



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: C 12 P 33/16
C 07 J 1/00



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

PATENTSCHRIFT A5

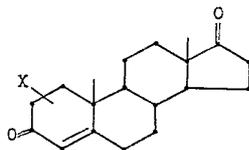
11

625 554

<p>21 Gesuchsnummer: 15861/76</p> <p>22 Anmeldungsdatum: 16.12.1976</p> <p>30 Priorität(en): 19.12.1975 DE 2558090</p> <p>24 Patent erteilt: 30.09.1981</p> <p>45 Patentschrift veröffentlicht: 30.09.1981</p>	<p>73 Inhaber: Schering Aktiengesellschaft, Berlin & Bergkamen, Berlin 65 (West)</p> <p>72 Erfinder: Dr. Alfred Weber, Berlin (West) Dr. Mario Kennecke, Berlin (West) Dr. Rudolf Müller, Berlin (West) Dr. Ulrich Eder, Berlin (West) Prof. Dr. Rudolf Wiechert, Berlin (West)</p> <p>74 Vertreter: E. Blum & Co., Zürich</p>
--	--

54 Verfahren zur Herstellung von 4-Androsten-3,17-dion-Derivaten.

57 Es werden Androstan-3,17-dion-Derivate der Formel



(I),

worin

X eine 1,2-Methylengruppe oder eine in der 1- oder 2-Stellung befindliche Methylgruppe darstellt, hergestellt.

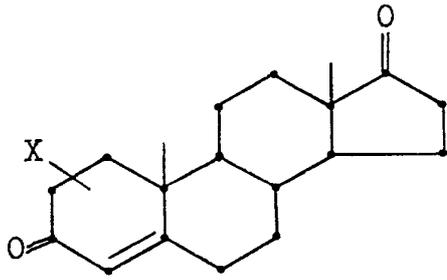
Diese Verbindungen werden erhalten, indem man ein entsprechendes Sterinderivat, in welchem in 17-Stellung ein Kohlenwasserstoffrest mit 8-10 C-Atomen vorhanden ist, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismuskultur fermentiert. In den Ausgangs-Sterinen kann eine Δ^6 -Doppelbindung vorhanden sein, welche unter den Reaktionsbedingungen hydriert wird.

Durch Reduktion der 17-Ketogruppe in Verbindungen der Formel I erhält man die entsprechenden 17 β -Hydroxy-Derivate.

Die erhaltenen Verbindungen können als Zwischenprodukte zur Synthese pharmakologisch wirksamer Steroide verwendet werden. Die erhaltenen 17 β -Hydroxy-Derivate sind selbst auch pharmakologisch wirksame Steroide.

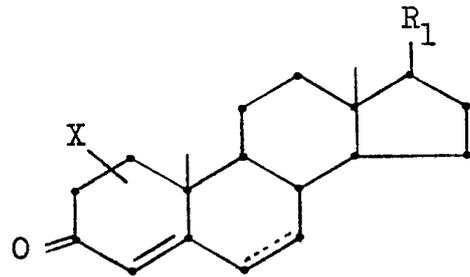
PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von 4-Androsen-3,17-dion-Derivaten der allgemeinen Formel I



(I),

worin X eine 1,2-Methylengruppe oder ein in der 1- oder 2-Stellung befindliche Methylgruppe darstellt, dadurch gekennzeichnet, dass man die Sterin-Derivate der allgemeinen Formel II

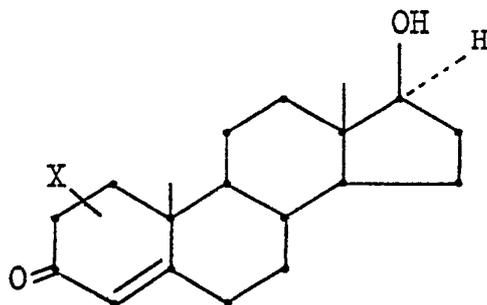


(II),

worin X die obengenannte Bedeutung besitzt, die Bindung ... eine Einfachbindung oder eine Doppelbindung bedeutet und R_1 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert, wobei, falls eine Δ^6 -Doppelbindung vorhanden ist, diese unter den Reaktionsbedingungen hydriert wird.

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

3. Verfahren zur Herstellung von 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on-Derivaten der allgemeinen Formel III

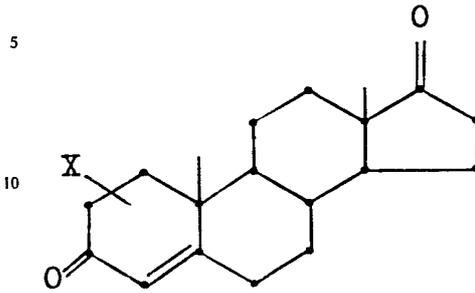


(III),

worin X eine 1,2-Methylengruppe oder eine in der 1- oder 2-Stellung befindliche Methylgruppe bedeutet, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 eine Verbindung der Formel I herstellt und in dieser die 17-Ketogruppe reduziert.

