



(11) FREMLÆGGESESSKRIFT 142372

DANMARK

(51) Int. Cl.³ C 12 P 33/16



(21) Ansøgning nr. 3236/77 (22) Indleveret den 15. jul. 1977

(24) Løbedag 15. jul. 1977

(44) Ansøgningen fremlagt og
fremlæggesesskriftet offentliggjort den 20. okt. 1980

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

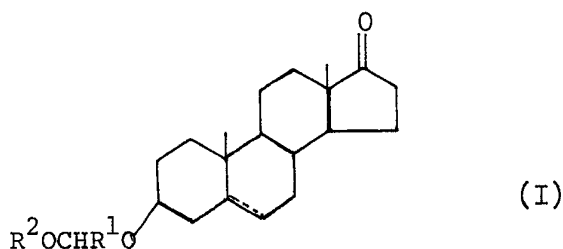
(30) Prioritet begæret fra den
16. jul. 1976, 2632677, DE

-
- (71) SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT, Berlin und Bergkamen, Muellerstrasse 170-178, 1 Berlin 65, DE.
- (72) Opfinder: Alfred Weber, Bruemmestr. 74, 1 Berlin 33, DE: Mario Kennecke, Fuggerstr. 39, 1 Berlin 30, DE: Helmut Dahl, Gollanczstr. 102, T Berlin 28, DE.

(74) Fuldmægtig under sagens behandling:
Firmaet Chas. Hude.

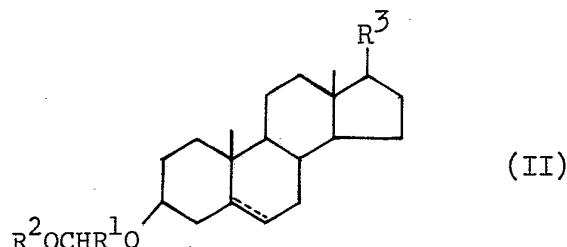
(54) Fremgangsmåde til fremstilling af androstan-17-on-derivater.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af androstan-17-on-derivater med den almene formel I



hvori bindingen ----- betyder en enkeltbinding eller en dobbeltbinding, R^1 betyder et hydrogenatom, en methylgruppe eller en ethylgruppe, og R^2 betyder en eventuelt med et oxygenatom afbrudt alkylgruppe med 1-4

carbonatomer, hvilken fremgangsmåde er kendetegnet ved, at man fermenterer et sterolderivat med den almene formel II

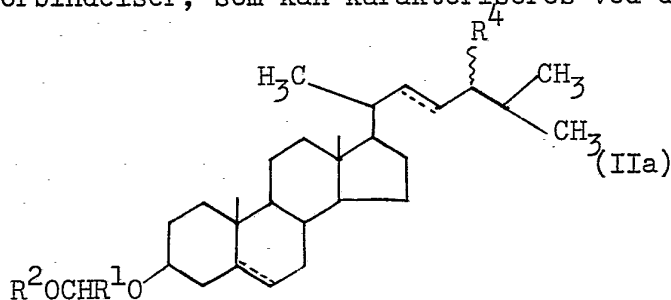


hvori , R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, og R^3 betyder en sterolhydrocarbongruppe indeholdende 8 til 10 carbonatomer, med en til sidekædenedbrydning af steroler egnet mikroorganismekultur af slægten Mycobacterium.

Med en alkylgruppe R^2 skal forstås en fortrinsvis ligekædet alkylgruppe indeholdende 1 til 4 carbonatomer. Egnede alkylgrupper R^2 er eksempelvis propylgruppen, butylgruppe, isobutylgruppen, sec.-butylgruppen og især methylgruppen og ethylgruppen. Med en af et oxygenatom afbrudt alkylgruppe skal fortrinsvis forstås en gruppe, som indeholder 3 til 4 carbonatomer. Sådanne grupper er eksempelvis 2-alkoxyethylengrupper, såsom 2-methoxy-ethylengruppen eller 2-ethoxy-ethylengruppen.

