

(19) HU

MAGYAR  
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

**B**

(11)

**192668**

Bejelentés napja: (22) 1985.02.01. (21) (405/85)

Elsőbbsége: (33) DE (32) 1984.02.02.  
(31) (P 34 03 862.0)

Közzététel napja: (41) (42) 1985.10.28.

Megjelent: (45) 1988.08.29.

Nemzetközi  
osztályozás:  
(51) NSZO  
C 12 P 33/06

Feltaláló: (72)  
dr. Petzoldt Karl  
Nyugat-Berlin

Szabadalmas: (73)  
Schering AG., Nyugat-Berlin,  
Bergkamen, ez utóbbi DE

## (54) ELJÁRÁS 15 $\alpha$ -HIDROXI-4-ANDROSZTÉN-3,17-DION ELŐÁLLÍTÁSÁRA

1

### (57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion mikrobiológiai előállítására.

A fenti vegyületet úgy állítják elő, hogy 4-androsztén-3,17-diont 15 $\alpha$ -helyzetben *Penicillium stoloniferum*, *Penicillium melinii* vagy *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* mikroorganizmus fajokkal fermentálva hidroxileznek.

A találmány szerinti vegyület 15 $\beta$ , 16 $\beta$ -metilén-származékok előállításához használható kiindulási anyagként.

A találmány tárgya eljárás  $15\alpha$ -hidrox-4-androsztén-3,17-dion előállítására 4-androsztén-3,17-dion mikrobiológiai hidroxilezésével.

Régóta ismeretes, hogy számos mikroorganizmus rendelkezik azzal a képességgel, hogy szteroidokat a  $15\alpha$ -helyzetben hidroxilezzen. (2 889 255 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). A 4-androsztén-3,17-diont is már többféleképp hidroxilezték a  $15\alpha$ -helyzetben. (W. Charney and H. L. Herzog: *Microbial Transformations of Steroids*, Academic Press New York, 1967, 107-108. oldal). Amennyire az irodalomból kideríthető, a legjobb eredményeket akkor érték el, ha a fermentációhoz a *Fusarium lini* (CBS) (*Helvetica Chimica Acta* 45, 1963, 889 f) vagy *Penicillium spec* (ATCC 11 598) (*Endocrinology* 83, 1968, 349) fajok mikroorganizmusait használták. A  $15\alpha$ -hidrox-4-androsztén-3,17-dion ipari előállítására ezek az ismert eljárások túl költségesek, mivel ezeknél nem egyszer 100 mg 4-androsztén-3,17-dion átalakításához egy liter fermentáló és egy nap fermentációs idő szükséges.

A 4 036 695 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásból másrészt ismeretes, hogy a 4-androsztén-3,17-dionhoz képest izomer 18-metil-4-ösztén-3,17-dion nagy szubsztrátkoncentrációknál hidroxilezhető a  $15\alpha$ -helyzetben, ha a fermentációhoz a *Penicillium raistrickii* (ATCC 10 490) fajhoz tartozó mikroorganizmusokat használunk. A 4-androsztén-3,17-dion fermentációja ezzel a mikroorganizmussal meglepő módon rendkívül rossz eredménnyel megy.

Felfedeztük, hogy a 4-androsztén-3,17-dion a  $15\alpha$ -helyzetben nagyon jól hidroxilezhető, ha a fermentáláshoz a *Penicillium stoloniferum* (CBS P 102), *Penicillium melinii* (CBS P 30) vagy *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (ATCC 7808) fajok mikroorganizmusait használjuk.

Ezt a fermentációt olyan körülmények között végezzük, amilyeneket rendszerint szteroidok gombatenyészetekkel végzett mikrobiológiai hidroxilezése során alkalmaznak. Így először is általánosan szokott előkészületekben megtörténik a legkedvezőbb fermentáció körülmények, mint például a legkedvezőbb táptalaj, a megfelelő szubsztrátoldósszer vagy szubsztrátszuszpendálószer, a szubsztrátkoncentráció, a technikai körülmények, így hőmérséklet, levegőztetés, a pH-érték és a tenyésztés optimális idejének, a szubsztrát hozzáadásának és a mikroorganizmus enzimével való szubsztrátérinkezésnek a kiválasztása analitikailag, különösen vékonyréteg-kromatográfián.