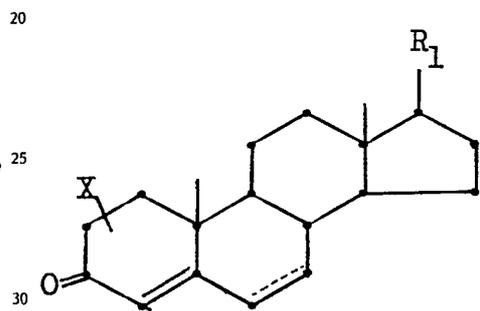
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die 3-Oxogruppe während der Reduktion intermediär ketalisiert ist.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 4-Androsten-3,17-dion-Derivaten der allgemeinen Formel I



(I),

worin X eine 1,2-Methylengruppe oder eine in der 1- oder 2-Stellung befindliche Methylgruppe darstellt, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man ein Sterin-Derivat der allgemeinen Formel II

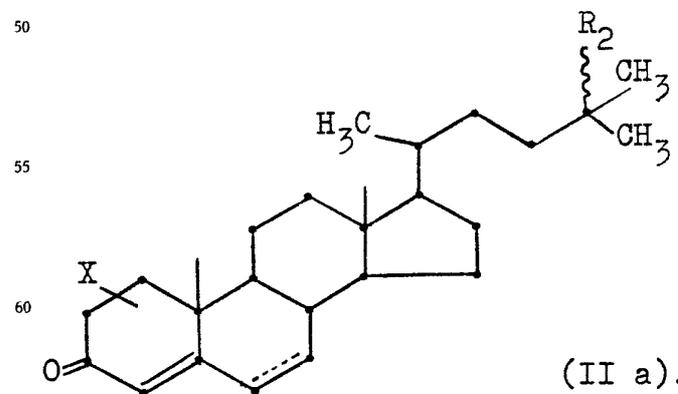


(II),

worin x die obengenannte Bedeutung besitzt, die Bindung ... eine Einfachbindung oder eine Doppelbindung bedeutet und R_1 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt, mit einer zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigten Mikroorganismenkultur fermentiert, wobei, falls eine Δ^6 -Doppelbindung vorhanden ist, diese unter den Reaktionsbedingungen hydriert wird.

Unter einem 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest R_1 soll ein Rest verstanden werden, wie er in den gegebenenfalls hydrierten Seitenketten von natürlich vorkommenden Zoo- oder Phytosterinen, wie zum Beispiel Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin, Brassicasterin oder den Sitensterinen vorliegt.

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



(II a),

worin X und ... die obengenannte Bedeutung besitzen und R_2 ein Wasserstoffatom, eine Methylgruppe oder eine Äthylgruppe bedeutet, charakterisiert werden können.

Geeignete Ausgangsverbindungen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise solche Sterine, in denen der Substituent X eine 1 α -Methylgruppe, eine 1 β -Methylgruppe, eine 1 α -, 2 α -Methylengruppe oder eine 1 β -, 2 β -Methylengruppe bedeutet. Als geeignete Ausgangsverbindungen seien beispielsweise genannt: das 1 α -Methyl-4-cholesten-3-on, das 1 β -Methyl-4-cholesten-3-on, das 1 α -, 2 α -Methylen-4-cholesten-3-on, das 1 α -, 2 α -Methylen-4,6-cholestadien-3-on, das 1 α -, 2 α -Methylen-4,6-stigmastadien-3-on oder die entsprechenden Sitosterinderivate.

Es ist bekannt, dass zahlreiche Mikroorganismen (so zum Beispiel solche der Gattungen *Athrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* und insbesondere *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.

Ferner ist bekannt, dass es mit Hilfe von Inhibitorzusätzen oder mutierten Mikroorganismen möglich ist, den Abbau der Sterine so zu lenken, dass ein Abbau des gebildeten 4-Androsten-3,17-dions oder 1,4-Androstadien-3,17-dions vermieden wird (siehe deutsch Offenlegungsschriften 1 543 269 und 1 593 327 sowie US-Patentschrift 3 684 657).

Für den Fachmann ist es überraschend, dass unter den bekannten Bedingungen auch die Seitenketten von Sterin-Derivaten der allgemeinen Formel II abgebaut werden, weil bekannt ist, dass der Seitenkettenabbau von Sterinen durch ein sehr komplexes Fermentationsystem 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 konnte man nicht vorhersehen, dass die den Abbau des 1,4-Androstadien-3,17-dions und das 4-Androsten-3,17-dions bewirkenden Enzymsysteme nicht befähigt sind, die 4-Androsten-3,17-dion-Derivate der allgemeinen Formel I abzubauen.