Med en hydrocarbongruppe R^3 indeholdende 8 til 10 carbonatomer skal forstås en gruppe, som den foreligger i sidekæder hos naturligt forekommende zoo- eller fytosteroler, såsom eksempelvis cholesterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol eller sitosterolerne.

Egnede sterolderivater med den almene formel II er eksempelvis sådanne forbindelser, som kan karakteriseres ved den almene formel IIa



hvori R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, bindingerne ----- betyder enkeltbindinger eller dobbeltbindinger, og R^4 betyder et hydrogenatom, en methylgruppe eller en ethylgruppe.

Særlig egnede sterolderivater med den almene formel IIa er Δ^5 -steroiderne og 5α -sterolderivaterne med disse formler.

Det er kendt, at talrige mikroorganismer (såsom eksempelvis sådanne af slægterne *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Mikrobacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* og især *Mycobacterium*) har naturlig evne til at nedbryde zoo- og fytosteroler til carbondioxyd og vand, og at der ved denne nedbrydning intermediært dannes 4-androsten- $3,17$ -dion og 1,4-androstadien- $1,17$ -dion.

Da talrige zoo- og fytosteroler (såsom eksempelvis kolesterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol og sitosterolerne) er vidt udbredt i naturen og således er let tilgængelige råstoffer for syntesen af farmakologisk virksomme steroider, blev talrige undersøgelser gennemført med henblik på at styre nedbrydningen af steroler således, at en yderligere nedbrydning af den dannede 4-androsten- $3,17$ -dion og 1,4-androstadien- $3,17$ -dion forhindres ved fermenteringen.

Det var således eksempelvis muligt at forhindre den yderligere nedbrydning af 1,4-androstadien- $3,17$ -dion og 4-androsten- $3,17$ -dion ved, at man sætter inhibitorer til fermenteringsmaterialet. (Se de tyske offentliggørelsesskrifter nr. 1.543.269 og 1.593.327, samt USA patentskrift nr. 1.208.078). Ved anvendelsen af inhibitorer bliver en teknisk gennemførelse af disse omsætninger imidlertid meget kostbar, og dette ikke mindst fordi, at de benyttede inhibitorer efter foretaget omsætning må fjernes fra fermenteringskulturerne for at undgå, at disse stoffer kommer i spildevandet.

Derudover har disse kendte omsætninger den ulempe, at der ved disse altid dannes 1,4-androstadien-3,17-dion eller blandinger af 1,4-androstadien-3,17-dion og 4-androsten-3,17-dion. Den dannede 1,4-androstadien-3,17-dion er imidlertid lidet egnet som udgangsmateriale for syntesen af talrige farmakologisk virksomme steroider.

På den anden side kunne den videre nedbrydning af 1,4-androstadien-3,17-dion og af 4-androsten-3,17-dion også forhindres ved, at man anvendte muterede mikroorganismer af slægten *Mycobacterium* til den fermentative omdannelse af steroiderne. (Se USA patentskrift nr. 3.684.657). De hidtil dyrkede mutanter har imidlertid den ulempe, at de kun har en meget begrænset evne til at danne 1,4-androstadien-3,17-dion eller 4-androsten-3,17-dion ud fra steroider.

Den foreliggende opfindelse tager sigte på at angive en fremgangsmåde til sidekædenedbrydning af steroider, hvilken fremgangsmåde ikke er behæftet med ulemperne ved de kendte fremgangsmåder.

Dette opnås ved at stille en fremgangsmåde til rådighed, som er kendetegnet ved, at man fermenterer et steroidderivat med den almene formel II med en til sidekædenedbrydning af steroider egnet mikroorganismekultur af slægten *Mycobacterium*.

For fagmanden er det meget overraskende, at androstan-17-on-derivaterne med den almene formel I dannes i høje udbytter ved denne fermentative omdannelse. Dette skyldes, som det vil være bekendt, at sidekædenedbrydningen af steroider sker ved hjælp af et meget komplekst fermenteringssystem, og man kunne ikke forvente, at alle ved sidekædenedbrydning af naturlige steroider medvirkende enzymer har evnen til også at bevirke sidekædenedbrydning af de i naturen ikke forekommende steroiderivater med den almene formel II. Derudover kunne man ikke forudse, at enzymsystemerne, som bevirker nedbrydning af 1,4-androstadien-3,17-dion og af 4-androsten-3,17-dion, ikke er i stand til at nedbryde androstan-17-on-derivaterne med den almene formel I.

