

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

200520
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 13 07 77
(21) (PV 5919-78)

(32) (31) (33) Právo přednosti od 16 07 76
(P 26 32 677.2)
Německá spolková republika

(40) Zveřejněno 31 12 79

(45) Vydáno 15 08 83

(51) Int. Cl.³
C 07 J 1/00

(72)
Autor vynálezu

WEBER ALFRED dr., KENNECKE MARIO dr.
a DAHL HELMUT dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

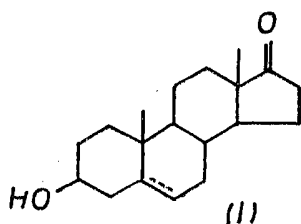
(73)
Majitel patentu

SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)
a BERGKAMEN (NSR)

(54) Způsob výroby androstan-17-onových derivátů

1

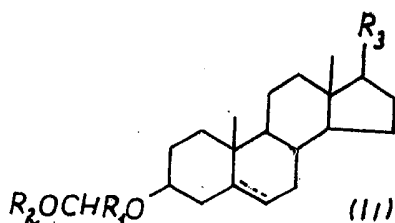
Vynález se týká způsobu výroby androstan-17-onových derivátů obecného vzorce I



ve kterém

vazba představuje jednoduchou nebo dvojnou vazbu,

Podstata tohoto způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že sterolový derivát obecného vzorce II



2

v němž

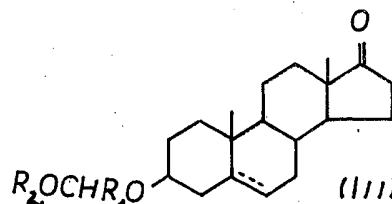
vazba má výše uvedený význam,

R1 značí vodík nebo C1—C4-alkyl,

R3 představuje uhlovodíkový zbytek sterolu s 8 až 10 uhlíkovými atomy a

R2 značí C1—C6-alkyl, popřípadě přerušovaný atomem kyslíku,

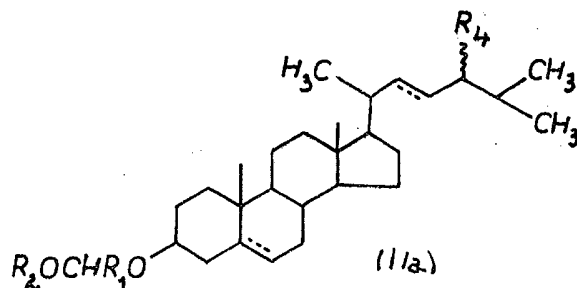
se fermentuje s kulturou mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce sterolů, a takto vyrobený derivát androstan-17-onu obecného vzorce III



v němž

vazba, R1 a R2 mají výše uvedený význam, se štěpí v přítomnosti H⁺-iontů nebo Lewisových kyselin.

Způsob podle vynálezu se s výhodou provádí tak, že sterolový derivát obecného vzorce IIa



v němž

vazba, R_1 a R_2 mají svrchu uvedený význam a

R_4 značí atom vodíku, methylovou nebo ethylovou skupinu, se fermentuje kulturou mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce sterolů.

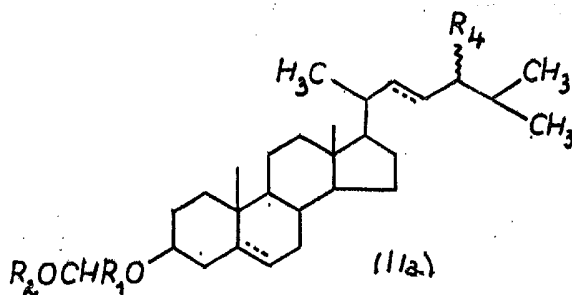
K takové fermentaci se může používat s výhodou kultury mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce sterolů druhů *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Mirobacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* nebo zejména druhu *Mycobacterium*.