Célszerű a szubsztrátot a táptalaj literére számítva körülbelül 1000-tól 5000 mg-ig terjedő koncentrációban alkalmazni. A pH-értéket előnyösen 5-től 7-ig terjedő tartományban tartjuk. A tenyésztési hőmérséklet 20-tól 40 °C-ig, előnyösen 25-től 35 °C-ig terjedő

tartományban van. Levegőztetés céljából a tenyésztőedénybe literenként és percenként előnyösen 0,5-5 liter levegőt vezetünk be. A szubsztrát átalakulását célszerűen vékonyréteg-kromatográfiás analízissel követjük. A fermentációs idő körülbelül 30-90 óra.

A kapott  $15\alpha$ -hidrox-4-androsztén-3,17-dion értékes közttitermék, amely például  $15\beta,16\beta$ -metilén-4-androsztén-3,17-dion (3 470 160 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) vagy  $15\beta,16\beta$ -metilén-3-oxo-17 $\alpha$ -pregna-4,6-dién-21,17-karbolakton (4 129 564 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) előállítására alkalmas.

A következő példák a találmány szerinti eljárás részletesebb szemléltetésére és a termék alkalmazásának bemutatására szolgálnak.

A) Példák a találmány szerinti eljárás szemléltetésére:

#### 1. példa

Egy 2 literes Erlenmeyer lombikban 500 ml táptalajt, amely 3,0%, glükózt, 1,0% kukoricalekvárt, 0,2% nátrium-nitrátot, 0,1% kálium-dihidrogén-foszfátot, 0,2% dikálium-hidrogén-foszfátot, 0,05% magnézium-szulfát-heptahidrátot, 0,002% vas(II)-szulfát-heptahidrátot és 0,05% kálium-kloridot tartalmaz, és autoklávban 120 °C-on 30 percig sterilizáljuk, beoltunk *Penicillium stoloniferum* (CBS P 102) törzs ferde agaros tenyésztével, és 28 °C-on rázóasztalon 2,5 napig ráztatjuk.

A tenyésztet 250 ml-ével beoltunk egy 20 literes előfermentort, amely 15 liter 121 °C-on és 1,1 bar túlnyomáson 60 percig sterilizált, 1,0% kukoricalekvárt, 1,0% keményítőcukrot, 1,0% szójaport, 0,2% nátrium-nitrátot, 0,1% kálium-dihidrogén-foszfátot, 0,2% dikálium-hidrogén-foszfátot, 0,05% magnézium-szulfát-heptahidrátot, 0,002% vas(II)-szulfát-heptahidrátot és 0,05% kálium-kloridot tartalmazó táptalajjal van töltve.

Habzágatlószerként Silicon SH-t hozzáadva 29 °C-on és 0,7 bar túlnyomáson 15 liter/perc levegőztetéssel és 220 ford./perc keverés közben 24 óra hosszat fermentálunk.

Utána ebből a tenyésztetből steril körülmények között 0,9 liter kevesünk, és ezzel beoltunk egy 20 literes főfermentort, amely 14 liter, az előfermentoréval azonos összetételű és ahhoz hasonlóan sterilizált táptalajjal van töltve. Az előfermentációhoz hasonló körülmények között végzett 12 órás tenyésztési szakasz után hozzáadjuk 22,5 g 4-androsztén-3,17-dion 200 ml dimetil-formammal készített és sterilre szűrt oldatát, és tovább keverjük és levegőztetjük. A fermentálást 60 órás tenyésztési idő után 3 x 10 liter metil-izobutil-ketonnal extraháljuk, az extraktumokat egyesítjük, és kúszófilmes bepárlón azonnal betöményítjük, végül 50 °C fürdőhőmérsékleten vákuumban rotációs bepárlón szárászva bepároljuk. A maradékot a

habzásátlószer eltávolítása céljából hexánnal mossuk, végül metil-izobutil-ketonból kristályosítjuk. Szűrés és szárítás után 18,4 g 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-diont kapunk, amelynek olvadáspontja 193-196 °C.

### 2. példa

Az 1. példa körülményei között a Penicillium melinii (CBS P 30) törzs alkalmazásával 15 g 4-androsztén-3,17-diont 75 órás fermentálással 11,7 g 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-dionná alakítunk, amelynek olvadáspontja 191-194 °C.

### 3. példa

Az 1. példa körülményei között a Fusarium oxysporum f. vasinfectum ATCC 7808 törzs alkalmazásával 22,5 g 4-androsztén-3,17-diont 24 órás fermentálással 19,36 g 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-dionná alakítunk, amelynek olvadáspontja 197 °C.

