



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP



- (21) Patentansøgning nr.: 4847/81
(22) Indleveringsdag: 03 nov 1981
(41) Alm. tilgængelig: 04 maj 1982
(44) Fremlagt: 26 feb 1990
(86) International ansøgning nr.: -
(30) Prioritet: 03 nov 1980 DE 3042136

(51) Int.Cl.⁵ C 12 P 33/06
C 07 J 53/00

- (71) Ansøger: *SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT; Muellerstrasse 170-178; 1 Berlin 65; Berlin und Bergkamen, DE
(72) Opfinder: Karl *Petzoldt; DE, Rudolf *Wiechert; DE, Henry *Laurent; DE, Klaus *Nickisch; DE, Dieter *Bittler; DE

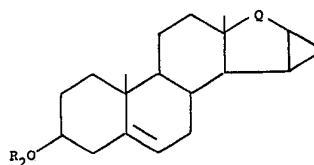
(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af 3beta,7beta-dihydroxy-delta5-steroider

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

og R_1 betegner et hydrogenatom, en trimethylacetylgruppe, en tert.-butyldimethylsilylgruppe, en dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylgruppe eller en tribenzylsilylgruppe, ved fermentering af et 3 β -hydroxy- Δ^5 -steroid af den almene formel II

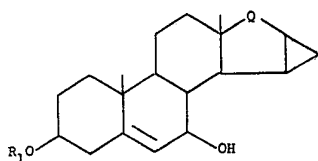


(II)

hvor Q har ovennævnte betydning, og R_2 betegner et hydrogenatom eller en alkanoylgruppe med 2 - 6 carbonatomer, med en kultur af Botryodiplodia malorum og, om ønsket, omsætning af de opnåede 3 β ,7 β -dihydroxy- Δ^5 -steroider af den almene formel I med trimethylacetanhydrid, tert.-butyldimethylsilylchlorid, dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylchlorid eller tribenzylsilylchlorid, hvorved muliggøres fremstillingen i højt udbytte af vigtige mellemprodukter til partialsyntese af farmakologisk virksomme steroider.

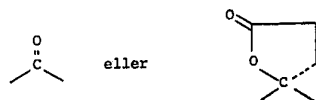
4847-81

Fremstilling af 3 β ,7 β -dihydroxy- Δ^5 -steroider af den almene formel I



(I)

hvor Q betegner grupperne



Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af $3\beta,7\beta$ -dihydroxy- Δ^5 -steroider med den i krav 1's indledning angivne formel I, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne.

- 5 $3\beta,7\beta$ -dihydroxy- Δ^5 -steroider af den almene formel I ifølge krav 1 er vigtige mellemprodukter til partialsyntese af farmakologisk virksomme steroider.

10 Ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det muligt at fremstille disse forbindelser i højt udbytte ud fra de tilsvarende i 7-stillingen usubstituerede forbindelser.

15 Det første reaktionstrin af fremgangsmåden ifølge opfindelsen gennemføres under de betingelser, som man sædvanligvis anvender ved den mikrobiologiske hydroxylering af steroider med svampekulturer. Således bestemmes først i helt almindelige for-forsøg de gunstigste fermentationsbetingelser såsom for eksempel valg af det gunstigste næringsmedium, det egnede substratopløsnings- eller suspensionsmiddel, substratkonzentrationen, de tekniske betingelser såsom temperatur, luftning, pH-værdi og de optimale tider for spiring, substrattilsætning og substratkontakt, analytisk på mikroorganismens enzym, specielt tyndtlagskromatografisk. Derved har det vist sig, at det er hensigtsmæssigt at anvende koncentrationer på ca. 100 - 2000 mg substrat pr. liter næringsmedium. pH-værdien indstilles fortrinsvis på en værdi i intervallet fra 5 til 7. Dyrkningstemperaturen ligger i intervallet fra 20 til 40°C, fortrinsvis fra 25 til 35°C. Til luftning tilføres der fortrinsvis 0,5 - 5 liter luft pr. minut pr. liter kultursuppe. Omdannelsen af substratet sker hensigtsmæssigt ved tyndtlagskromatografisk analyse af prøveekstrakter. Fermentationsvarigheden udgør ca. 20 - 80 timer.