Alkylovou skupinu R_1 nebo R_2 se rozumí alkylová skupina obsahující 1 až 4 uhlíkové atomy, s výhodou alkylová skupina s přímým řetězcem. Vhodnými alkylovými

skupinami R_1 nebo R_2 jsou například propylová, butylová, isopropylová, sek.butylová skupina a zejména methylová skupina a ethylová skupina. Alkylovou skupinou přerušovanou atomem kyslíku se rozumí skupina, která obsahuje 3 až 6 uhlíkových atomů. Takovými skupinami jsou například 2-alkoxyethylenové skupiny jako 2-methoxyethylenová skupina nebo 2-ethoxyethylenová skupina.

Uhlovodíkovým zbytkem R_3 obsahujícím 8 až 10 uhlíkových atomů se rozumí zbytek, který se vyskytuje v postranních řetězcích přirozených zoo- nebo fytosterolů, například cholesterolu, stigmasterolu, kampesterolu, brassikasterolu nebo sitosterolů.

Vhodnými deriváty sterolu obecného vzorce II jsou například takové sloučeniny, které lze charakterizovat obecným vzorcem IIa



v němž

R_1 a R_3 mají výše uvedený význam, vazby představují jednoduché nebo dvojnásobné vazby a

R_4 značí atom vodíku, methylovou nebo ethylovou skupinu.

Zvláště vhodnými sterolovými deriváty obecného vzorce IIa jsou Δ^5 -steroidy a deriváty 5α -sterolů tohoto obecného vzorce.

Je známo, že četné mikroorganismy (například druhů *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* a zejména *Mycobacterium*) mají přirozenou schopnost odbourávat zoo- a fytosteroly na kyslíčník uhlíčitý a vodu a že při tomto odbourávání vzniká intermediárně 4-androsten-3,17-dion a 1,4-androstadien-3,17-dion.

Protože četné zoo- a fytosteroly (například cholesterol, stigmasterol, kampesterol, brassikasterol nebo sitosteroly) jsou hojně rozšířeny v přírodě a jsou tedy lehko dostupnými surovinami pro syntézu farmako-

logie účinných steroidů, byly provedeny četné pokusy, řídit odbourávání sterolů tak, aby se zamezilo dalšímu odbourávání vzniklého 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu.

Tak bylo například možné zamezit dalšímu odbourávání 1,4-androstadien-3,17-dionu a 4-androsten-3,17-dionu tím, že se k fermentačním násadám přidávají inhibitory (viz německé vykládací spisy č. 1 543 269 a 1 593 327, jakož i americký patent číslo 1 208 078). Použitím inhibitorů se však stává technické provedení těchto reakcí velmi nákladným; v neposlední řadě z toho důvodu, že musí být použité inhibitory po provedené reakci odstraňovány z fermentačních kultur, aby se zabránilo pronikání těchto látek do odpadních vod. Známé reakce mají kromě toho tu nevýhodu, že při nich vždy vzniká 1,4-androstadien-3,17-dion nebo směs 1,4-androstadien-3,17-dionu a 4-androsten-3,17-dionu. Vznikající 1,4-androstadien-3,17-dion je však jako výchozí látka pro syntézu četných farmakologicky účinných

ných steroidů málo vhodný.

Jinak mohlo být dalšímu odbourávání 1,4-androstadien-3,17-dionu a 4-androsten-3,17-dionu zabráněno i tak, že k fermentační přeměně sterolů bylo použito mutant mikroorganismů druhu *Mycobacterium* (viz americký patent č. 3 684 657). Dosud vypěstované mutanty mají však nevýhodu spočívající ve velmi omezené schopnosti tvorby 1,4-androstadien-3,17-dionu nebo 4-androsten-3,17-dionu ze sterolů.

Úkolem tohoto vynálezu je vyvinout způsob odbourávání postranních řetězců sterolů prostý nedostatků známých způsobů.