B) Példa a 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion alkalmazására:

a) 40 g 15 $\alpha$ -hidroxi-4-androsztén-3,17-dion 200 ml piridinnel készített oldatát jeges fürdőben lehűtjük, és utána cseppenként hozzáadunk 25,7 ml benzoi-kloridot. A reakcióelegyet jeges fürdőben 30 percig keverjük, majd 3,2 ml vízzel elegyítjük és további 30 percig keverjük. A reakcióelegyet utána keverés közben jeges vízbe öntjük, a kivált csapadékot kiszűrjük, és vízzel mossuk. Ekkor a kivált termék kezd olajszerű lenni, ezért diklór-metánnal oldjuk. A szerves fázist vízzel mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk, és bepároljuk. így 53 g nyers 15 $\alpha$ -benzoi-4-androsztén-3,17-diont kapunk olajként.

b) 101,5 g trimetil-szulfonórium-jodidot 1 liter dimetil-szulfoxidban 17,88 g nátrium-hidroxiddal szobahőmérsékleten 1,5 óra hosszáig erősen keverünk, minek során a nátrium-hidroxid nagyrészt oldatba megy. Argongáz alatt és vízűtés közben 53 g 15 $\alpha$ -benzoi-4-androsztén-3,17-diont oldunk 200 ml dimetil-szulfoxidban, az oldatot 5 perc alatt hozzáadjuk a reakcióelegyhez, amelyet végül még 1,5 óra hosszat keverünk. A reakcióelegyet utána körülbelül 2 kg nátrium-klorid hozzáadása közben keverés mellett 10-szeres mennyiségű jeges vízbe öntjük. A kivált csapadékot vízzel mossuk, és vákuumban 50 °C-on szárítjuk. így 31 g nyers 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3,17-diont kapunk. Az egész vizes fázist dietil-éterrel extraháljuk, az éteres fázist telített nátrium-klorid oldattal mossuk, nátrium-szulfáton szárítjuk, és bepároljuk. így még 6 g nyers 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3,17-diont kapunk. A csapadékot és az éteres extraktumot egyesítjük, és szilikagélén aceton/hexán gra-

dienssel (20 liter, 0-25% aceton) kromatografáljuk. így 22,7 g 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3,17-diont eluálunk. A diizopropil-éterből átkristályosított minta 185-186,5 °C-on olvad.

c) 22,7 g 15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3,17-dion 397 ml metil-pirrolidonnal készített oldatát jeges fürdőben lehűtjük, argongáz alatt 90,8 g kálium-metilátot adunk hozzá, és 10 percig keverjük. Utána 5 perc alatt hozzácsepegtetünk 34,1 ml propargialkoholt. A reakcióelegyet további 15 percig keverjük, és keverés közben 10-szeres mennyiségű jeges vízbe öntjük. Az elegyet híg kénsavoldattal semlegesítjük, az esetleg felesleget főlős nátrium-hidrogén-karbonáttal távolítjuk el, és nátrium-kloriddal telítjük. A kivált csapadékot kiszűrjük, vízzel mossuk, és vákuumban 60 °C-on szárítjuk. így 30,2 g anyagot kapunk, amelyet etil-acetáttal aktivszénnel derítve átkristályosítunk. A kapott 18,6 g termék 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(3-hidroxi-1-propinil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3-on és 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(3-hidroxi-1-propinil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-5-androsztén-3-on 224,6 °C olvadáspontú keveréke.

18,6 g ilyen keveréket oldunk 172 ml tetrahidrofuranban és 172 ml metanolban, majd argongáz alatt 8,6 ml 2 n nátrium-hidroxid oldattal elegyítjük, és szobahőmérsékleten 15 percig keverjük. A reakcióelegyet utána keverés közben 10-szeres mennyiségű jeges vízbe öntjük, amely 10 ml 2 n kénsavoldatot tartalmaz. Telítjük nátrium-kloriddal, a kivált csapadékot kiszűrjük, és vízzel mossuk. A vákuumban 60 °C-on végzett szárítás után 18,2 g 17 $\beta$ -hidroxi-(3-hidroxi-1-propinil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3-ont kapunk. Olvadáspont: 222,5 °C.

d) 18,2 g 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(3-hidroxi-1-propinil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3-ont 84 ml tetrahidrofuran és 84 ml metanol elegyében 5,6 g trisz(trifenil-foszfín)-ródiom(I)-klorid hozzáadása után szobahőmérsékleten és normál nyomáson hidrogéngázzal telítésig hidrogénezünk. Reakcióidő: 5 óra.