Det må her yderligere tages i betragtning, at steroiderivaterne med den almene formel II er åbenkædede acetaler. Resultatet af omsætningen af sådanne acetaler kunne ikke forudses af fagmanden, da det

længe har været kendt, at de åbenkædede acetal er i modsætning til de tilsvarende ethere eller ketal er meget hydrolysefølsomme stoffer, hvorfor fagmanden måtte befrygte, at de ved en fermenteringstid på flere dage uden indvirkning af enzymer ville blive hydrolyseret vidtgående alene af fermenteringsmediet.

Bortset fra anvendelsen af andre udgangsforbindelser, og bortset fra den kendsgerning, at omsætningen kan gennemføres under fravær af inhibitorer, gennemføres fremgangsmåden ifølge opfindelsen under de samme fermentationsbetingelser, som man også anvender ved de kendte mikrobiologiske sidekædenedbrydningsreaktioner med steroler.

Ifølge opfindelsen gennemføres fermenteringen under anvendelse af mikroorganismekulturer af slægten *Mycobacterium*. Som egnede mikroorganismer skal eksempelvis nævnes: *Mycobacterium avium* IFO-3082, *Mycobacterium phlei* IFO-3158, *Mycobacterium phlei* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr. 29), *Mycobacterium phlei* ATCC-354, *Mycobacterium smegmatis* IFO-3084, *Mycobacterium smegmatis* ATCC-20, *Mycobacterium smegmatis* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest, Nr. 27), *Mycobacterium smegmatis* ATCC-19979, *Mycobacterium fortuitum* CBS-49566, *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 og *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3683.

Under de for disse mikroorganismer nødvendigvis benyttede dyrkningsbetingelser dyrkes submerskulturer i et passende næringsmedium under beluftning. Derpå sætter man substratet til kulturerne (opløst i et passende opløsningsmiddel eller fortrinsvis i emulgeret form) og fermenterer, indtil der er opnået en maksimal substratomdannelse.

Egnede substratopløsningsmidler er eksempelvis methanol, ethanol, glycolmonomethylether, dimethylformamid eller dimethylsulfoxid. Emulgeringen af substratet kan eksempelvis foretages ved, at man i mikroniseret form eller opløst i et med vand blandbart opløsningsmiddel (såsom methanol, ethanol, acetone, glycolmonomethylether, dimethylformamid eller dimethylsulfoxid) under stærk turbulens indsprøjter dette (fortrinsvis afkalket) vand, der indeholder de sædvanlige emulgeringshjælpemidler. Egnede emulgeringshjælpemidler

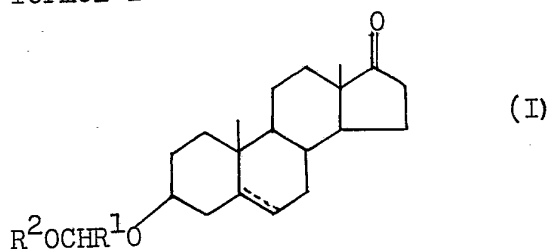
fer er ikke-ionogene emulgatorer, såsom eksempelvis ethylenoxid-addukter eller fedtsyreestere af polyglycoler.

Hyppigt muliggør emulgeringen af substraterne en forøget substrat-anvendelse og således en forøgelse af substratkoncentrationen. Det er imidlertid selvsagt også muligt ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen at anvende andre metoder til forøgelse af substratanvendelsen, hvilke metoder er velkendte for fagmanden på fermenteringsområdet.

