



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 22.06.76 (P. 190644)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 16.01.78

Opis patentowy opublikowano: 16.07.1979

CZYTELNIJA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.²
C07J 61/00

Twórcy wynalazku: Jadwiga Dmochowska-Gładysz, Andrzej Nespiak,
Antoni Siewiński

Uprawniony z patentu: Akademia Rolnicza, Wrocław (Polska)

Sposób otrzymywania A-nor-steroidów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania na drodze mikrobiologicznej 4 α -chloro-3 β -hydroksy-chlorohydrzyn z szeregu androstanu oraz ich przekształcanie chemiczne do A-nor-steroidów.

Znane są nieliczne mikrobiologiczne metody otrzymywania chlorohydrzyn steroidowych w pierścieniu A, lecz chlorohydryny te nie stanowią bezpośrednich substratów do syntezy A-nor-steroidów.

Jednym ze znanych przykładów jest transformowanie mikrobiologiczne 4 α -chloro-17 α -metylo-1,4-androstandien-17 β -ol-3-onu do chlorohydryny zawierającej jednakże niezredukowane wiązanie 1,2 (K. Schubert i inni, -Journal of Steroid Biochemistry t. 1/1970, s. 229), które zredukowano dalej chemicznie. Otrzymanego produktu nie próbowano przekształcać dalej w kierunku A-nor-steroidów.

Również istnieje szereg publikacji, w których omawia się stereochemię kontrakcji pierścienia zarówno w związkach niesteroidowych (M. Mousseron i inni, Comptes rendus t. 246/1958 s. 2200) jak i w steroidach (F. Winternitz i inni, Bulletin de la Societe Chimique de France 1960, s. 1460; A. Crates de Paulet i inni, Bulletin de la Societe Chimique de France 1960, s. 500). Wśród tych ostatnich opisano kontrakcję w pierścieniu A, prowadzącą do A-nor-steroidów, lecz z innymi grupami funkcyjnymi i w innym ich położeniu w tym pierścieniu.

W opisanej w sposobie wg wynalazku metodzie zastosowany jest do otrzymywania chlorohydrzyn

2

nie używany dla takich przekształceń mikroorganizm. Powstałe w sposobie wg wynalazku w przekształceniu mikrobiologicznym chlorohydryny zostają bezpośrednio poddane kontrakcji pierścienia A metodą chemiczną stosowaną dla nich do innych rodzajów reakcji.

Zgodnie z istotą wynalazku uzyskane na drodze reakcji mikrobiologicznej ze szczepem z gatunku Rhodotorula mucilaginosa odpowiednio 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β -ol-17-on z 4-chloro-androsten-4-3, 17-dionu i 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β , 17 β -diol z 4 α -chloro-androsten-4-17 β -ol-3-onu ogrzewane z metanolem w roztworze wodorotlenku potasu, na skutek kontrakcji w pierścieniu A, dają właściwe A-nor-steroidy.

Oba uzyskane sposobem według wynalazku A-nor-steroidy należą do grupy związków, które zgodnie z literaturą fachową wykazują aktywność hormonalną w zakresie działania androgennego, nabolicznego lub antyandrogennego.

Sposób otrzymywania A-nor-steroidów według wynalazku uwidocznił na rysunku w postaci przebiegu transformacji mikrobiologicznej obu substratów (1,2) prowadzący do chlorohydrzyn (3,4), które w przekształceniu z roztworem wodorotlenku potasu dają odpowiednio A-nor-steroidy (5,6).

Sposób według wynalazku dotyczący etapu transformacji mikrobiologicznej polega na wprowadzeniu do 3—5 dniowej wodnej kultury szczepu w gatunku Rhodotorula mucilaginosa 4-chloro-andro-

sten-4-3, 17-dionu (1) lub 4-chloro-androsten-4-17 β -ol-3-onu (2). Czynniki transformujące oba materiały wyjściowe stanowi układ enzymatyczny zawarty w żywych komórkach *Rhodotorula mucilaginosa*.

Wodną kulturę szczepu *Rhodotorula mucilaginosa* stanowi kultura rosnąca na pożywce sporządzonej przez rozpuszczenie w 1 litrze wody 20 g wyciągu słodowego o zawartości 72% maltozy, 2% lektyny, 4% substancji białkowych, 1% soli mineralnych i 18% wody. Samą fermentację prowadzi się przez okres 10–20 dni od momentu dodania substratu w temperaturze 22–28°C i przy pH = 4,5–6,0. Zarówno przygotowanie kultury mikroorganizmu jak i następująca po nim fermentacja dodanego substratu przebiega przy wstrząsaniu reagujących mieszanin. Uzyskaną w wyniku fermentacji mieszaninę poddaje się ekstrakcji produktów chloroformem, a następnie rozdziela chromatograficznie.

W drugim etapie postępowania obie chlorohydryny (3) lub (4) poddaje się kontrakcji w pierścieniu A w warunkach zasadowych otrzymując odpowiednio A-nor-steroidy (5) i (6).

W przypadku przekształcania chlorohydryny (3) ogrzewa się ją z 5% roztworem metanolem wodorotlenku potasu i jako główny produkt otrzymany w wyniku kontrakcji powstaje 3 α -formylo-A-nor-5 α -androstan-17-on (5).

Natomiast w drugim przypadku kontrakcja związku (4) poprzedzona jest oddzieleniem poprzez acetylację i chromatografię z mieszaniny fermentacyjnej materiału wyjściowego (2). Powstały w wyniku takiego postępowania octan chlorohydryny (4) ogrzewa się z 5% roztworem metanolem wodorotlenku potasu i w wyniku otrzymuje 3 α -formylo-A-nor-5 α -androstan-17 β -ol (6). Budowę obu chlorohydryn (3) jak i obu A-nor-steroidów (5, 6) udowadniają jednoznacznie dane spektralne i reakcje chemiczne.

Przykład I. W dwóch kolbach o pojemności 2 l każda zawierających po 1 l sterylnej pożywki maltozowej, otrzymanej przez rozpuszczenie ekstraktu słodowego o składzie wyżej podanym zaszczenia się opisany szczep *Rhodotorula mucilaginosa*. Po 4 dniach wzrostu szczepu przy wstrząsaniu w temperaturze 27°C i przy pH = 5 dodaje się do każdej kolby po 110 mg 4-chloro-androsten-4-3,17-dionu (1) rozpuszczonego w 1,5 ml acetonu. Fermentację prowadzi się przy wstrząsaniu w okresie 14 dni. Roztwór metaboliczny zawierający zawieszoną zarodników wstrząsa się dodatkowo przez 1 godzinę po dodaniu do każdej kolby 200 ml metanolu, a następnie połączoną zawartość obu kolb ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem. Po osuszeniu roztworu siarczanem sodu i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskuje się około 220 mg mieszaniny produktów fermentacji. Otrzymaną mieszaninę chromatografuje się na żelu krzemionkowym eluentem benzen:metanol 10:1. Na tej drodze otrzymuje się 62 mg materiału wyjściowego (1), 115 mg chlorohydryny (3) i 39 mg mieszaniny dalszych produktów, wśród których jeden jest chlorohydryną (4).

Chlorohydryna (3): 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β -ol-17-on: Krystalizuje z acetonu-eteru naftowego tt.

189–191°C [α]_D²⁰ + 64 (CHCl₃ 0,9); JR: ν CCl₄ 3595, 1745 cm⁻¹; NMR: δ = 3,80 ppm, Kwintet I = 12 Hz, 16 Hz, 6 Hz 1 proton przy C–3; δ = 3,7 ppm, multiplet — 1 proton przy C–4; δ = 1,2 i 1,21 ppm — (protony na C–18 i C–19), MS: M_{9e} 324.

Otrzymywanie A-nor-steroidu (5).

25 mg chlorohydryny (3) ogrzewa się przez 10 godzin z 20 ml 5% roztworu metanolewgo KOH pod chłodnicą zwrotną. W wyniku reakcji otrzymuje się produkty, które chromatografuje się na żelu krzemionkowym (5 g) eluentem benzen:octan etylu 10:1 otrzymuje się w ten sposób 11 mg (44% wydajności) produktu (5) oraz 9 mg produktów bardziej polarnych.

A-nor-steroid (5): 3 α -formylo-A-nor-5 α -androstan-17-on: [α]_D²⁰ + 15 (CHCl₃ 0,5); JR: ν CCl₄ 2720, 1740, 1720 cm⁻¹; NMR: δ = 9,5 ppm (proton aldehydowy J = 3 Hz); δ = 0,8; 0,89 ppm (protony grup metylowych na C–18 i C–19).

Przykład II. Otrzymywanie octanu chlorohydryny (4). Transformację 550 mg 4-chloro-androsten-4-17 β -ol-3-onu (2) przeprowadza się w warunkach opisanych w przykładzie 1. Po ekstrakcji chloroformem uzyskuje się mieszaninę produktów, którą poddaje się acetylowaniu przez dodanie do niej 5 ml bezwodnika octowego i 7 ml pirydyny. Powstaje 700 mg produktów acetylowania, które chromatografuje się na 90 g żelu krzemionkowego eluentem benzen:octan etylu 100:5. W wyniku chromatografii otrzymuje się 280 mg mieszaniny zawierającej dwuocetan chlorohydryny (4) i tylko jeden z produktów ubocznych. Dalsza frakcja 330 mg stanowi głównie octan materiału wyjściowego (2).

Chlorohydrynie (4) przypisuje się strukturę 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β , 17 β -diolu.

Otrzymywanie A-nor-steroidu (6). 280 mg mieszaniny octanów zawierającej dwuocetan chlorohydryny (4) ogrzewa się przez 60 godzin z 30 ml 5% roztworu metanolewgo KOH. Po reakcji produkty wytrąca się wodą i chromatografuje na 30 g żelu krzemionkowego eluentem Benzen:octan etylu 10:1. W wyniku otrzymuje się 23 mg produktu (6), 160 mg niezmienionego w reakcji produktu fermentacji i 20 mg produktów bardziej polarnych.

A-nor-steroid (6) 3 α -formylo-A-nor-5 α -androstan-17 β -ol; tt. 122–135°C [α]_D²⁰ + 22° (CHCl₃ 0,9); JR: ν CCl₄ 3630, 2720, 1725 cm⁻¹; NMR: δ = 9,5 ppm, J = 3 Hz (proton aldehydowy); δ = 3,5 ppm szerokość połówkowa multipletu 15 Hz (1 proton przy C–17) δ = 0,7 i 0,65 ppm (protony grup metylowych na C–18 i C–19).

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania A-nor-steroidów **znamienny** tym, że uzyskuje się z 4-chloro-androstendionu o wzorze 1 i 4-chlorotestosteronu o wzorze 2 na drodze reakcji mikrobiologicznej ze szczepem z gatunku *Rhodotorula mucilaginosa* odpowiednie chlorohydryny: 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β -ol-17-on o wzorze 3 i 4 α -chloro-5 α -androstan-3 β , 17 β -diol o wzorze 4, które ogrzewane z metanolem w roztworze wodorotlenku potasu na skutek kontrakcji w pierścieniu A dają odpowiednio A-nor-steroid o wzorze 5 i A-nor-steroid o wzorze 6.