Bei der fermentierten Umsetzung von Sterin-Derivaten der allgemeinen Formel II mit einer Δ^6 -Doppelbindung wird diese überraschenderweise hydriert.

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

Erfindungsgemäss wird die Fermentation unter Verwendung der Mikroorganismenkulturen durchgeführt, welche man üblicherweise zum Seitenkettenabbau von Sterinen verwendet. Geeignete Kulturen sind beispielsweise zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigte Bakterienkulturen der Gattungen *Athrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* oder insbesondere der Gattung *Mycobacterium*. Als geeignete Mikroorganismen seien beispielsweise genannt: *Microbacterium lactum* IAM-1640, *Protaminobacter alboblavus* IAM-1040, *Bacillus roseus* IAM-1257, *Bacillus sphäricus* ATCC-7055, *Nocardia gardneri* IAM-105, *Nocardia minima* IAM-374, *Nocardia corallina* IFO-3338, *Streptomyces rubescens* 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*.

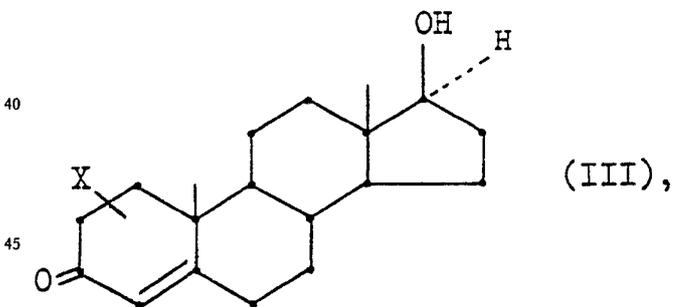
Die genannten Mikroorganismen werden in den US-Patenten Nr. 3 684 657 und 3 759 791 beschrieben.

Unter den für diese Mikroorganismen üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen werden in einem geeigneten Nährmedium unter Belüften, Submerskulturen angezüchtet. Dann setzt man 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, Dimethylformamid 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, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxyd) gelöst unter starker Turbulenz in (vorzugsweise entkalktem) Wasser, welches die üblichen Emulgationshilfen enthält, eindüst. Geeignete Emulgationshilfen sind nichtionogene Emulgatoren, wie zum Beispiel Äthylenoxydaddukte oder Fettsäureester von Polyglykolen. Als geeignete Emulgatoren seien die handelsüblichen Netzmittel Tegin®, Tagat®, Tween® und Span® beispielemässig genannt.

Die optimale Substratkonzentration, Substratzugabezeit und Fermentationsdauer ist 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 durch Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, ermittelt werden.

Durch Reduktion der 17-Ketogruppe in erhaltenen Verbindungen der Formel I erhält man entsprechende 17 β -Derivate. Die Reduktion wird vorzugsweise unter intermediärem Schutz der 3-Ketogruppe durch Ketalbildung durchgeführt. Diese Verbindungen weisen die folgende Formel auf:



worin X die obengenannte Bedeutung besitzt, die Bindung...

Die Reduktion der 17-Ketogruppe der 4-Androsten-3,17-dion-Derivate der allgemeinen Formel I kann mittels der dem Fachmann wohlbekannten Arbeitsmethode (siehe z. B. John Fried: *Organic Reactions in Steroid Chemistry*-van Nostrand Reinhold Comp. New York etc. 1972, Volume 1, Seite 61 ff) erfolgen. So kann man diese Verbindungen beispielsweise nach Ketalisierung mit Natriumborhydrid oder Lithiumaluminiumhydrid umsetzen und erhält nach Spaltung der Ketale die entsprechenden 17 β -Hydroxy-4-androsten-3-on-Derivate der allgemeinen Formel III, welche bekanntlich eine anabole und/oder androgene Wirksamkeit besitzen.

Die als Ausgangsverbindungen verwendeten Sterin-Derivate der allgemeinen Formel II können aus den entsprechenden Sterinen mittels der Methoden hergestellt werden, welche man konventionellerweise zur Einführung der entsprechenden 1- und/oder 2-ständigen Substituenten in Steroide anwendet.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung.