Den optimale substratkoncentration, substrattilsætningstid og fermenteringsvarighed afhænger af strukturen af det benyttede substrat og af arten af den benyttede mikroorganisme. Disse størrelser må, således som det i almindelighed kræves ved mikrobiologiske steroiddannelser, fastslås i det enkelte tilfælde ved hjælp af forudgående forsøg, således som det er velkendt for fagmanden.

De ifølge opfindelsen fremstillede androstan-17-on-derivater med den almene formel I er værdifulde mellemprodukter til fremstilling af farmakologisk virksomme steroider.

Således kan man eksempelvis spalte de ud fra sterolderivaterne med den almene formel IIa fremstillede androstan-17-on-derivater med den almene formel I



hvor -----, R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, i nærværelse af H^+ -ioner eller Lewis-syrer til dannelsen af 3β -hydroxy-5-androsten-17-on eller 3β -hydroxy-5 α -androstan-17-on. Denne spaltning gennemføres under de betingelser, som man konventionelt anvender til hydrolyse eller alkoholyse af acetal. Således kan man eksempelvis spalte forbindelserne ved, at man omsætter dem i en lavere alkohol, såsom methanol eller ethanol, eller i et vandholdigt, organisk opløsningsmiddel, såsom glycolmonomethylether, tetrahydrofuran, dioxan, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, hexamethylphos=

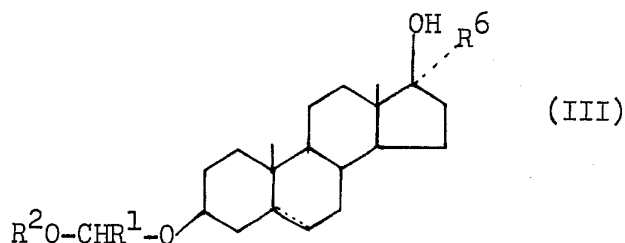
phorsyretriamid eller acetone, med en mineralsyre, såsom saltsyre, svovlsyre, phosphorsyre eller perchlorsyre, eller en sulfonsyre, såsom p-toluolsulfonsyre, en stærk sur carboxylsyre, såsom myresyre, eddikesyre eller trifluoreddikesyre, sure ionbyttere eller med en Levis-syre, såsom bortrifluorid, zinkchlorid eller zinkbromid.

På denne måde kan man eksempelvis på enkel måde fremstille 3 β -hydroxy-5-androsten-17-on, hvis estere som bekendt er farmakologisk virksomme stoffer. (Chem. Abstr. 65, 1966, 12264f) og tysk offentliggørelsesskrift nr. 1.643.046.

På den anden side er det også muligt at reducere androstan-17-on-derivaterne med den almene formel I i 17-stillingen eller at alkylere med en metalorganisk forbindelse med den almene formel IV



hvor R^5 betegner en mættet eller umættet hydrocarbongruppe indeholdende indtil 2 carbonatomer, og Me betyder et alkalimetallatom eller en magnesiumhalogenidgruppe. De således fremstillede forbindelser med den almene formel III



hvor -----, R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, og R^6 betyder det samme som R^5 eller et hydrogenatom, kan hydrolyseres til de tilsvarende 3 β -hydroxy-forbindelser i nærværelse af H^+ -ioner eller Levis-syrer. Deres videre forarbejdning til farmakologisk virksomme steroider kendes.

Således kan man eksempelvis ved hjælp af Oppenauer-reaktion (eksempelvis ved opvarmning af hydrolyseprodukterne i benzen-acetone med aluminiumisopropylat) omdanne de således opnåede 3 β -hydroxy-5-androsten-17-on-derivater til de tilsvarende 17 β -hydroxy-3-keto- Δ^4 -steroider, såsom eksempelvis testosteronen, 17 α -methyltestosteronen, 17 α -ethyltestosteronen eller 17 α -ethynyltestosteronen, der som bekendt ligeledes har en udpræget hormonvirkning.

Derudover er 17α -ethynyl- 17β -hydroxy-4-androsten-3-onen og 17β -hydroxy- 17α -vinyl-4-androsten-3-onen som bekendt værdifulde mellemprodukter til fremstilling af farmakologisk virksomt 17α -hydroxy-progesteron og estere deraf (Helv. Chim. Acta 24, 1941, 945 og tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.140.291).

Reduktionen af 17-ketogruppen i 5-androsten-17-on-derivaterne med den almene formel I sker ved hjælp af de af fagmanden velkendte arbejdsmetoder (se f.eks. John Fried: Organic Reactions in Steroid Chemistry - van Nostrand Reinhold Comp., New York etc. 1972, bind 1, side 61 ff). Man kan således eksempelvis omsætte disse forbindelser med natriumborhydrid eller lithiumaluminiumhydrid og opnår de tilsvarende 17β -hydroxy-5-androsten-derivater.

Ligeledes kendes metoderne til alkylering af 17-ketogruppen (se f.eks. John Fried: Organic Reactions in Steroid Chemistry - van Nostrand Reinhold Comp., New York etc. 1972, bind 2, side 53 ff). Således kan man eksempelvis omsætte 5-androsten-17-on-derivaterne med den almene formel I med alkylmagnesiumhalogenider eller alkalimetacetylinder og opnår de tilsvarende 17β -hydroxy- 17α -alkyl(eller ethynyl)-5-androsten-derivater.

Det er yderligere muligt at hydrogenere 5-androsten-17-on-derivaterne til de tilsvarende 5α -androstan-17-on-derivater, hvorved 17-oxogruppen opnås eller reduceres til den tilsvarende 17β -hydroxygruppe alt efter reaktionsbetingelserne.

5α -androstan-17-on-derivaterne med den almene formel I kan eksempelvis efter reduktion af 17-ketogruppen til 17β -hydroxygruppen, forestring af denne, spaltning af acetalforbindelsen og oxidation af 3-hydroxygruppen overføres til de tilsvarende 17β -acyloxy- 5α -androstan-3-oner, der som bekendt er anabolt virksomme stoffer (Endocrinologie 66, 1960, 13).

Udgangsforbindelserne for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er kendte, eller de kan fremstilles ved hjælp af kendte metoder (J. Pharm. Sec. 54, 514 (1965); Can. J. Chem. 49, 2418 (1971), Synthesis 1975, 276 og 1976, 244, Tetrahedron Letters 1976, 809, Can. J. Chem. 50, 2788 (1972) og Bull. Soc. Chim. France 1960, 297).

Opfindelsen belyses nærmere i de efterfølgende eksempler.

A). Udførelseseksempler angående den mikrobiologiske sidekædenedbrydning.

Eksempel 1

a) En 750 ml Erlenmeyerkolbe påfyldes 200 ml af en steril næringsopløsning indeholdende 1% gærekstrakt, 0,45% dinatriumhydrogenphosphat, 0,34% kaliumdihydrogenphosphat og 0,2% "Tagat[®] 02", som er indstillet på pH-værdien 6,7, podes med en opslæmning af en tørkultur af *Mycobacterium spec.* NRRL-B-3805 og rystes i 3 dage med 190 omdrejninger pr. minut ved 30°C.

b) En 50 l fermenteringsbeholder med 40 l af en steril næringsopløsning indeholdende 1,23% gærekstrakt (65%ig), 0,68% kaliumdihydrogenphosphat og 0,2% "Tagat[®] 02", som er indstillet på pH-værdien 6,0, podes med 200 ml af *Mycobacterium spec.*-dyrkningskulturen, og forkulturen inkuberes ved 30°C under beluftning (2 m³ pr. time) i 48 timer.

c) 400 g kolesterol opløses i 6 l formaldehyddimethylacetal, tilsættes under omrøring ved stuetemperatur 400 g kiselgur og portionsvis 200 g phosphorpentoxid og omrøres 2 timer ved stuetemperatur. Der frafiltreres fra uopløseligt materiale, vaskes med formaldehyddimethylacetal, og opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum. Efter tilsætning af natriumhydrogencarbonatopløsning frafiltreres det faste råprodukt, vaskes med vand, og man opnår efter tørring 440 g 3β-methoxymethoxy-5-cholesten. Den fra acetone omkrystalliserede forbindelse smelter ved 79-80°C.

400 g af det således fremstillede 3β-methoxymethoxy-5-cholesten emulgeres med 120 g "Tegin[®]", 10 l fuldstændig afsaltet vand og 40 ml 1N natronlud ved 95°C med en "Dispax[®]"-reaktor DR-3-6-6 (Firma Jahnke og Kunkel, Forbundsrepublikken Tyskland) i 30 minutter. Man steriliserer emulsionen i 20 minutter ved 120°C.

d) En 50 l fermenteringsbeholder fyldes med 40 l af en steril næringsopløsning, som indeholder 2,0% majsstøbevæske, 0,3% diammoniumhydrogenphosphat og 0,25% "Tagat[®] 02" og er indstillet på pH-værdien 6,5, podes med 2 l Mycobacterium spec. forkultur og inkuberes under beluftning (0,5 m³ pr. time) og omrøring (250 omdrejninger pr. minut) i 24 timer ved 30°C.

Kulturen tilsættes derpå den ifølge afsnit c) fremstillede 3β-methoxymethoxy-5-cholesten-emulsion, og der fermenteres yderligere i 120 timer. Efter afsluttet fermentering ekstraheres kulturen 3 gange, hver gang med 5 l ethylenchlorid, og ethylenchloridekstrakten filtreres og inddampes i vakuum.

Resten (156 g) kromatograferes over en kiselgelsøjle, omkrystalliseres fra ethylacetat, og man opnår 86 g 3β-methoxymethoxy-5-androsten-17-on med smeltepunkt 129/131-132°C.

Eksempel 2

a) I en 2 l Erlenmeyerkolbe med 500 ml sterilt næringsmedium dyrkes Mycobacterium spec. NRRL-B-3805 under betingelserne ifølge eksempel 1a).

b) 10 g sitosterol omsættes som beskrevet i eksempel 1c), og man opnår 11 g 24-ethyl-3β-methoxymethoxy-5-cholesten. Den fra acetone omkrystalliserede forbindelse smelter ved 70-71°C.

10 g af den således fremstillede 24-ethyl-3β-methoxymethoxy-5-cholesten emulgeres med 4 g "Tegin[®]" og 300 ml vand ved 95°C med en "Ultra-Turrax[®]" (Firma Jahnke og Kunkel, Forbundsrepublikken Tyskland) i 10 minutter. Man steriliserer emulsionen i 20 minutter ved 120°C.

c) 20 Erlenmeyerkolber, hver med 85 ml sterilt næringsmedium, som indeholder 2,0% majsstøbevæske, 0,3% diammoniumhydrogenphosphat og 0,25% "Tagat[®] 02" og er indstillet på pH-værdien 6,5, podes hver især med 5 ml af Mycobacterium spec. dyrkningskulturen og rystes i 24 timer ved 30°C med 220 omdrejninger pr. minut. Til

hver kultur sætter man derpå 14 ml af 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5-cholesten-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 24-ethyl-3 α -methoxymethoxy-5-cholesten) og fermenterer i yderligere 120 timer ved 30°C på et rysteapparat. Efter oparbejdning som beskrevet i eksempel 1d) opnår man 2,1 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-on med smeltepunkt 130-132°C.

Eksempel 3

a) 10,5 g stigmasterol omsættes som beskrevet i eksempel 1c), og man opnår 10,75 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadien. Den fra acetone omkrystalliserede forbindelse smelter ved 103-104°C.

b) Under de i eksempel 2b) beskrevne betingelser emulgeres 10 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadien.

c) Under de i eksempel 2a) og c) beskrevne betingelser fremstilles 85 ml af en Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-kultur, som tilsættes 14 ml af 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadien-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 24-ethyl-3 β -methoxymethoxy-5,22-cholestadien). Efter yderligere 120 timers inkubering ved 30°C på et rysteapparat sker oparbejdningen som beskrevet i eksempel 1d).

Man opnår 2,3 g 3 β -methoxymethoxy-5-androsten-17-on med smeltepunkt 130-132°C.

Eksempel 4

a) 20 g kolesterol opløses i 300 ml formaldehyddiethylacetal, tilsættes under omrøring ved stuetemperatur 30 g kiselgur og portionsvis 15 g phosphorpentoxid og omrøres i 4 timer ved stuetemperatur. Der frafiltreres fra uopløseligt materiale, vaskes med formaldehyddiethylacetal, og opløsningsmidlet afdestilleres i vakuum. Resten krystalliserer ved 0°C. Efter tilsætning af natriumhydrogencarbonatopløsning frasuges råproduktet, vaskes med vand, og man opnår efter tørring 22,5 g 3 β -ethoxymethoxy-5-cholesten. Den fra eddikeester omkrystalliserede forbindelse smelter ved 64-66°C.

b) Under de i eksempel 2b) beskrevne betingelser emulgeres 10g 3β -ethoxymethoxy-5-cholesten.

c) Under de i eksempel 2a) og c) beskrevne betingelser fremstilles 85 ml af en Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-kultur, som tilsættes 14 ml af 3β -ethoxymethoxy-5-cholesten-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 3β -ethoxymethoxy-5-cholesten).

Efter yderligere 120 timers inkubation ved 30°C på et rysteapparat sker oparbejdningen som beskrevet i eksempel 1d).

Man opnår 1,5 g 3β -ethoxymethoxy-5-androsten-17-on med smeltepunkt $121-123^{\circ}\text{C}$.

Eksempel 5

a) 38,67 g kolesterol opløses i 250 ml methylenchlorid og 164,2 g formaldehyd-bis-glycolmonomethyletheracetal (kan eksempelvis fremstilles ifølge tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.405.633), tilsættes under omrøring ved stuetemperatur 60 g kiselgur og 30 g phosphorpentoxid og omrøres 1 time ved stuetemperatur. Der filtreres fra uopløseligt materiale, vaskes med methylenchlorid og neutraliseres med methanolisk kaliumhydroxidopløsning. Efter afdestillering af opløsningsmidlet i vakuum optages der i methanol, filtreres, og materialet krystalliserer ved hjælp af langsom fordampning. Man opnår 25 g 3β -(2,5-dioxahexyloxy)-5-cholesten med smeltepunkt $41-42^{\circ}\text{C}$.

b) Under de i eksempel 2b) beskrevne betingelser emulgeres 10 g 3β -(2,5-dioxahexyloxy)-5-cholesten.

c) Under de i eksempel 2a) og c) beskrevne betingelser fremstilles 25 ml af en Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-kultur, som tilsættes 14 ml af 3β -(2,5-dioxahexyloxy)-5-cholesten-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 3β -(2,5-dioxahexyloxy)-5-cholesten).

Efter yderligere 120 timers inkubation ved 30°C på et rysteapparat sker oparbejdningen som beskrevet i eksempel 1d).

Man opnår 1,75 g 3β -(2,5-dioxahexyloxy)-5-androsten-17-on med smeltepunkt 65-67°C.

Eksempel 6

a) 12 g cholesterol suspenderes i 100 ml acetaldehyddimethylacetal, tilsættes under omrøring ved stuetemperatur 25 g kiselgur og portionsvis 12 g phosphorpentoxid og omrøres i 45 minutter ved stuetemperatur. Der frafiltreres fra uopløseligt materiale, vaskes med methylenchlorid, og opløsningen neutraliseres med methanolisk natriumhydroxidopløsning. Efter afdestillation af opløsningsmidlet i vakuum omkrystalliseres råproduktet fra acetone under tilsætning af aktivt carbon. Man opnår 10,2 g 3β -(1-methoxyethoxy)-5-cholesten med smeltepunkt 94-95°C-

b) Under de i eksempel 2b) beskrevne betingelser emulgeres 10 g 3β -(1-methoxyethoxy)-5-cholesten.

c) Under de i eksempel 2a) og c) beskrevne betingelser fremstilles 85 ml af en Mycobacterium spec. NRRL-B-3805-kultur, som tilsættes 14 ml af 3β -(1-methoxyethoxy)-5-cholesten-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 3β -(1-methoxyethoxy)-5-cholesten). Efter yderligere 120 timers inkubation ved 30°C på et rysteapparat sker oparbejdningen som beskrevet i eksempel 1d).