Efter endt fermentation isoleres fermentationsprodukterne på i og for sig kendt måde. Isoleringen kan for eksempel ske på den måde, at man ekstraherer fermentationsmassen med et ikke med vand blandbart organisk opløsningsmiddel såsom ethylacetat, butylacetat eller methylinobutylketon, inddamper ekstrakterne og eventuelt ved kromatografi og/eller krystallisation renser de således opnåede råprodukter.

Foretrukne udgangsforbindelser for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er forbindelser af den almene formel II, der som substituent R har et hydrogenatom, en acetylgruppe, en propionylgruppe eller en butyrylgruppe.

Det er overraskende, at Δ^5 -steroiderne af den almene formel II bliver hydroxyleret i 7β -stillingen, idet man ved, at de tilsvarende Δ^4 -steroider med *Botryodiplodia malorum* bliver hydroxyleret i 7α -stillingen (europæisk patentansøgning 0.014.991).

Det har længe været kendt, at den selektive beskyttelse af $3\beta, 7\beta$ -dihydroxy- Δ^5 -steroidernes 3-hydroxygruppe giver store vanskeligheder. (J.Amer.Chem.Soc., 74, 1952, 3310). Omsætningen af forbindelserne med for eksempel trimethylacetylchlorid eller triphenylchlormethan-midler, som konventionelt anvendes til selektiv beskyttelse af uinddrede hydroxygrupper, foruden sterisk hindrede hydroxygrupper, fører, som nogle forsøg viser, ikke til det ønskede resultat.

Overraskende lykkes den selektive beskyttelse af 3β -hydroxygruppen af forbindelserne af den almene formel I, når man omsætter disse stoffer med trimethylacetanhydrid, fortrinsvis under anvendelse af 4-dimethylaminopyridin eller 4-pyrrolidinopyridin som katalysator, eller omsætter disse forbindelser med tert.-butyldimethylsilylchlorid, med dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylchlorid eller tribenzylsilylchlorid, fortrinsvis under an-

vendelse af organiske baser (pyridin, imidazol, triethylamin, 4-dimethylaminopyridin, lutidin, collidin etc.).

5 De efterfølgende eksempler tjener til belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og den erhvervsmæssige udnyttelse af de fremstillede produkter til fremstilling af den kendte aldosteron-antagonistisk virksomme 6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolacton:

10 A) Udførelseseksempler vedrørende fremgangsmåden ifølge opfindelsen:

Eksempel 1.

15 En 2-liter Erlenmeyer-kolbe med 500 ml af en i 30 minutter ved 120°C i autoklav steriliseret næringsopløsning af 1% stivelsessukker og 1% sojabønneemel, indstillet til pH-værdi 6,2, podes med en skråsubstratkultur af stammen Botryodiplodia malorum (CBS 13450) og rystes i 2 1/2 dag på et rotationsrysteapparat.

20 Med den således udviklede kultur podes et 20-liter for-fermenteringsapparat, som er fyldt med 15 liter af et i 60 minutter ved 121°C og 1,1 ato steriliseret medium af den samme sammensætning som den ovennævnte kultur. Under tilsætning af silicon SH som antiskummiddel lader man derpå spire ved 29°C og 0,7 ato tryk
25 under luftning (15 l/min.) og omrøring (220 omdrejninger pr. minut) i 24 timer.

Derpå udtages 0,9 liter af denne kultur under sterile betingelser og dermed podes et 20-liter hovedforgæringsapparat, der er belagt med 14 liter af et som ovenfor
30 steriliseret næringsmedium af samme sammensætning som for-

