

URZĄD PATENTOWY w WARSZAWIE OPIS PATENTOWY

Nr 31694

Kl. 12 o, 25/01

Schering A. G., Berlin

Co 7 c 165/00

Sposób wytwarzania ketosteroidów

Zgłoszono 2 czerwca 1938

Udzielono 16 kwietnia 1943

Pierwszeństwo: 3 czerwca 1937 dla zastrz. 4, 8, 9; 30 grudnia 1937 dla zastrz. 1 — 3, 5 — 7, 10 — 13 (Niemcy)

Wynalazek niniejszy dotyczy sposobu wytwarzania ketosteroidów oraz związków wywodzących się od nich. Sposób według wynalazku niniejszego polega na tym, że steroidy, zawierające grupy wodorotlenowe, podatne do odwodornienia, poddaje się działaniu biochemicznych czynników odwodorniających.

Do przeprowadzania biochemicznego procesu odwodorniania można stosować pewne drobnoustroje, np. bakterie grupy acetobacter oraz grzybki pleśniowe albo enzymy, jakie można z tych drobnoustrojów otrzymać. Spośród bakterii grupy acetobakteru należy wymienić zwłaszcza

Bacterium (acetobacter) Pasteurianum, a także bakterie takie jak Micrococcus oblongus oraz bakterie sarbozy, należące do grupy Bacterium xylinum; spośród grzybków pleśniowych dają dobre wyniki pewne Aspergillaceae.

Szczególnie korzystnym okazało się stosowanie tak zwanych „wzmocnionych drożdży”, jakie można otrzymywać, np. według Wielanda (porównać „Annalen der Chemie” t. 492, str. 183 i następne), przez wstrząsanie z tlenem zawieszin drożdżowych w mieszaninie toluenu z wodą.

Do związków steroidowych, zawierających grupy wodorotlenowe, które służą

jako materiały wyjściowe do biochemicznego odwodorniania, należą np. sterole oraz kwasy żółciowe, zawierające grupy wodorotlenowe, podatne do odwodorniania, a także produkty rozkładu tych materiałów, związki typu kortyny oraz związki pochodzenia zwierzęcego i roślinnego, działające trująco na serce i zawierające charakterystyczny pierścień czterocłonowy oraz grupy wodorotlenowe, podatne do odwodorniania. Ponadto, jako materiały wyjściowe, można stosować także związki szeregu pregnanowego, zawierające grupy wodorotlenowe, podatne do odwodorniania, a także związki szeregu oestranu oraz androstanu, zawierające grupy wodorotlenowe, podatne do odwodorniania. Spośród ostatnio wyszczególnionych związków szczególnie odpowiednie są związki niezawierające łańcuchów bocznych, zwłaszcza np. oestratriol, oktahydrooestrony, a także nienasycone związki szeregu androstanowego, związki androstenowe, dehydroandrosteron i androstendiol.

Jeżeli w materiale wyjściowym oprócz grup przeznaczonych do odwodorniania znajdują się jeszcze inne grupy wodorotlenowe, mogące podlegać odwodornieniu, to można je w razie potrzeby zabezpieczyć przed działaniem biochemicznego środka odwodorniającego przekształcając je przejściowo, np. przez estryfikację, eteryfikację, chlorowcowanie lub podobne działanie w grupy, które można ponownie przeprowadzić w grupy wodorotlenowe.

Biochemiczne odwodornianie steroidów zawierających grupy wodorotlenowe, nadające się do odwodornienia, dobrze jest przeprowadzać w warunkach aerobowych albo w obecności akceptorów wodoru takich, jak błękit metylenowy, chinon lub związki podobne.

Sposób biochemicznego odwodorniania według wynalazku niniejszego daje szczególne korzyści w zastosowaniu do szeregu

androstenowego, jeżeli połączy się go z biochemicznym procesem uwodorniania, opisanym np. w *Berichte der deutsch. chem. Ges.* tom 70, str. 470 i następne. Tak więc np. w ten sposób w jednym zabiegu można z dehydroandrosteronu poprzez androstendion wytworzyć testosteron.

W tym celu dehydroandrosteron za pomocą „wzmocnionych drożdży” poddaje się najpierw biochemicznemu utlenianiu na androstendion, a następnie do mieszaniny powstałej po utlenieniu i zawierającej androstendion dodaje się substancji powodującej biochemiczną reakcję w kierunku redukcji. Odpowiednie do tego celu są dodatki np. węglowodanów, takie produkty rozkładu węglowodanów jak kwasy glicerynofosforowe i inne.

Następujące przykłady wyjaśniają sposób według wynalazku niniejszego.