Úkol byl řešen vypracováním způsobu vyznačujícího se tím, že derivát sterolu obecného vzorce II se fermentuje s kulturou mikroorganismů způsobilých odbourávat postranní řetězce sterolů.

Pro odborníka je velmi překvapující, že při této fermentační přeměně vznikají ve vysokých výtěžcích deriváty androstan-17-onu obecného vzorce I. To z toho důvodu, poněvadž je známo, že odbourávání postranního řetězce sterolů provádí velmi komplexní enzymový systém a nemohlo být očekáváno, že všechny enzymy spolupůsobící při odbourávání postranních řetězců přirozených sterolů mají schopnost provádět rovněž odbourávání postranních řetězců sterolů obecného vzorce II nevyskytujících se v přírodě. Nemohlo být kromě toho předvídáno, že enzymové systémy účastníci se odbourávání 1,4-androstadien-3,17-dionu a 4-androsten-3,17-dionu neodbourávají deriváty androstan-17-onu obecného vzorce I.

Odhlédne-li se od použití jiných výchozích sloučenin a od skutečností, že tuto reakci lze provádět v nepřítomnosti inhibitorů, způsob podle vynálezu se provádí za stejných fermentačních podmínek, kterých se rovněž používá u známých reakcí mikrobiologického odbourávání postranních řetězců sterolů.

Podle vynálezu se fermentace provádí za použití kultur mikroorganismů, kterých se používá obvykle k odbourávání postranního řetězce sterolů. Vhodnými kulturami jsou například kultury bakterií způsobilé k odbourávání postranních řetězců sterolů druhů *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* nebo zejména druhu *Mycobacterium*. Jako vhodné mikroorganismy lze uvést například *Microbacterium lactum* IAM-1640, *Protaminobacter albolavus* IAM-1040, *Bacillus roseus* IAM-1257, *Bacillus sphaericus* ATCC-7055, *Nocardia gardneri* IAM-105, *Nocardia minima* IAM-374, *Nocardia corallina* IDO-3338, *Streptomyces rubescens* IAM-74 nebo zejména mikroorganismy *Mycobacterium avium* IFO-3082, *Mycobacterium phlei* IFO-3158, *Mycobacterium phlei* [Ústav Zdravotnictví, Budapešť č. 29], *Mycobacterium phlei* ATCC-354, *Mycobacterium smegmatis* ATCC-20, *Mycobacterium smegmatis* IFO-3084, *Mycobacterium smegmatis* [Ústav Zdravotnictví, Bu-

dapešť č. 27], *Mycobacterium smegmatis* ATCC-19979, *Mycobacterium fortuitum* CBS-49566, *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 a *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3683.

Submerzní kultury se předkultivují za vzdušnění ve vhodném živném prostředí za obvyklých podmínek používaných u těchto mikroorganismů. Potom se přidává ke kulturám substrát (rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle nebo s výhodou v emulgované formě) a fermentuje se, až se dosáhne maximální přeměny substrátu.

Vhodnými rozpouštědly substrátu jsou například methanol, ethanol, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid. Emulgování substrátu lze provádět například tak, že se přidává v mikronizované formě nebo rozpuštěný v rozpouštědle mísitelném s vodou (jako methanolu, ethanolu, acetonu, glykolmonomethyletheru, dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu) za intenzivní turbulence do vody (s výhodou zbavené vápníku), která obsahuje obvyklá emulgační činidla. Vhodnými emulgačními činidly jsou neionogenní emulgátory, například ethylenoxidové adukty nebo polyglykolové estery mastných kyselin. Vhodnými emulgátory jsou například obchodně dostupná smáčedla typu Teginu^(R), Tagatu^(R), Tweenu^(R) a Spanu^(R).

Emulgování substrátu umožňuje často zvýšené prosazení substrátem a tím zvýšení koncentrace substrátu. Je pochopitelně rovněž možné při způsobu podle vynálezu používat další metody zvyšování prosazení substrátu, jak je dobře známo pracovníkům z oboru.