for­gæringskulturen. Efter en udviklingsfase på 12 ti-
mer under for-fermenteringsbetingelser tilsættes en
pasteuriseret suspension af 30 g finmalet 3 β -hydroxy-
15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on i 2250 ml 1%-ig
5 vandig Tween-80-opløsning, og der omrøres yderligere
og luftes. Fermentationens forløb kontrolleres ved
udtagelse af prøver, som ekstraheres ved hjælp af
methy­lisobutylketon og analyseres tyndtlagskromato-
grafisk. Efter 48 timers kontakttid er omsætningen af
10 substratet afsluttet. Kultursuppen befris for svampe-
mycel ved centrifugering i en gennemløbscentrifuge,
det klare filtrat ekstraheres tre gange med 10 liter
methy­lisobutylketon hver gang, og ekstrakterne for-
enes med ekstrakten af det, ligeledes ved hjælp af
15 methy­lisobutylketon, ekstraherede mycel. Efter koncen-
trering af opløsningen i et rotationsfordampnings-
apparat inddampes derpå ved en badtemperatur på 50°C
i vakuum i rotationsfordampningsapparatet til tørhed.
Den olieagtige krystallinske rest optages i isopropyl-
20 ether og frasuges over papirfilter. Efter 4 timers
tørring ved 70°C i vakuum fås 23,6 g 3 β ,7 β -dihydroxy-
15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on med smeltepunkt
199 - 202°C.

Eksempel 2.

25 Under de i eksempel 1 beskrevne betingelser fermenteres
22,5 g 3 β -acetoxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on
med Botryodiplodia malorum, og herved fås 16,3 g
3 β ,7 β -dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on
med smeltepunkt 197 - 200°C.

30 Eksempel 3.

Under de i eksempel 1 beskrevne betingelser inkuberes
22,5 g 3 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-17 α -pregn-5-en-21,17-
carbolacton med Botryodiplodia malorum, og derved fås
16,8 g 3 β ,7 β -dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-17 α -pregn-5-en-

21,17-carbolacton med smeltepunkt 173 - 175°C.

Eksempel 4.

En opløsning af 195 g 3 β ,7 β -dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on, fremstillet ifølge eksempel 1 eller 2, i 1460 ml
5 pyridin behandles med 293 ml pivalinsyreanhydrid og 31 g dimethylamino-pyridin. Efter en reaktionstid på 72 timer ved stuetemperatur fældes råproduktet med 15 liter isvand, suges fra, vaskes og tørres ved 60°C. Efter omkrystallisation fra
10 acetone/dichlormethan fås 185,4 g 7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5-androsten-17-on. Smeltepunkt 236°C. $[\alpha]_D = -45^\circ$ (chloroform).

Eksempel 5.

En opløsning af 120 g 3 β ,7 β -dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on, fremstillet ifølge eksempel 1 eller 2, i 1000 ml
15 dimethylformamid behandles med 31 g imidazol og afkøles til -20°C. Dertil dryppes i løbet af 2 timer 63 g tert.-butyldimethylchlorsilan i 450 ml dimethylformamid og efterrøres i 1 time. Reaktionsproduktet fældes med natriumchloridholdigt vand, filtreres fra, vaskes med vand og opløses i methylen-
20 chlorid. Opløsningen tørres over natriumsulfat og indampes. Efter kromatografi på kiselgel med hexan/acetone fås 128,8 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on.

Eksempel 6.

25 En opløsning af 100 g 3 β ,7 β -dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on, fremstillet ifølge eksempel 1 eller 2, i 2,5 liter tetrahydrofuran og 250 ml pyridin afkøles til -20°C og behandles med 88 ml dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylchlorid i 1 time og
30 omrøres i 4 timer ved denne temperatur. Derpå behandles med 50 ml methanol og indampes i vakuum. Råproduk-

tet kromatograferes på kiselgel med methylenchlorid/acetone. Der fås 98,5 g 3β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)silyloxy]- 7β -hydroxy- 15β , 16β -methylen-5-androsten-17-on som en-olie. $[\alpha]_D = -36^\circ$ (chloroform).

5 Eksempel 7.

En opløsning af 15,7 g 3β , 7β -dihydroxy- 15β , 16β -methylen-5-androsten-17-on, fremstillet ifølge eksempel 1 eller 2, i 750 ml methylenchlorid behandles med 9 ml triethylamin og 200 mg dimethylaminpyridin og afkøles til -20°C . Dertil dryppes i løbet af 30 minutter 19,4 g tribenzylsilylchlorid i 10 ml methylenchlorid. Der røres i 1 time ved -20°C og 1 time ved 0°C , fortyndes med methylenchlorid og vaskes med 1N saltsyre, mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og vand. Efter tørring over natriumsulfat indampes i vakuum. Efter kromatografi på kiselgel med hexan/acetone fås 27,5 g 3β -tribenzylsilyloxy- 7β -hydroxy- 15β , 16β -methylen-5-androsten-17-on.