Przykład I. Jako pożywkę dla bakterii stosuje się niezawierającą chmielu brzeczkę piwną (taką jak na piwo składowe), w której określa się zawartość maltozy i rozcieńcza wodą do stężenia wynoszącego około 4%. Następnie roztwór pożywkowy po dodaniu węglanu wapnia ogrzewa się w ciągu 20 minut w temperaturze 115° C w autoklawie, a następnie po oziębieniu przesącza. Klarowny roztwór pożywkowy, ogrzany ponownie pod ciśnieniem, wprowadza się następnie na duże płytki Petriego i zaszczenia *Bacterium Pasteurianum*. Po 3-dniowym staniu w temperaturze pokojowej do każdej płytki Petriego, zawierającej 300 cm³ roztworu pożywkowego, wprowadza się roztwór 300 mg androstendiolu w 15 cm³ alkoholu etylowego. Po staniu w ciągu 2-ch dni w temperaturze pokojowej wprowadza się ponownie taką samą ilość androstendiolu i pozostawia płytki w spokoju w ciągu następnych 2 dni w tej samej temperaturze. Następnie łączy się zawartości płytek Petriego i łąguje aż do wyczerpania eterem.

Roztwór eterowy przez przemycie uwalnia się od kwasu octowego, wytworzonego prawdopodobnie podczas fermentacji, i odparowuje do sucha. Pozostałość strąca się digitoniną, odsącza od osadu, przesącza uwalnia się od digitoniny i traktuje w metanolu octanem semikarbazydu. Semikarbazon wyosabnia się i rozszczepia w znany sposób. Po traktowaniu metanolem, zawierającym kwas, otrzymany keton przekrystalizowuje się z octanu etylowego. Otrzymany produkt jest testosteronem i wykazuje w etanolu kąt skręcania płaszczyzny polaryzacji $(\alpha)_D^{20} = +108^\circ$; punkt topnienia 152° C .

Przykład II. Przy zastosowaniu podłoża opisanego w przykładzie I do hodowli bakterii dodaje się alkoholowego roztworu produktu przeznaczonego do utleniania. W przypadku użycia podłoża w ilości równej 300 cm^3 stosuje się 200 mg dehydroandrosteronu. Po staniu w ciągu 3 dni mieszaninę reakcyjną łąguje się eterem, przemycia roztwór eterowy, suszy i odparowuje. Pozostałość w celu usunięcia niezmienionego dehydroandrosteronu traktuje się w ciągu 4 godzin w absolutnej pirydynie bezwodnikiem ftalowym, mieszaninę reakcyjną wylewa się do wody, łąguje eterem i usuwa pirydynę przez przemycanie wodą zawierającą kwas solny. Następnie za pomocą ługów potasowcowych wydziela się kwaśny eter ftalowy dehydroandrosteronu i po odparowaniu roztworu eterowego otrzymuje się produkt krystalizacji, z którego po traktowaniu metanolem, zawierającym kwas, i po przekrystalizowaniu z heksanu otrzymuje się androstendion o kącie skręcania $(\alpha)_D^{20} = +198^\circ$ (w CHCl_3) oraz o punkcie topnienia 173° C .

Przykład III. Do 300 cm^3 zawiesiny *Bacterium Pasteurianum*, wytworzonej według przykładu I, wprowadza się 300

mg 17-jednopropionianu androstendiolu (o punkcie topnienia 146° C , $(\alpha)_D^{20} = -62^\circ$ w $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) w roztworze etanolowym. Po staniu w ciągu 4 dni w temperaturze pokojowej mieszaninę reakcyjną przerabia się, jak opisano w przykładzie II, i usuwa niezmieniony jednopropionian jako kwaśny ester kwasu ftalowego. Propionian testosteronu, pozostały po izomeryzacji, przekrystalizowuje się następnie z heksanu i otrzymuje związek o punkcie topnienia 121° C , $(\alpha)_D^{20} = +87^\circ$ (w $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Przykład IV. W jednym litrze roztworu pożywkowego, zawierającego 1% peptonu, $0,2\%$ dwufosforanu amonowego, $0,1\%$ dwufosforanu potasowego oraz $0,025\%$ fosforanu magnezowego, hoduje się bakterie sarbozy. Do hodowli tej dodaje się porcjami 10 cm^3 dwuprocentowego roztworu cholesterolu w alkoholu. Po staniu w ciągu pewnego czasu mieszaninę reakcyjną łąguje się eterem. Roztwór eterowy przemycia się wodą, uwalnia od wody i odparowuje do sucha. Następnie pozostałość rozpuszcza się w metanolu i traktuje octanem semikarbazydu. Strąca się semikarbazon cholestenonu, który odsącza się. Po rozszczepieniu w znany sposób otrzymuje się cholestenon o punkcie topnienia $80 - 81^\circ \text{ C}$, $(\alpha)_D^{20} = +87^\circ$ w chloroformie.