Optimální koncentrace substrátu, doba přidávání substrátu a trvání fermentace jsou závislé na struktuře použitého substrátu a druhu použitého mikroorganismu. Tyto veličiny musí být zjišťovány, jak se u mikrobiálních přeměn steroidů obecně vyžaduje, v jednotlivých případech předběžnými pokusy.

Štěpení sloučenin vzorce III se provádí za takových podmínek, kterých se obvykle používá k hydrolýze nebo alkoholýze acetalů. Sloučeniny lze například štěpit tak, že se v nižším alkoholu, jako methanolu nebo ethanolu nebo v organickém rozpouštědle obsahujícím vodu, jako glykolmonomethyletheru, tetrahydrofuranu, dioxanu, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu, triamidu kyseliny hexamethylfosforečné, acetonu uvádějí do reakce s minerální kyselinou, jako kyselinou chlorovodíkovou, sírovou, fosforečnou, chloristou, sulfonovou, jako kyselinou p-toluen-sulfonovou, se silně kyselými karboxylovými kyselinami, jako kyselinou mravenčí, octovou, trifluoroctovou, s kyselými iontoměničemi nebo Lewisovou kyselinou, jako fluoridem boritým, chloridem zinečnatým nebo bromidem zinečnatým.

Tímto způsobem lze například jednoduše připravit 3 β -hydroxy-5-androsten-17-on, jehož estery jsou známé farmakologicky účinné látky (Chem. Abstr. 65, 1966, 1266f) a vykládací spisy DE č. 1 643 046).

Výchozí sloučeniny způsobu podle vynálezu jsou známé, nebo je lze připravit známými způsoby [J. Pharm. Soc. **54**, 514 (1965), Can. J. Chem. **49**, 2418 (1971), Synthesis **1975**, 276, a **1976**, 244, Tetrahedron Letters **1976**, 809, Can. J. Chem. **50**, 2788 (1972) a Bull. Soc. Chim. France **1960**, 297].

Následující příklady provedení slouží k objasnění vynálezu.

A) Příklady provedení, týkající se mikrobiologického odbourávání postranního řetězce

Příklad 1

a) Do 750 ml Erlenmeyerovy baňky se vneše 200 ml sterilního živného roztoku, obsahujícího 1 % kvasničného extraktu, 0,45 % dinatriumhydrogenfosfátu, 0,34 % kaliumdihydrogenfosfátu a 0,2 % Tagatu^(R) 02, nastaveného na hodnotu pH 6,7, zaočkuje se smytou suchou kulturou Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 a třepe se po dobu 3 dní při teplotě 30 °C při 190 otáčkách za minutu.

b) 50litrový fermentor se 40 litry sterilního živného roztoku obsahujícího 1,23 % kvasničného extraktu (65 %), 0,68 % kaliumdihydrogenfosfátu a 0,2 % Tagatu^(R) 02, nastaveného na hodnotu pH 6,0, se naočkuje 200 ml napěstované kultury Mycobacterium spec. a předkultura se inkubuje po dobu 48 hodin při teplotě 30 °C za vzdušnění (2 m³ za hodinu).

c) 400 g cholesterolu se rozpustí v 6 litrech dimethylacetátu formaldehydu, za míchání se při teplotě místnosti přidá 400 g křemeliny a 200 g kysličníku fosforečného po dávkách a reakční směs se míchá po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Nerozpustné látky se odfiltrují, promyjí dimethylacetátem formaldehydu a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu. Po přidání roztoku hydrogenuhličitanu sodného se pevný surový produkt odsaje, promyje vodou a po vysušení se získá 440 g 3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu. Sloučenina překrystalovaná z acetonu má teplotu tání 79 až 80 °C.