A) Ausführungsbeispiele betreffend den mikrobiologischen Seitenkettenabbau

Beispiel 1

Ein 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml sterilem Nährmedium, enthaltend 1% Hefeextrakt, 0,45% Dinatriumhydrogenphosphat, 0,34% Kaliumdihydrogenphosphat und 0,2% Tween® 80 – eingestellt auf pH = 6,7 – wird mit einer Suspension einer *Mycobacterium spec. NRRL-B-3805* Trockenkultur beimpft und drei Tage lang bei 30 °C mit 190 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

20 Erlenmeyerkolben mit jeweils 100 ml sterilen Nährmediums, enthaltend 2,0% Corn steep liquor, 0,3% Diammoniumhydrogenphosphat und 0,25% Tween® 80 – eingestellt auf pH = 6,5 – werden mit jeweils 5 ml der *Mycobacterium spec.* Anzuchtkultur beimpft und 24 Stunden lang bei 30 °C mit 220 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Dann setzt man jeder Kultur 100 mg 1 α ,2 α -Methylen-4,6-cholestadien-3-on in 1 ml Dimethylformamid gelöst zu und fermentiert weitere 96 Stunden lang bei 30 °C.

Die vereinigten Kulturen werden mit Äthylchlorid extrahiert, der Extrakt im Vakuum eingeengt, der Rückstand durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule gereinigt und man erhält, nach Umkristallisation aus Diisopropyläther 0,9 g 1 α ,2 α -Methylen-4-androsten-3,17-dion vom Schmelzpunkt 155 °C.

Herstellung der Ausgangsverbindung:

a) 111 g 3 β -Hydroxy-5-cholesten werden in 2,2 l Toluol und 111 ml Cyclohexan zum Sieden erhitzt und eine Lösung von 55,5 g Aluminiumisopropylat in 666 ml Toluol zugetropft, anschließend wird 90 Minuten bei langsamen Abdestillieren weiter erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wird mit Äther verdünnt, mit verdünnter Schwefelsäure und Wasser gewaschen und eingeengt. Der Rückstand wird mit Wasserdampf destilliert und das nach Methylenchloridextraktion erhaltende Rohprodukt an Silicagel chromatographiert. Aus Methanol umkristalliert werden 70 g 4-Cholesten-3-on vom Schmelzpunkt 79–80,5 °C erhalten.

b) 60 g 4-Cholesten-3-on werden in 2 l Äther und 1 ml Bromwasserstoffsäure in Essigsäure 37%ig gelöst und unter Rühren mit einer Lösung von 52,4 g Brom in 300 ml Essigsäure versetzt und 15 Minuten nachgerührt. Es wird dann noch mit etwas Äther verdünnt und nacheinander mit Wasser, Natriumhydro-

gencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wurden 90 g rohes 2,6-Dibrom-4-cholesten-3-on als Öl erhalten.

c) 90 g rohes 2,6-Dibrom-4-cholesten-3-on werden in 900 ml Dimethylformamid mit 36,9 g Lithiumcarbonat und 43,3 g Lithiumbromid 20 Stunden bei 100 °C gerührt. Es wird dann in Eiswasser eingerührt, der Niederschlag abfiltriert, mit Wasser gewaschen und in Methylenchlorid aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wird der Rückstand an Silicagel chromatographiert und es werden 42 g 1,4,6-Cholestatrien-3-on als Öl erhalten.

d) 31,9 g Trimethylsulfoxoniumjodid werden in 1 l Dimethylsulfoxid mit 5,6 g pulverisiertem Natriumhydrid 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Diese Lösung wird dann zu 40 g 1,4,6-Cholestatrien-3-on, gelöst in 200 ml absolute, Tetrahydrofuran, gegeben und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Es wird in essigsäures Eiswasser eingerührt, vom ausgeschiedenen Öl abdekantiert und dieses dann in Äther aufgenommen. Nach dem Trocknen und Eindampfen werden nach Chromatographie umkristallisiert aus Methanol 10,5 g 1 α ,2 α -Methylen-4,6-cholestadien-3-on vom Schmelzpunkt 68–69 °C.

Beispiel 2

In 20 Erlenmeyerkolben werden unter den Bedingungen des Beispiels 1 jeweils 100 mg 1 α -Methyl-4-cholesten-3-on mit einer *Mycobacterium spec. NRRL-B-3805*-Kultur umgesetzt, aufbereitet und man erhält das 1 α -Methyl-4-androsten-3,17-dion vom Schmelzpunkt 134–137 °C.

Das als Ausgangsverbindung verwendete 1 α -Methyl-4-cholesten-3-on ist bekannt (C.A. 61, 1964, 8367 f).

B) Ausführungsbeispiele betreffend die chemische Weiterverarbeitung der 4-Androsten-3,17-dion-Derivate.

Beispiel 3

3,2 g 1 α ,2 α -Methylen-4-androsten-3,17-dion werden in 50 ml absolutem Äthanol gelöst, auf 0° abgekühlt und anteilweise mit 0,5 g Natriumborhydrid versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden bei Eiskühlung wird in 50 ml halbgesättigte Natriumdihydrogenphosphatlösung eingerührt, das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit Wasser ausgewaschen. Nach Umkristallisieren aus Äthanol erhält man 1,95 g 17 α -Hydroxy-1 α ,2 α -Methylen-4-androsten-3-on.