Przykład V. 8 g drożdży (fermentu kłaczkowego Milana) zawieszają się w 30 cm^3 wody i traktuje 10 cm^3 roztworu $1/5n \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ oraz 10 cm^3 $1/5n$ roztworu KH_2PO_4 . Zawiesinę tę wstrząsa się w ciągu 20 godzin w atmosferze tlenowej w temperaturze 32° C , następnie dodaje się 190 mg androstendiolu, zawieszonego w 30 cm^3 wody, i ostatecznie wstrząsa się mieszaninę tę w ciągu 47 godzin w atmosferze tlenowej. Następnie mieszaninę reakcyjną łąguje się eterem, roztwór etero-

wy przemywa się wodą, ługiem sodowym, jednonormalnym kwasem solnym i znowu wodą. Po wysuszeniu ponad siarczanem sodu roztwór eterowy odparowuje się do sucha.

Pozostałość rozpuszcza się w 30 cm³ alkoholu, ogrzewa się z 3 g lodowatego kwasu octowego oraz 1,5 g chlorku acetyldrazzydopirydonowego (Girard, Helv. Chim. acta 19, str. 1095, 1936) i ogrzewa do wrzenia w ciągu godziny pod chłodnicą zwrotną. Po oziębieniu całą masę wylewa się do 140 cm³ wody, zawierającej 60 g lodu oraz ilość wodorotlenku sodowego, potrzebną do zubożenia 2,7 g lodowatego kwasu octowego. Następnie całą masę wstrząsa się trzykrotnie z eterem w celu usunięcia składnika niezawierającego grupy ketonowej.

Do wodnego roztworu dodaje się 20 g 50%-owego kwasu siarkowego, przy czym powstaje męt. Roztwór pozostawia się w spokoju w ciągu godziny, następnie ługuje się go trzykrotnie eterem, przy czym wytworzony androstendion przechodzi do roztworu, wówczas roztwór eterowy przemywa się wodą, suszy ponad siarczanem sodu i eter odparowuje. Jeżeli pozostałość ponownie potraktuje się małą ilością eteru, to można otrzymać produkt krystaliczny.

Po przekrystalizowaniu pozostałości z rozcieńczonego acetonu otrzymuje się substancję o punkcie topnienia 168 — 169° C, która jest takim samym związkiem jak androstendion.

Przykład VI. 8 g drożdży (fermentu kłaczkowego Milana) zawiesza się w 30 cm³ wody, traktuje 10 cm³ 1/5n roztworu Na₂HPO₄ i 10 cm³ 1/5n roztworu KH₂PO₄ i wstrząsa w ciągu 20 godzin w atmosferze tlenowej w temperaturze 32° C. Następnie wprowadza się 200 mg dehydroandrosteronu zawieszonego w 30 cm³ wody i wstrząsa mieszaninę reakcyjną w ciągu 48 godzin w atmosferze tlenowej.

Następnie wprowadza się roztwór 25 g cukru inwertowanego w 150 cm³ wody i pozostawia się mieszaninę reakcyjną w spokoju w naczyniu fermentacyjnym w ciągu 3 dni w temperaturze pokojowej.

Następnie mieszaninę reakcyjną ługuje się eterem i roztwór eterowy przemywa wodą, ługiem sodowym, jednonormalnym kwasem solnym i znowu wodą. Po wysuszeniu ponad siarczanem sodu odparowuje się roztwór eterowy. Pozostałość po odparowaniu przekrystalizowuje się z acetonu i eteru naftowego. Otrzymuje się 120 mg substancji o punkcie topnienia 151° C, która jest takim samym związkiem jak testosteron.

Przykład VII. Do 60 cm³ wyjałowionej pożywki drożdżowej wprowadza się 10 cm³ 1/5n Na₂HPO₄ i 10 cm³ 1/5n KH₂PO₄ jako substancje buforowe i zadaje 200 g mialko sproszkowanego metyloandrostendiolu, po czym pożywkę tę wyjaławia się w ciągu godziny w kąpieli wodnej. Po ostygnięciu zaszczepia się ją kilkoma kroplami zawiesiny świeżo wyhodowanych bakterii. Mieszaninę reakcyjną wstrząsa się następnie w temperaturze 32° C w atmosferze tlenowej w ciągu 5 dni, po czym zawiesinę tę przesącza się. Pozostałość, pozostająca na sączku, rozpuszcza się w acetonie i roztwór acetonowy oddziela się od osadu bakteryjnego przez sączenie. Rozdzielanie mieszaniny, pozostałej po odparowaniu acetonu, na składniki ketonowe i nieketonowe uskutecznia się np. za pomocą odczynnika Girarda.