400 g takto připraveného 3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu se emulguje se 120 g Teginu^(R), 10 litry deionizované vody a 40 ml 1 N hydroxidu sodného při teplotě 95 °C po dobu 30 minut. Emulze se sterilizuje po dobu 20 minut při teplotě 120 °C.

d) Do 50litrového fermentoru se vneše 40 litrů sterilního živného roztoku obsahujícího 2,0 % kukuřičného výluhu, 0,3 % diamoniumhydrogenfosfátu a 0,25 % Tagatu^(R) 02, nastaveného na hodnotu pH 6,5, naočkuje se 2 litry předkultury Mycobacterium spec. a za vzdušnění (0,5 m³ za hodinu) a míchání (250 otáček za minutu) se inkubuje po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C. Potom se ke kultuře přidá emulze 3 β -methoxymethoxy-5-

-cholestenu, připravená podle odstavce c) a fermentuje se po dobu dalších 120 hodin.

Po skončené fermentaci se kultura extrahuje 3krát 5 litry ethylenchloridu, ethylenchloridový extrakt se zfiltruje a odpaří ve vakuu.

Zbytek (156 g) se chromatografuje na sloupci křemeliny, překrystaluje z ethylacetátu a získá se 86 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-onu s teplotou tání 129/131 až 132 °C.

Příklad 2

a) Ve 2litrové Erlenmeyerově baňce s 500 ml sterilního živného prostředí se napěstuje za podmínek příkladu 1a) Mycobacterium spec. NRRL-3805.

b) 10 g sitosterolu se přemění reakcí tak, jak je popsáno v příkladu 1c) a získá se 11 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu. Sloučenina překrystalovaná z acetonu má teplotu tání 70 až 71 °C.

10 g takto získaného 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu se emulguje se 4 g Teginu^(R) a 300 ml vody při teplotě 95 °C po dobu 10 minut. Emulze se sterilizuje po dobu 20 minut při teplotě 120 °C.

c) Obsah 20 Erlenmeyerových baněk vždy s 85 ml sterilního živného prostředí, obsahujícího 2,0 % kukuřičného výluhu, 0,3 % diamoniumhydrogenfosfátu a 0,25 % Tagatu^(R), nastaveného na hodnotu pH 6,5, se očkuje po 5 ml napěstované kultury Mycobacterium spec. a třepe se po dobu 24 hodin při 220 otáčkách za minutu při teplotě 30 °C.

Potom se ke každé kultuře přidá 14 ml suspenze 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu (toto množství odpovídá 0,5 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5-cholestenu) a fermentuje se dalších 120 hodin při teplotě 30 °C na třepacím zařízení.

Po zpracování jako v příkladu 1d) se získá 2,1 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-onu s teplotou tání 130 až 132 °C.

Příklad 3

a) 10,5 g stigmasterolu se přemění reakcí jako v příkladu 1c) a získá se 10,75 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadienu. Sloučenina překrystalovaná z acetonu má teplotu tání 103 až 104 °C.

b) 10 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadienu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) Za podmínek popsaných v příkladu 2a) a c) se připraví 85 ml kultury Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 a přidá se 14 ml suspenze 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadienu (toto odpovídá 0,5 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadienu).

Po inkubaci dalších 120 hodin při teplotě 30 °C na třepacím zařízení následuje zpracování jak je popsáno v příkladu 1d).

Získá se 2,3 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-onu s teplotou tání 130 až 132 °Celsia.

Příklad 4

a) 20 g cholesterolu se rozpustí ve 300 ml diethylacetátu formaldehydu, za míchání se přidá 30 g křemeliny při teplotě místnosti a po dávkách 15 g kysličníku fosforečného a míchá po dobu 4 hodin. Reakční směs se zbaví filtrací nerozpustných látek, filtr se promyje diethylacetátem formaldehydu a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu. Zbytek krystaluje při teplotě 0 °C. Po přidání roztoku hydrogenuhlíčitanu sodného se surový produkt odsaje, promyje vodou a po sušení se získá 22,5 g 3 β -ethoxymethoxy-5-cholestenu. Sloučenina překrystalovaná z ethylacetátu má teplotu tání 64 až 66 °C.

b) 10 g 3 β -ethoxymethoxy-5-cholestenu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) K 85 ml kultury *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805, připravené za podmínek uvedených v příkladu 2a, a c), se přidá 14 ml suspenze 3 β -ethoxymethoxy-5-cholestenu (toto odpovídá 0,5 g 3 β -ethoxymethoxy-5-cholestenu).

