschriebenen Bedingungen 120 Stunden lang mit einer Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-Kultur fermentiert und man erhält nach Aufbereitung wie im Beispiel 1 c beschrieben 0,1 g 3 β -Äthoxy-stigmasterin und 0,18 g 3 β -Äthoxy-4-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 146 bis 147 °C.

Beispiel 3

a) 25 g 4-Cholesten-3-on werden mit 150 ml Benzol, 30 g Glykol und 0,5 g p-Toluolsulfonsäure versetzt und 24 Stunden lang am Wasserabscheider erhitzt.

Dann lässt man die Mischung erkalten, verdünnt sie mit Benzol, wäscht die Benzolphase mit Natriumhydrogencarbonat und Wasser, trocknet sie über Natriumsulfat und engt sie im Vakuum ein.

Der Rückstand wird aus Aceton-Hexan umkristallisiert und man erhält 19,6 g 3,3-Äthylendioxy-5-cholesten vom Schmelzpunkt 130 bis 132 °C.

5 g 3,3-Äthylendioxy-5-cholesten werden bei 60 °C in 100 ml Dimethylformamid gelöst.

b) Unter den Bedingungen des Beispiels 1 c werden 100 ml einer Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-Kultur hergestellt, mit 1 ml 3,3-Äthylendioxy-5-cholesten-Lösung versetzt und 96 Stunden lang fermentiert.

Man arbeitet die Fermentationsmischung auf, wie im Beispiel 1 c beschrieben und erhält neben 0,01 g 3,3-Äthylendioxy-5-cholesten 0,013 g 3,3-Äthylendioxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 164 bis 165 °C.

Beispiel 4

a) Unter den im Beispiel 1 b beschriebenen Bedingungen werden 25 g 3 β -Methoxy-5-cholesten emulgiert.

b) Unter den im Beispiel 1 c beschriebenen Bedingungen werden 100 ml einer Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-Kultur hergestellt, die Kultur 24 Stunden lang incubiert, mit 7 ml 3-Methoxy-5-cholesten-Suspension (dies entspricht 0,25 g 3-Methoxy-5-cholesten) versetzt und weitere 96 Stunden lang fermentiert. Man arbeitet die Fermentationsmischung auf, wie im Beispiel 1 c beschrieben und erhält 110 mg 3 β -Methoxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 141 bis 142 °C.

Beispiel 5

a) 25 g 4-Cholesten-3-on werden unter den im Beispiel 2 a beschriebenen Bedingungen, jedoch unter Verwendung von 2,2-Di-methylpropandiol anstelle von Glykol, umgesetzt und aufbereitet und man erhält 17,3 g 3,3-(2', 2'-Dimethylpropylenedioxy)-5-cholesten vom Schmelzpunkt 144 bis 145 °C.

0,5 g 3,3-(2', 2'-Dimethylpropylenedioxy)-5-cholesten werden bei 60 °C in 15 ml Dimethylformamid gelöst.

b) Unter den im Beispiel 1 b beschriebenen Bedingungen werden 100 ml einer Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-Kultur hergestellt und 24 Stunden lang incubiert. Dann setzt man der Kultur 0,15 ml der 3,3-(2', 2'-Dimethylpropylenedioxy)-5-cholesten-Lösung zu und fermentiert weitere 96 Stunden. Man arbeitet den Fermentationsansatz auf, wie im Beispiel 1 c beschrieben und erhält neben 0,01 g 3,3-(2', 2'-Dimethylpropylenedioxy)-5-cholesten 0,03 g 3,3-(2', 2'-Dimethylpropylenedioxy)-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 200 bis 201 °C.

Beispiel 6

a) Unter den Bedingungen des Beispiels 1 a werden 500 ml einer Vorkultur von Mycobacterium spec. NRRL-B-3683 hergestellt.

b) 100 ml einer Nährlösung gemäss Beispiel 1 c werden mit

10 ml der Vorkultur beimpft und 24 Stunden lang incubiert. Dann setzt man der Kultur 1,4 ml einer gemäss Beispiel 1 b hergestellten 3 β -Äthoxy-5-cholesten-Suspension zu, (dies entspricht 0,05 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten) fermentiert weitere 96 Stunden, arbeitet den Fermentationsansatz auf, wie im Beispiel 1 c beschrieben und erhält neben 0,005 g 3-Äthoxy-5-cholesten 0,025 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 147 °C.

Beispiel 7

10 Unter den Bedingungen des Beispiels 6, jedoch unter Verwendung von Mycobacterium phlei (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr. 29) oder von Mycobacterium phlei ATCC-354 werden aus 0,05 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten neben 0,02 g 15 Ausgangsverbindung 0,015 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on erhalten.

Beispiel 8

20 Unter den Bedingungen des Beispiels 6, jedoch unter Verwendung von Mycobacterium smegmatis ATCC-20 werden aus 0,05 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten 0,01 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on erhalten.

Beispiel 9

25 Unter den Bedingungen des Beispiels 6, jedoch unter Verwendung von Mycobacterium smegmatis ATCC-19979 werden aus 0,05 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten 0,02 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on erhalten.

Beispiel 10

30 Unter den Bedingungen des Beispiel 6, jedoch unter Verwendung von Mycobacterium fortuitum CBS 49566 wurden aus 0,05 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten 0,02 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on erhalten.

Beispiel 11

35 a) Unter den Bedingungen des Beispiels 1 a werden in einem 750 ml Erlenmeyerkolben 200 ml einer Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-Kultur bei 29 °C angezüchtet.

40 b) Ein 50 l Fermenter mit 40 l einer sterilen Nährlösung enthaltend 1,23% Hefeextrakt (65%ig), 0,68% Kaliumdihydrogenphosphat und 0,2% Tween^(R) 80 – eingestellt auf pH=6,0 – wird mit 200 ml der Mycobacterium spec. Anzuchtskultur beimpft und die Vorkultur bei 29 °C unter Belüftung (2 m³ pro Stunde) 48 Stunden lang incubiert.

45 c) 200 g 3 β -Äthoxy-5-cholesten werden mit 80 g Tegin^(R) und 6 l mit Natronlauge auf pH=11,3 eingestelltes Wasser bei 95 °C mit einem Dispax^(R)-Reaktor D-3-6-6 (Firma Jahnke und Kunkel; BRD) 30 Minuten lang emulgiert. Man sterilisiert die Emulsion 20 Minuten lang bei 120 °C.

50 d) Ein 50 l Fermenter wird mit 40 l steriler Nährlösung der gleichen Zusammensetzung, wie im Beispiel 11 b beschrieben, jedoch eingestellt auf pH=6,5 – beschickt, mit 2 l Mycobacterium spec. Vorkultur beimpft und unter Belüften (1 m³ pro Stunde) und Rühren (220 Umdrehungen pro Minute) 24 Stunden lang bei 29 °C incubiert.

55 Dann setzt man der Kultur die gemäss Beispiel 11 c hergestellte 3 β -Äthoxy-5-cholesten-Emulsion zu und fermentiert weitere 92 Stunden lang.

60 Nach erfolgter Fermentation wird die Kultur 3 mal mit je 5 l Äthylenchlorid extrahiert, der Äthylenoxydextrakt filtriert und im Vakuum eingeengt.

65 Der Rückstand (148 g) wird über eine Kieselgelsäule chromatographiert, aus Äthylacetat umkristallisiert und man erhält 83,5 g 3 β -Äthoxy-5-androsten-17-on vom Schmelzpunkt 145 bis 146,5 °C.