W tym celu pozostałość rozpuszcza się w 30 cm³ alkoholu absolutnego, dodaje 3 g lodowatego kwasu octowego oraz 1,5 g odczynnika Girarda i gotuje w ciągu godziny pod chłodnicą zwrotną. Po ostygnięciu zlewa się mieszaninę reakcyjną do 200 cm³ wody, zawierającej ilość NaOH, potrzebną do zubożenia 2,7 g kwasu octowego. Następnie mieszaninę tę ługuje

się trzykrotnie eterem i przemywa roztwór eterowy, niezawierający składników ketonowych, wodą, po czym suszy ponad siarczanem sodu i eter odparowuje. Przez przekrystalizowanie z rozcieńczonego acetonu otrzymuje się 20 mg niezmiennego metyloandrostendiolu.

Wodny roztwór produktu otrzymanego z odczynnikami Girarda zadaje się 10 g stężonego H_2SO_4 i po 2 godzinach ponownie łąguje eterem. Roztwór eterowy przemywa się wodą, suszy za pomocą siarczanu sodu i eter odparowuje. Z pozostałości po przekrystalizowaniu z rozcieńczonego metanolu i rozcieńczonego acetonu otrzymuje się 150 mg substancji o punkcie topnienia $163 - 164^{\circ} C$ (bez poprawki). Mieszanina tego produktu z metylotestosteronem nie wykazuje obniżenia punktu topnienia.

Na podstawie sposobu według wynalazku niniejszego można w sposób stosunkowo prosty i ze stosunkowo dużą wydajnością wytwarzać cenne ketosteroidy, które można było dotychczas otrzymywać jedynie metodami stosunkowo uciążliwymi albo też jedynie, ze stosunkowo małą wydajnością.

Zastrzeżenia patentowe.

1. Sposób wytwarzania ketosteroidów, znamienny tym, że steroidy zawierające grupy wodorotlenowe, zdadne do odwodornienia, poddaje się działaniu biochemicznych czynników odwodorniających.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że jako materiały wyjściowe stosuje się związki steroidowe, zawierające grupy wodorotlenowe, zdadne do odwodornienia, i niezawierające łańcuchów bocznych.

3. Sposób według zastrz. 1 lub 2, znamienny tym, że jako materiały wyjściowe

stosuje się nienasycone związki szeregu androstenowego.

4. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamienny tym, że jako materiał wyjściowy stosuje się androstendiol.

5. Sposób według zastrz. 1 — 4, znamienny tym, że grupy wodorotlenowe, zawarte w materiale wyjściowym i mogące podlegać odwodornieniu, zabezpiecza się, oprócz grupy albo grup wodorotlenowych, przeznaczonych do odwodornienia, przekształcając je przejściowo, np. za pomocą estryfikacji, eteryfikacji lub chlorowcowania, w grupy, które można ponownie przetworzyć w grupy wodorotlenowe.

6. Sposób według zastrz. 1 — 3, znamienny tym, że jako materiał wyjściowy stosuje się dehydroandrosteron.

7. Sposób według zastrz. 1 — 6, znamienny tym, że biochemiczne odwodornianie związków steroidowych, zawierających grupy wodorotlenowe zdadne do odwodorniania, przeprowadza się w warunkach aerobowych.

8. Sposób według zastrz. 1 — 7, znamienny tym, że biochemiczne odwodornianie związków steroidowych, zawierających grupy wodorotlenowe, przeprowadza się za pomocą bakterii należących do grupy acetobakter.

9. Sposób według zastrz. 8, znamienny tym, że wspomniane biochemiczne odwodornianie przeprowadza się za pomocą *Bacterium (acetobacter) Pasteurianum*.

10. Sposób według zastrz. 1 — 7, znamienny tym, że biochemiczne odwodornianie przeprowadza się za pomocą „wzmocnionych drożdży”.

11. Sposób według zastrz. 1 — 10, znamienny tym, że w kombinacji z odwodornianiem biochemicznym przeprowadza się biochemiczne uwodornianie.

12. Sposób według zastrz. 11, znamienny tym, że biochemiczne uwodornianie przeprowadza się tak, iż do mieszaniny

reakcyjnej, otrzymywanej przez biochemiczne odwodornianie za pomocą „wzmocnionych drożdży”, dodaje się substancji powodującej biochemiczne uwodornianie.

13. Sposób według zastrz. 12, znamien-

ny tym, że jako taką substancję stosuje się węglowodan.

S c h e r i n g A. G.

Zastępca: M. Skrzypkowski

rzecznik patentowy