Po inkubaci po dobu dalších 120 hodin při teplotě 30 °C na třepacím zařízení, následuje zpracování jako v příkladu 1d).

Získá se 1,5 g 3 β -ethoxymethoxy-5-androsten-17-onu s teplotou tání 121 až 123 °C.

Příklad 5

a) 38,67 g cholesterolu se rozpustí ve 250 mililitrech methylenchloridu a 164,2 g formaldehyd-bis-glykolmonomethyletheracetátu (přípravitelného například podle vykládacího spisu DE č. 2 405 633), za míchání při teplotě místnosti se přidá 60 g křemeliny a 30 g kysličníku fosforečného a míchá se po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Nerozpustné produkty se odfiltrují, promyjí methylenchloridem a neutralizují methanolickým roztokem hydroxidu draselného. Po oddestilování rozpouštědla ve vakuu se produkt vyjme do methanolu, zfiltruje a sloučenina pomalým odpařením methanolu zkrystaluje. Získá se 25 g 2 β -(2,5-dioxahe-xyloxy)-5-cholestenu s teplotou tání 41 až 42 °C.

b) Za podmínek uvedených v příkladu 2b) se emulguje 10 g 3 β -(2,5-dioxahe-xyloxy)-5-cholestenu.

c) Za podmínek uvedených v příkladu 2a) a c) se připraví 25 ml kultury *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 a přidá se 14 ml

suspenze 3 β -(2,5-dioxahe-xyloxy)-5-cholestenu (toto odpovídá 0,5 g 3 β -(2,5-dioxahe-xyloxy)-5-cholestenu).

Po dalších 120 hodinách inkubace při teplotě 30 °C na třepacím zařízení následuje zpracování jak je popsáno v příkladu 1d).

Získá se 1,75 g 3 β -(2,5-dioxahe-xyloxy)-5-androsten-17-onu s teplotou tání 65 až 67 °Celsia.

Příklad 6

a) 12 g cholesterolu se suspenduje ve 100 ml dimethylacetátu acetaldehydu, za míchání při teplotě místnosti se přidá 25 g křemeliny a po dávkách 12 g kysličníku fosforečného a za teploty místnosti se míchá po dobu 45 minut. Nerozpustné látky se odsají, promyjí methylenchloridem a roztok se neutralizuje methanolickým roztokem hydroxidu sodného. Po oddestilování rozpouštědla ve vakuu se surový produkt překrystaluje po přidání aktivního uhlí z acetonu. Získá se 10,2 g 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-cholestenu s teplotou tání 94 až 95 °C.

b) 10 g 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-cholestenu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) Za podmínek popsaných v příkladu 2a) a c) se připraví 85 ml kultury *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 a přidá se 14 ml suspenze 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-cholestenu [toto odpovídá 0,5 g 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-cholestenu]. Po dalších 120 hodinách inkubace při teplotě 30 °C na třepacím zařízení následuje zpracování, jak je popsáno v příkladu 1d).

Získá se 1,89 g 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-androsten-17-onu s teplotou tání 111 až 118 °C.

Příklad 7

a) K 19,33 g cholesterolu ve 200 ml methylenchloridu se přidá 23,6 ml vinylethyletheru a 86 mg kyseliny p-toluensulfonové (bezvodé) a míchá se po dobu 1,5 hodiny. Po neutralizaci roztokem hydrogenuhlíčitanu sodného se reakční směs extrahuje roztokem chloridu sodného, suší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje. Olejovitý surový produkt se chromatografuje na sloupci silikagelu ve směsích hexan-ethylacetát. Získá se 18,4 g 3 β -(1-ethoxyethoxy)-5-cholestenu ve formě bezbarvé viskózní látky.

b) 10 g 3 β -(1-ethoxyethoxy)-5-cholestenu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) Za podmínek popsaných v příkladu 2a) a c) se připraví 85 ml kultury *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 a přidá se 14 ml suspenze 3 β -(1-ethoxyethoxy)-5-cholestenu

[toto odpovídá 0,5 g 3 β -(1-ethoxyethoxy)-5-cholestenu]. Potom se inkubuje na třepacím zařízení (při teplotě 30 °C), po dobu dalších 120 hodin.

Spojené kultury se extrahují ethylenchloridem. Extrakty se zahustí ve vakuu, zbytek se zahřívá k varu pod zpětným chladičem se 70 ml methanolu, 12 ml vody a 6 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové po dobu 1 hodiny. Po ochlazení na teplotu 12 °C se reakční produkt vysráží 100 ml vody a odfiltruje. Po překrystalování z acetonu se získá 0,62 g 5-androsten-3 β -ol-17-onu s teplotou tání 138/148 až 149 °C.

Příklad 8

a) 38,7 g cholesterolu se rozpustí v 500 ml methylenchloridu, při teplotě 0 °C se přidá 25 ml ethylenoxidu a 0,5 ml bortrifluorid-etherátu. Reakční směs se ponechá stát přes noc při teplotě místnosti, vytřepe vodou, vysuší síranem sodným a rozpouštědlo se oddestiluje ve vakuu. Surový produkt (50 g) se chromatografuje na silikagelu ve směsích hexan-ethylacetát.

Získá se 10 g 3 β -(2-hydroxyethoxy)-5-cholestenu s teplotou tání 91 až 95 °C.

b) 10 g 3 β -(2-hydroxyethoxy)-5-cholestenu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) Za podmínek uvedených v příkladu 2a) a c) se připraví 85 ml kultury Mycobacterium spec. NRRL-3805 a zpracuje se 14 ml suspenze 3 β -(2-hydroxyethoxy)-5-cholestenu [toto odpovídá 0,5 g 3 β -(2-hydroxyethoxy)-5-cholestenu]. Po dalších 120 hodinách inkubace při teplotě 30 °C na třepacím zařízení následuje zpracování jak je popsáno v příkladu 1d).

Získá se 2,1 g 3 β -(2-hydroxyethoxy)-5-androsten-17-onu s teplotou tání 173/175 až 177 °C.

Příklad 9

a) 20 g 5 α -cholestan-3 β -olu se uvádí do reakce s dimethylacetalem formaldehydu, jak je popsáno v příkladu 1c) a získá se 21,5 g 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholestanu. Sloučenina překrystalovaná z acetonu má teplotu tání 65 až 68 °C.

b) 10 g 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholesta-

nu se emulguje za podmínek popsaných v příkladu 2b).

c) Za podmínek popsaných v příkladu 2a) a c) se připraví 85 ml kultury Mycobacterium spec. NRRL-3805 a zpracuje se 14 ml suspenze 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholestanu [toto odpovídá 0,5 g 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholestanu]. Po dalších 120 hodinách inkubace při teplotě 30 °C na třepáče následuje zpracování jako v příkladu 1d).

Získá se 2,05 3 β -methoxymethoxy-5 α -androstan-17-onu s teplotou tání 97 až 98 °C.

B) Příklady provedení týkající se dalšího chemického zpracování derivátů androstan-17-onu obecného vzorce III

Příklad 10

25 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-onu získaného v příkladech 1 až 3 se zahřívá pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny se 125 ml methanolu, 25 ml vody a 12,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové, reakční směs se ochladí, vysráží vodou a odfiltruje. Získá se 21,6 g 5-androsten-3 β -ol-17-onu s teplotou tání 148 až 149 °C (z methanolu).