Az anyag a hidrogénezés során tökéletesen oldatba megy. A hidrogénezett oldatot utána vákuumban szárazra pároljuk. A kapott 18,0 g nyers 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(3-hidroxi-propil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3-ont közvetlenül felhasználjuk a következő reakcióhoz.

e) A 18 g 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -(3-hidroxi-propil)-15 $\beta$ ,16 $\beta$ -metilén-4-androsztén-3-on nyerstermék 238 ml piridinnel készített oldatát 47,6 ml króm-trioxid 118 ml vízzel és 119 ml piridinnel készített oldatával elegyítjük, és 70 °C-on 6 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet utána 4 liter etil-acetáttal kevertetjük. Az elegyet dekantáljuk a kivált krómsókról, és az etil-acetátos fázist vízzel mossuk. A szárítás és bepárlás után a piridintartalmú nyersterméket szilikagélén aceton/hexán grádienssel (20 liter, 0-40% aceton) kromatografáljuk. így 11,3 g anyagot

kapunk, amelyből diizopropil-éterrel való eldörzsölés után 9,72 g  $15\beta,16\beta$ -metilén-3-oxo- $17\alpha$ -pregn-4-én-21,17-karbolaktont nyerünk, amelynek olvadáspontja 179-180 °C.

f) 150 g  $15\beta,16\beta$ -metilén-3-oxo- $17\alpha$ -pregn-4-én-21,17-karbolakton 1,5 liter dioxánnal készített oldatát 150 ml trietil-ortoformiáttal és 150 ml dioxán/kénsav molekulavegyülettel elegyítünk, és szobahőmérsékleten 1 óra hosszat keverjük. A reakcióelegyet 13,5 ml piridinnel elegyítjük, 8,1 liter diklór-metánnal hígítjuk, vízzel mossuk, magnézium-szulfáton szárítjuk, és vákuumban bepároljuk. Ily módon 160 g kristályos 3-etoxi- $15\beta,16\beta$ -metilén- $17\alpha$ -pregna-3,5-dién-21,17-karbolaktont kapunk, amely a következő reakcióban további tisztítás nélkül felhasználható.

g) 160 g 3-etoxi- $15\beta,16\beta$ -metilén- $17\alpha$ -pregna-3,5-dién-21,17-karbolakton 6 liter acetonnal készített szuszpenzióját szobahőmérsékleten 26,5 ml piridinnel, 375 ml vízzel és 117,6 g nátrium-acetáttal elegyítjük, és 0 °C-ra hűtjük. Apránként hozzáadunk 87,1 g N-bróm-szukcinimidet, és 0 °C-on 30 percig keverjük. Utána vákuumban 20 °C fürdőhőmérsékleten bepároljuk. A kivált szilárd anyagot 500 ml diklór-metánnal oldjuk, 8,8 liter dietil-éterrel hígítjuk és 2 x 2,2 liter vízzel mossuk. Az oldatot magnézium-szulfáttal való szárítás után vákuumban bepároljuk. így 174 g 6-bróm- $15\beta,16\beta$ -metilén-

-3-oxo- $17\alpha$ -pregn-4-én-21,17-karbolaktont kapunk olajszerű nyersteammékként, amely további tisztítás nélkül felhasználható.

201 g 6-bróm- $15\beta,16\beta$ -metilén-3-oxo- $17\alpha$ -pregn-4-én-21,17-karbolakton 1,975 liter dimetil-formamiddal készített oldatát 100 °C-on 102,3 g lítium-bromiddal és 86,5 g lítium-karbonáttal 1,5 óra hosszat keverjük. A lehűtés után 18 liter jeges vízbe öntjük, a kivált csapadékot kiszűrjük, vízzel többször mossuk, és a mardékot éjszakán keresztül szárítószekrényben szárítjuk. A kapott 180 g nyersteamméket nyomásálló oszlopon finom szilikagélen diklór-metán: acetón (100 : 0-98,2) eleggyel eluálva tisztítjuk.

így 106 g  $15\beta,16\beta$ -metilén-3-oxo- $17\alpha$ -pregna-4,6-dién-21,17-karbolaktont kapunk olajként, amely acetón/diizopropil-éter elegyből történő átkristályosítás után 179,5 °C-on olvad.

#### SZABADALMI IGÉNYPONT

1. Eljárás  $15\alpha$ -hidrox-4-androsztén-3,17-dion előállítására 4-androsztén-3,17-dion mikrobiológiai hidroxilezésével, azzal jellemezve, hogy a fermentációhoz a *Penicillium stoloniferum* (CBS P 102), *Penicillium melinii* (CBS P 30) vagy *Fusarium oxysporum* f. *vasinfectum* (ATCC 7808) mikroorganizmus fajt használjuk.

Rajz nélkül

A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója

88.555.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató