

Klaus Kieslich und Hans-Joachim Koch

## Mikrobiologische Umwandlung von 3-Alkoxy-19-nor-2.5(10)-dien-Steroiden zu 3-Hydroxy-5(10)-en-Strukturen

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

(Eingegangen am 9. September 1969)

Steroide mit einem 3-Alkoxy-2.5(10)-dien-System werden mikrobiologisch zu 3-Keto-5(10)-en-Strukturen gespalten und zu entsprechenden 3-Hydroxy-Verbindungen reduziert. Mit speziellen Hefestämmen werden ausschließlich 3 $\beta$ -Hydroxy-5(10)-en-Strukturen erhalten.

### Microbiological Transformation of 3-Alkoxy-19-nor-2.5(10)-diene Steroids to 3-Hydroxy-5(10)-ene Structures

3-Alkoxy-19-nor-2.5(10)-diene steroids are split microbiologically to 3-keto-5(10)-ene structures and reduced to the corresponding 3-hydroxy-compounds. 3 $\beta$ -Hydroxy-5(10)-ene structures are formed exclusively by special yeast-strains.

Die in der vorangehenden Mitteilung beschriebene Darstellung von 3-Hydroxy-19-nor-5(10)-en-Steroiden<sup>1)</sup> durch mikrobiologische Reduktion von 3-Keto-5(10)-en-Strukturen kann durch einen möglicherweise neuartigen mikrobiologischen Reaktionstyp vereinfacht werden.

3-Keto-19-nor-5(10)-en-Steroide werden allgemein durch schwach saure Spaltung von 3-Alkoxy-2.5(10)-dien-Strukturen erhalten, wobei milde Reaktionsbedingungen eine Isomerisierung der 5(10)-Doppelbindung zum konjugierten 3-Keto-4-en-System verhindern müssen<sup>2)</sup>.

Eine Spaltung solcher Enoläther auf schonendem mikrobiologischen Weg war bisher nicht bekannt. Auch hier waren jedoch unerwünschte enzymatische Nebenreaktionen wie Hydrierung, Dehydrierung und Aromatisierung des A-Ringes oder Abbaureaktionen möglich<sup>3,4)</sup>.

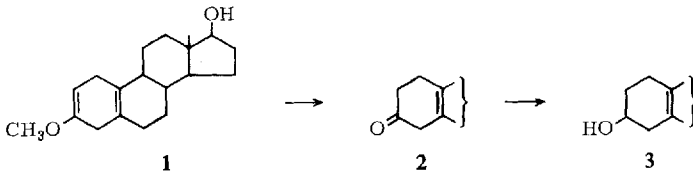
In einer screening-Prüfung von 273 Mikroorganismen, davon 44 Bakterien, 88 Pilzen, 116 Hefen sowie 25 Actinomyceten und Streptomyceten wurde bei annähernd zwei Drittel der Stämme eine Reaktion des als Substrat angebotenen 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadiens-(2.5(10)) (**I**) beobachtet (Tab. 1).

<sup>1)</sup> H.-J. Koch und K. Kieslich, Chem. Ber. **103**, 603 (1970), vorstehend.

<sup>2)</sup> A. L. Wilds und N. A. Nelson, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5366 (1953).

<sup>3)</sup> A. A. Achrem und J. A. Titow, Microbiol. Transformations of Steroids, S. 131, 143, 163, 176, Moskau 1965.

<sup>4)</sup> A. Capek, O. Hanč und M. Tadra, Microbiol. Transformations of Steroids, S. 18 f., Academia Prag 1966.



Tab. 1. Enzymatische Reaktionsfähigkeit von unterschiedlichen Mikroorganismen am Substrat 17β-Hydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadien-(2,5(10)) (1) (Zahlen bedeuten Anzahl der Stämme)

	keine Umsetzung	sehr schwache Enolätherspaltung	deutliche Enolätherspaltung	Zusätzliche Reduktion der 3-Ketogruppe überwiegend zu 3α-OH	überwiegend zu 3β-OH	fast ausschl. zu 3β-OH	Σ
Bakterien	12	29	3	—	—	—	44
Pilze	42	37	3	6	—	—	88
Hefen	9	30	5	24	31	17	116
Actinomyceten u. Streptomyceten	24	—	1	—	—	—	25
	87 (32%)	96 (35%)	12 (4.4%)	30 (11%)	31 (11.4%)	17 (6.3%)	273 (100%)

Ergebnisse von Schüttelkolben-Fermentationen (20 ccm Füllung) mit Substratkonzentrationen von 150 mg/l pro Liter Kulturbrühe und Kontaktzeiten von 20 Stdn.

Merkwürdigerweise waren mit einer Ausnahme alle verwendeten Actinomyceten und Streptomyceten inaktiv. Etwa 50% der umsetzenden Stämme zeigten nur eine spurenweise oder sehr schwache Bildung von 17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3) (2), wobei in manchen Fällen eine rein chemische Spaltung des Enoläthers durch den während der Fermentation mitunter fallenden pH-Wert des Kulturmediums nicht ausgeschlossen werden konnte.