Příklad 11

0,5 g 3 β -ethoxyethoxy-5-androsten-17-onu, získaného v příkladu 4, se uvádí do reakce za podmínek uvedených v příkladu 10. Získá se 0,4 g 5-androsten-3 β -ol-17-onu s teplotou tání 148 až 149 °C (z methanolu).

Příklad 12

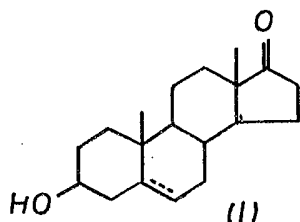
0,38 g 3 β -(2,5-dioxaheptyloxy)-5-androsten-17-onu, získaného v příkladu 5, se za podmínek analogických příkladu 10 uvádí do reakce a zpracuje. Po krystalizaci z methanolu se získá 0,2 g 5-androsten-3 β -ol-17-onu s teplotou tání 148 až 149 °C.

Příklad 13

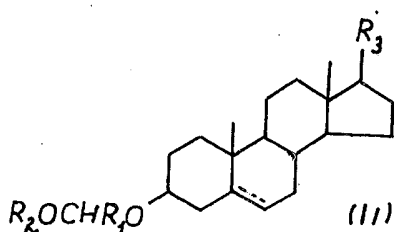
1 g 3 β -(1-methoxyethoxy)-5-androsten-17-onu získaného v příkladu 6 se uvádí do reakce za podmínek uvedených v příkladu 10, avšak po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti. Získá se 0,8 g 5-androsten-3 β -ol-17-onu s teplotou tání 148 až 149 °C (z methanolu).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby androstan-17-onových derivátů obecného vzorce I



v němž
vazba představuje jednoduchou nebo dvojnou vazbu, vyznačující se tím, že steroidový derivát obecného vzorce II

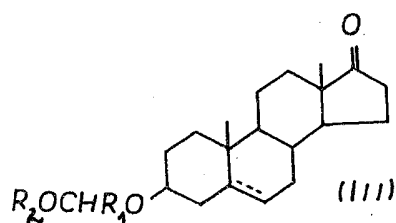


v němž

vazba má výše uvedený význam a R1 představuje vodíkový atom nebo alkyl s 1 až 4 uhlíkovými atomy,

R2 značí C1-C6-alkylovou skupinu, popřípadě přerušenu atomem kyslíku,

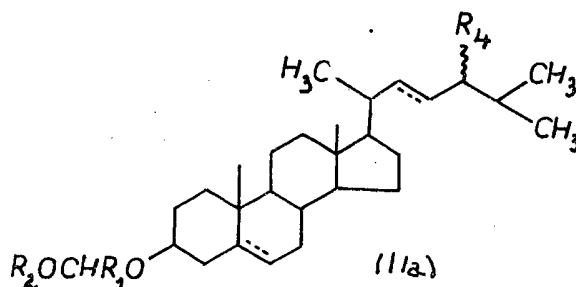
R3 značí C8-C10-uhlovodíkový steroidový zbytek, se fermentuje kulturou mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce steroidů, a takto vyrobený derivát androstan-17-onu obecného vzorce III



v němž

vazba, R1 a R2 mají výše uvedený význam, se štěpí v přítomnosti H⁺-iontů nebo Lewisových kyselin.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že steroidový derivát obecného vzorce IIa



v němž

vazba, R1 a R2 mají v bodě 1 uvedený význam a

R4 značí atom vodíku, methylovou nebo ethylovou skupinu, se fermentuje kulturou mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce steroidů, načež se provede druhý reakční stupeň.

3. Způsob podle bodů 1 až 2 vyznačující se tím, že k fermentaci se používá kultury mikroorganismů způsobilých k odbourávání postranního řetězce steroidů druhů Arthrobacter, Brevibacterium, Microbacterium, Protaminobacter, Bacillus, Nocardia, Streptomyces nebo zejména druhu Mycobacterium.