Man opnår 1,89 g 3β -(1-methoxyethoxy)-5-androsten-17-on med smeltepunkt 111-118°C.

Eksempel 7

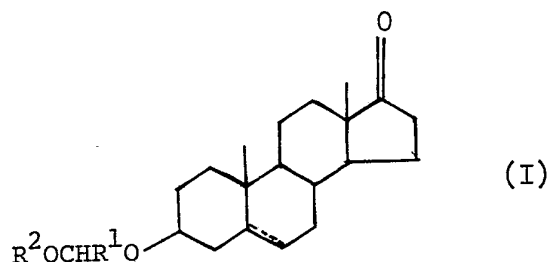
a) 20 g 5α -cholestan- 3β -ol omsættes som beskrevet i eksempel 1c) med formaldehyddimethylacetal, og man opnår 21,5 g 3β -methoxymethoxy- 5α -cholestan. Den fra acetone omkrystalliserede forbindelse smelter ved 65-68°C.

b) Under de i eksempel 2b) beskrevne betingelser emulgeres 10 g 3β -methoxymethoxy- 5α -cholestan.

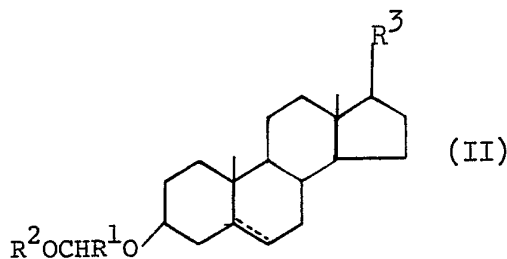
c) Under de i eksempel 2a) og c) beskrevne betingelser fremstilles 85 ml af en *Mycobacterium spec.* NRRL-3805-kultur, som tilsættes 14 ml af 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholestan-suspensionen (dette svarer til 0,5 g 3 β -methoxymethoxy-5 α -cholestan). Efter yderligere 120 timers inkubation ved 30°C på rysteapparatet sker oparbejdningen som beskrevet i eksempel 1d). Man opnår 2,05 g 3 β -methoxymethoxy-5 α -androstan-17-on med smeltepunkt 97-98°C.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til fremstilling af androstan-17-on-derivater med den almene formel I

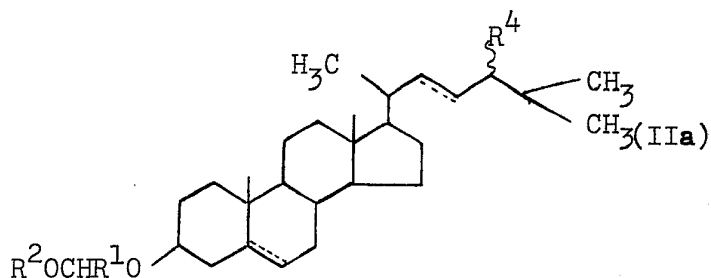


hvor bindingen ----- betyder en enkeltbinding eller en dobbeltbinding, og R¹ betyder et hydrogenatom, en methylgruppe eller en ethylgruppe, og hvori R² betegner en eventuelt af et oxygenatom afbrudt alkylgruppe med 1-4 carbonatomer, k e n d e t e g n e t ved, at man fermenterer et sterolderivat med den almene formel II



hvor ----- , R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, og R^3 betyder en sterols hydrocarbongruppe indeholdende 8 til 10 carbonatomer, med en til sidekædenedbrydning af steroler egnet mikroorganismekultur af slægten Mycobacterium.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt ved, at man fermenterer et sterolderivat med den almene formel IIa



hvor ---- , R^1 og R^2 har den ovennævnte betydning, og R^4 betegner et hydrogenatom, en methylgruppe eller en ethylgruppe.

Fremdragne publikationer:

Dansk ansøgning nr. 3439/76 (patent nr. 140172).