Nur 12 Arten (Tab. 2) ergaben Ausbeuten an 5(10)-En-3-ke-ton, die unter verbesserten Bedingungen zu einer präparativen Darstellung anregen.

Tab. 2. Mikroorganismen mit enzymatischer Fähigkeit zur Enolätherspaltung (Substrat 1)

	% unumgesetztes Ausgangsmaterial	% 3-Keto-5(10)-en	Nebenprodukte
<b>Bakterien</b>			
<i>Flavobacterium arborescens</i> (ATCC 4358)	45	25	Spur 3-Keto-4-en
<i>Rhodopseudomonas capsulata</i> (ATCC 11166)	40	25	Spur 3-Keto-4-en
<i>Streptococcus lactis</i> (Schering B 57)	5	30	Spur 3-Keto-4-en
<b>Pilze</b>			
<i>Ascochyta pirina</i> (CBS)	30	10	5% 3-Keto-4-en
<i>Aspergillus luchuensis</i> (CBS)	3	15	Spur 3-Keto-4-en
<i>Sporotrichum epigalum</i> (ATCC 7145)	40	20	—
<b>Hefen</b>			
<i>Candida krusei</i> (NCYC 45)	10	40	Spur 3-OH-5-en
<i>Candida krusei</i> (NCYC 120)	5	50	Spur 3-OH-5-en
<i>Candida lipolytica</i> (NCYC 153)	90	10	—
<i>Kloeckera apiculata</i> (NCYC 588)	50	10	—
<i>Rhodotorula macerans</i> (NCYC 578)	60	30	—
<b>Actinomyceten</b>			
<i>Nocardia minima</i> (CBS)	30	60	—

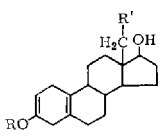
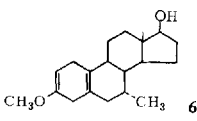
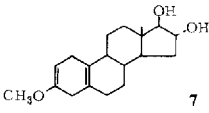


Ergebnisse von Schüttelkolben-Fermentationen (20 ccm Füllung) mit Substratkonzentrationen von 150 mg/l 17β-Hydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadien-(2,5(10)) (1) pro Liter Kulturbrühe und Kontaktzeiten von 20 Stdn.

Tab. 3. Mikroorganismen mit enzymatischer Fähigkeit zur Enolätherspaltung und zusätzlicher 3-Ketoreduktase-Aktivität zur Bildung von 3 $\beta$ -Hydroxy-19-nor-5(10)-en-Steroiden (Substrat 1)

	% unumgesetztes Ausgangsmaterial	% 3-Keto-5(10)-en	% 3 $\alpha$ -OH-5(10)-en	% 3 $\beta$ -OH-5(10)-en
<i>Candida krusei</i> (NCYC 336)	—	—	Spur	10
<i>C. mucilaginoso</i> (NCYC 63)	40	5	Spur	15
<i>C. scottii</i> (Schering 458)	10	—	Spur	15
<i>C. clausenii</i> (Schering 415)	10	—	3	20
<i>C. rugosa</i> (Schering 457)	50	4	5	25
<i>C. tropicalis</i> (NCYC 5)	5	5	5	40
<i>C. tropicalis</i> (NCYC 470)	10	5	3	40
<i>C. krusei</i> (NCYC 337)	Spur	—	Spur	40
<i>C. krusei</i> (NCYC 338)	10	2	Spur	40
<i>C. krusei</i> (NCYC 562)	15	—	Spur	40
<i>C. brumpti</i> (Schering 412)	20	—	10	50
<i>C. tropicalis</i> , St. <i>Monilia</i> (IfG)	15	Spur	5	50
<i>C. krusei</i> (NCYC 329)	5	2	2	50
<i>C. krusei</i> (NCYC 332)	4	10	Spur	50
<i>C. pelliculosa</i> (NCYC 471)	10	1	—	40
<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	—	—	—	60

Ergebnisse von Schüttelkolben-Fermentationen (20 ccm Füllung) mit Substratkonzentrationen von 150 mg 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (1) pro Liter Kulturbrühe und Kontaktzeiten von 20 Stdn.