Eksempel 8.

16,0 g 3β , 7β -dihydroxy- 15β , 16β -methylen- 17α -pregn-5-en-21,17-carbolacton, fremstillet ifølge eksempel 3, opløses i 130 ml dimethylformamid; opløsningen behandles med 4 g imidazol og afkøles til -20°C . I løbet af 30 minutter tildryppes 8 g tert.-butyldimethylchlorsilan i 60 ml dimethylformamid og omrøres i 2 timer under yderligere afkøling. Reaktionsopløsningen hældes i vand, det udfældede produkt filtreres fra, vaskes og tørres. Råproduktet kromatograferes med acetone/hexan på kiselgel. Udbytte 15,4 g 3β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)- 7β -hydroxy- 15β , 16β -methylen- 17α -pregn-5-en-21,17-carbolacton.

- B) Udførelseseksempler for erhvervsmæssig udnyttelse af forbindelserne, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Eksempel I

- 5 a) En suspension af 160 g 7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5-androsten-17-on i 1600 ml toluen behandles ved 80°C - efter tilsætning af 1,6 g vanadium(IV)-oxidacetylacetonat - i 2 timer med 160 ml 80%-ig tert.-butylhydroperoxid i 475 ml toluen. Efter afkøling vaskes opløsningen med 10 vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Udbytte 171 g 5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androstan-17-on. En fra acetone/hexan omkrystalliseret prøve smelter ved 220°C. $[\alpha]_D = -12^\circ$ (chloroform).
- 15 b) En opløsning af 169 g 5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androstan-17-on i en blanding af 340 ml dichlormethan, 340 ml tetrachlormethan og 340 ml pyridin behandles med 200 g triphenylphosphin og omrøres i 2 timer ved stuetemperatur. Reaktionsopløsningen vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed i 20 vakuum. Resten udrøres med 310 ml ethanol og filteres. Filterkagen vaskes med 175 ml ethanol og tørres i vakuum. Der fås 139,2 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androstan-25 17-on. En fra acetone/hexan omkrystalliseret analytisk prøve har et smeltepunkt på 228°C. $[\alpha]_D = -100^\circ$ (chloroform).

- c) En opløsning af 196 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androstan-17-on i 500 ml eddikesyre og 800 ml tetrahydrofuran behandles ved 70°C med 392 g zinkstøv i to portioner med 30 minutters mellemrum, og der omrøres i 1 time ved denne temperatur. Efter afkøling frafiltreres zinket over Celite, og der vaskes med 5 liter methylenchlorid. De forenede filtrater behandles med 1,5 liter vand og neutraliseres under omrøring ved tilsætning af fast natriumhydrogencarbonat. Derpå vaskes den organiske fase med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Ved rivning af det opnåede faste stof med eddikeester fås 134,7 g 5-hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androst-6-en-17-on med smeltepunkt 243°C.
- d) 134 g 5-hydroxy-15 β ,16 β -methylen-3 β -pivaloyloxy-5 β -androst-6-en-17-on opløses i 1340 ml tetrahydrofuran og 670 ml methanol og behandles i rækkefølge med 40 g pulveriseret kaliumhydroxid og 13 g natriumperchlorat. Efter 2 1/2 times forløb røres i 8 liter vand, neutraliseres med 20%-ig svovlsyre og frafiltreres det udfældede faste stof. Efter opløsning i methylenchlorid og tørring med natriumsulfat inddampes i vakuum. Ved rivning af det opnåede faste stof med eddikeester fås 99,8 g 3 β ,5-dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androst-6-en-17-on med smeltepunkt 198°C.
- e) En opløsning af 26 g 3 β ,5-dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androst-6-en-17-on i 520 ml ethylenglycoldimethylether omrøres med 78 g zink/kobber og 69 ml methylenjodid i 4 timer ved 80°C. Derpå fortyndes med methylenchlorid, vaskes med mættet ammoniumchloridopløsning og vand, tørres og inddampes. Resten kromatograferes på kiselgel. Der fås 16,3 g 3 β ,5-dihydroxy-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt

205,5 - 207°C.

- 5 f) 25,1 g 3 β ,5-dihydroxy-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-17-on opløses i 500 ml tetrahydrofuran. Under afkøling til 0°C og under en argon-atmosfære sættes der til denne opløsning 75,5 g kalium=
- 10 methyolat, og derpå tildryppes under omrøring 50,4 ml propargylalkohol opløst i 104 ml tetrahydrofuran. Reaktionsblandingen omrøres i 20 timer ved 0°C og hældes i isvand. Efter neutralisation med fortyndet svovlsyre frafiltrereres det udfældede bundfald og
- 15 tørres. Råproduktet kromatograferes på kiselgel. Der fås 25 g 17 α -(3-hydroxy-1-propynyl)-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-3 β ,5,17 β -triol. Smeltepunkt 202 - 203°C (acetone).
- 20 g) 24,5 g 17 α -(3-hydroxy-1-propynyl)-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-3 β ,5,17 β -triol hydrogeneres i 250 ml tetrahydrofuran og 125 ml methanol i nærværelse af 3,75 g palladium-på-carbon (10%-ig) og 0,5 ml pyridin indtil optagelse af 2 ækvivalenter hydrogen.
- 25 Katalysatoren filtreres fra, og der inddampes. Der fås 24,7 g 17 α -(3-hydroxypropyl)-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-3 β ,5,17 β -triol, som uden yderligere rensning anvendes i det næste trin.
- 30 h) En opløsning af 24,7 g 17 α -(3-hydroxypropyl)-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β -androstan-3 β ,5,17 β -triol i 247 ml pyridin behandles med en opløsning af 74,1 g chrom-(VI)-oxid i 247 ml vand og 494 ml pyridin og omrøres i 16 timer ved 50°C. Derpå fortyndes med methylenchlorid, vaskes med vand, tørres og inddampes. Resten kromatograferes på kiselgel. Efter omkrystallisation fra diisopropylether/acetone fås 14,5 g 6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolacton med smeltepunkt 196,5 - 197,5°C.

Eksempel II

- 5 a) 128 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on opløses i 750 ml toluen og behandles ved 80°C med 500 mg vanadin(IV)-oxidacetylacetonat. Dertil drypper man 460 ml tert.-butylhydroperoxidopløsning (af 100 ml 80%-ig tert.-butylhydroperoxid og 400 ml toluen) og lader det bero i 1 1/2 time ved denne temperatur. Efter afkøling vaskes med vand og mættet natriumchloridopløsning, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Der fås 126,5 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 α -androstan-17-on med smeltepunkt 189°C. $[\alpha]_D = -8,8^\circ$ (chloroform).
- 10
- 15 b) 126 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on opløses i en blanding af 600 ml methylenchlorid, 600 ml carbontetrachlorid og 300 ml pyridin og omrøres med 193,8 g triphenylphosphin i 2 1/2 time. Derpå vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Efter kromatografi på kiselgel med hexan/acetone fås 117,4 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt 155,5°C. $[\alpha]_D = -87^\circ$ (chloroform).
- 20
- 25 c) 142 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on opløses i 400 ml tetrahydrofuran og 400 ml methanol og omrøres med 1000 ml 8%-ig svovlsyre i 1 1/2 time ved stuetemperatur. Derpå fortyndes med ether, vaskes med mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og vand
- 30
- og tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum.

Ved rivning af det opnåede faste stof med diisopropyl-ether fås 108 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-3 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt 173°C.

- 5 d) 107,5 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-3 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on opløses i 500 ml eddike=syre og 500 ml tetrahydrofuran og omrøres - efter til-sætning af 324 g zinkstøv i tre portioner - ved stue-temperatur i 16 timer. Derpå frafiltreres zinket,
10 fortyndes filtratet med methylenchlorid og vaskes med natriumhydrogencarbonatopløsning og vand. Efter tørring over natriumsulfat inddampes i vakuum. Ved rivning af det opnåede faste stof med eddikeester
15 fås 91,5 g 3 β ,5-dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt 196°C.

Eksempel III

- a) En opløsning af 133 g 3 β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silyloxy]-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on i 740 ml toluen behandles ved 80°C med 624 mg
20 vanadin(IV)-oxidacetylacetonat. Dertil dryppes 470 ml tert.-butylhydroperoxidopløsning (af 94 ml 80%-ig tert.-butylhydroperoxid og 390 ml toluen) i løbet af 2 timer. Opløsningen efterrøres i 1 time ved denne temperatur. Efter afkøling vaskes med vand
25 og mættet natriumchloridopløsning, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Der fås 135 g 3 β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silyloxy]-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on som en olie. $[\alpha]_D = -16^\circ$ (chloroform).
- 30 b) 134 g 3 β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silyloxy]-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on

- opløses i en blanding af 1200 ml methylenchlorid, 1200 ml carbontetrachlorid og 600 ml pyridin. Opløsningen behandles med 140 g triphenylphosphin og omrøres i 3 timer ved stuetemperatur. Derpå vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og indampes i vakuum. Efter kromatografi på kiselgel med hexan/acetone fås 126,4 g 7 α -chlor-3 β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silyloxy]-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on som en olie. $[\alpha]_D = -72^\circ$ (chloroform).
- c) En opløsning af 107 g 7 α -chlor-3 β -[dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silyloxy]-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on i en blanding af 500 ml tetrahydrofuran og 500 ml methanol behandles med 100 ml 8%-ig svovlsyre og omrøres i 1 1/2 time ved stuetemperatur. Derpå fortyndes med ether, vaskes med mættet natriumhydrogencarbonatopløsning og vand, tørres over natriumsulfat og indampes i vakuum. Ved rivning af det opnåede faste stof med diisopropylether fås 74,5 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-3 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt 173,5°C.

Eksempel IV

- a) 24 g 3 β -tribenzylsilyloxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5-androsten-17-on opløses i 50 ml toluen, behandles med 500 mg vanadin(IV)-oxidacetylacetonat og opvarmes til 80°C. Dertil dryppes 75 ml tert.-butylhydroperoxidopløsning (10 ml 80%-ig tert.-butylhydroperoxid i 100 ml toluen), og blandingen får lov til at henstå i 1 1/2 time ved denne temperatur. Efter afkøling vaskes med vand og mættet natriumchloridopløsning, tørres og indampes i vakuum. Der fås 24,5 g 3 β -tribenzylsilyloxy-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on.

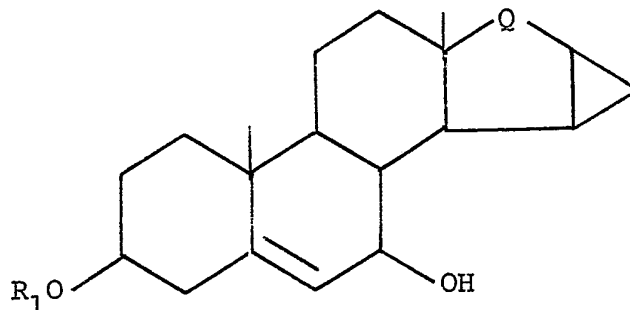
- b) 24 g 3 β -tribenzylsilyloxy-5,6 β -epoxy-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on opløses i en blanding af 250 ml methylenchlorid, 250 ml carbon=tetrachlorid og 125 ml pyridin og omrøres med 24 g triphenylphosphin i 3 timer. Derpå vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og inddampes i vakuum. Efter kromatografi på kieselgel med hexan/acetone fås 19,8 g 3 β -tribenzylsilyloxy-7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on.
- c) 19 g 3 β -tribenzylsilyloxy-7 α -chlor-5,6 β -epoxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on opløses i 50 ml tetrahydrofuran og 50 ml methanol og omrøres med 15 ml 8%-ig svovlsyre i 2 timer ved stuetemperatur. Derpå fortyndes med ether, vaskes med mættet natrium=hydrogencarbonatopløsning og vand, tørres over natrium=sulfat og inddampes i vakuum. Ved rivning af det opnåede faste stof med diisopropylether fås 8,7 g 7 α -chlor-5,6 β -epoxy-3 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β -androstan-17-on med smeltepunkt 172°C.
- Eksempel V
- a) 15,0 g 3 β -(tert.-butyldimethylsilyloxy)-7 β -hydroxy-15 β ,16 β -methylen-17 α -pregn-5-en-21,17-carbolacton overføres analogt med forskrifterne 2 a) - 2 d) i 3 β ,5-dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β ,17 α -pregn-6-en-21,17-carbolacton. Udbytte 10,3 g. Smeltepunkt 236°C.
- b) 5 g 3 β ,5-dihydroxy-15 β ,16 β -methylen-5 β ,17 α -pregn-6-en-21,17-carbolacton opløses i 100 ml tetrahydrofuran og behandles med 15 g zink/kobber. Dertil dryppes i løbet af 7 timer 13,2 ml methylenjodid således, at temperaturen ikke overstiger 30°C, og der omrøres yderligere i 10 timer ved stuetemperatur. Til fjernel-

se af metallet filtreres over Celite, fortyndes filtratet med methylenchlorid og vaskes med mættet ammoniumchloridopløsning, tørres over magnesiumsulfat og inddampes i vakuum. Resten kromatograferes på kiselgel. Der fås 4,4 g 3 β ,5-dihydroxy-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β ,17 α -pregnan-21,17-carbolacton som en olie.

c) 2,8 g 3 β ,5-dihydroxy-6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-5 β ,17 α -pregnan-21,17-carbolacton opløses i 28 ml pyridin og behandles med en opløsning af 15 g chrom(VI)-oxid i 28 ml pyridin og 14 ml vand og omrøres i 16 timer ved 50°C. Efter afkøling fortyndes med methylenchlorid, vaskes med vand, tørres over magnesiumsulfat og inddampes i vakuum. Resten kromatograferes på kiselgel. Der fås 2,3 g 6 β ,7 β ,15 β ,16 β -dimethylen-3-oxo-17 α -pregn-4-en-21,17-carbolacton med smeltepunkt 198 - 198,5°C.

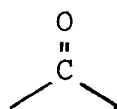
P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåde til fremstilling af 3 β ,7 β -dihydroxy- Δ^5 -steroider af den almene formel I

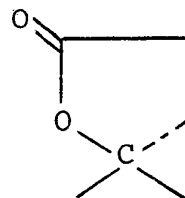


(I)

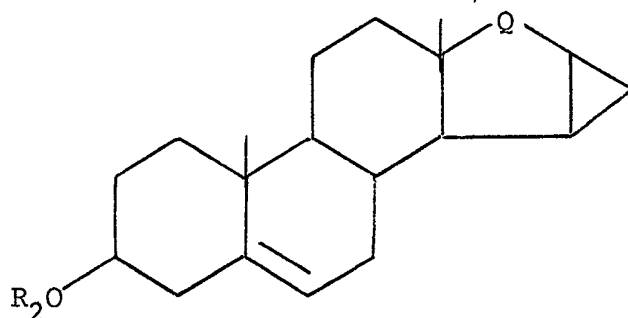
hvor Q betegner grupperne



eller



og R_1 betegner et hydrogenatom, en trimethylacetylgruppe, en tert.-butyldimethylsilylgruppe, en dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylgruppe eller en tribenzylsilylgruppe, k e n -
d e t e g n e t ved, at man fermenterer et 3β -hydroxy- Δ^5 -steroid af den almene formel II



(II)

hvor Q har ovennævnte betydning, og R_2 betegner et hydrogenatom eller en alkanoylgruppe med 2 - 6 carbonatomer, med en kultur af *Botryodiplodia malorum*, der kan udføre den ønskede 7β -hydroxylering, og, om ønsket, omsætter de opnåede $3\beta,7\beta$ -dihydroxy- Δ^5 -steroider af den almene formel I med trimethylacetatanhydrid, tert.-butyldimethylsilylchlorid, dimethyl-2-(3-methylbutyl)-silylchlorid eller tribenzylsilylchlorid.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af $3\beta,7\beta$ -dihydroxysteroider ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man gennemfører fermentationen med en kultur af *Botryodiplodia malorum* (CBS 13.450).