Tab. 4. Umwandlung von 3-Alkoxy-19-nor-androstadienen-(2.5(10)) in die 3 $\beta$ -Hydroxy-2.3-dihydro-Verbindungen

Einsatzprodukt	Mikroorganismus	Ausb. 2,3-Dihydro-3 $\beta$ -OH	Nebenprodukt
 <p>1: R = CH<sub>3</sub>, R' = H</p>	<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	70% 3	—
4: R = C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , R' = H	<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	73% 3	
5: R = R' = CH <sub>3</sub>	<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	73.6%	
 <p>6</p>	<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	64%	
 <p>7</p>	<i>Pichia fermentans</i> (NCYC 246)	35%	—
 <p>8</p>	<i>Candida tropicalis</i> St. <i>Monilia</i> H (IfG)	14%	20% 17 $\beta$ -OH
 <p>9</p>	<i>Candida tropicalis</i> St. <i>Monilia</i> (IfG)	14%	10% (unbekannt)

Einige Pilze und zwei Drittel der geprüften Hefen reduzierten die intermediär gebildete 3-Ketogruppe in einer Folgereaktion zur 3-Hydroxyfunktion. Die Pilzenzyme reduzierten bevorzugt zur  $3\alpha$ -Hydroxystellung, während der größere Anteil der Hefen überwiegend das isomere  $3\beta$ -Hydroxyprodukt bildete. 16 Hefestämme reduzierten weitgehend selektiv (Tab. 3).

Damit ergab sich ein verkürztes Verfahren zur Herstellung gewünschter  $3\beta$ -Hydroxy-19-nor-5(10)-en-Steroide, wobei die im 30-l-Versuchsfermenter mit den besten Hefestämmen ermittelten Ausbeuten an isoliertem  $3\beta$ -17 $\beta$ -Dihydroxy-19-nor-androsten-5(10) (3) bis zu 70% betragen.

Die Reaktion ist nicht auf die Primärsplaltung des Methyl-Enoläthers beschränkt, sondern liefert gleiche Ausbeuten bei Einsatz von 17 $\beta$ -Hydroxy-3-äthoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (4).

Auch unterschiedlich substituierte 3-Methoxy-19-nor-androstadiene-(2.5(10)) lassen sich in gleicher Weise zu den  $3\beta$ -Hydroxy-5(10)-en-Strukturen umwandeln (Tab. 4).

Bei der Reproduktion einiger Fermentationsversuche unter konstant gehaltenen pH-Werten von 7, 6 und 5 wurde keine Umwandlung beobachtet. Der Enoläther wird nur dann gespalten, wenn der pH-Wert während der Fermentation auf 4 abfällt. Damit kann die Spaltung wohl eine pH-abhängige enzymatische Reaktion sein; wahrscheinlicher ist eine normale chemische Reaktion durch die während der Fermentation gebildete Säure.

Wir danken Herrn Dr. W. Neudert, Dr. G. Cleve und Dr. G. Schulz für die Interpretation der Spektren sowie Herrn G. Ast und Frau U. Rabel für die präparative Mitarbeit.

## Beschreibung der Versuche

Schmp.-Bestimmung, Dünnschicht- und Säulenchromatographien, NMR-Spektren und Analysen siehe vorstehende Mitteil.<sup>1)</sup>

*Vorversuche:* Die Durchführung der Schüttelkolben-Fermentationen ist in der vorangehenden Mitteilung<sup>1)</sup> beschrieben.

### *3 $\beta$ -17 $\beta$ -Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10)) (3)*

a) Aus 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (1)<sup>2)</sup>: Eine Schrägagarkultur von *Pichia fermentans* (NCYC 246) wurde mit ca. 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung in einen 2-l-Erlenmeyer-Kolben abgeschwemmt, der 500 ccm eines bei 120° 30 Min. sterilisierten Mediums aus 5% Stärkezucker und 2% Cornsteep-liquor enthielt. Nach 2tägigem Schütteln auf einem Rotationsschüttler (145 U/Min.) bei 29° wurde mit dieser Anzuchtkultur ein 20-l-Marubishi-Glasfermenter beimpft, der mit 15 l des gleichen Mediums beschickt war. Unter Belüftung (15 l/Min.) und Rühren (220 U/Min.) wurde bei 29° angezüchtet und nach 12 Stdn. mit einer Lösung von 2.25 g **1** in 110 ccm Dimethylformamid versetzt. Nach weiteren 20 Stdn. Fermentationszeit wurde die Kulturbrühe 2mal mit je 7.5 l Toluol ausgerührt. Die vereinigten Extrakte wurden im Umlaufverdampfer bei 40° evaporiert. Der Rückstand gab aus Hexan/Aceton 1.5 g (70%) reines **3**, Schmp. 146–147°<sup>5)</sup>. Nach Misch-Schmp. und NMR identisch mit dem aus der entsprechenden 3-Ketoverbindung erhaltenen Produkt<sup>1)</sup>. — NMR:  $\delta$  0.77 ppm s (13-CH<sub>3</sub>), 3.50–3.85 (17-H), 3.90–4.20 (3-H).

<sup>5)</sup> J. A. Hartmann, J. Amer. chem. Soc. 77, 5151 (1955).

b) Aus 17 $\beta$ -Hydroxy-3-äthoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (4)

$\alpha$ ) Darstellung von 4: Zu einer Lösung von 8.5 g Lithium in 400 ccm flüssigem Ammoniak wurde unter Rühren eine Lösung von 15.0 g Östradiol-3-äthyläther<sup>6)</sup> in 360 ccm absol. Tetrahydrofuran getropft und 1 Stde. nachgerührt. Nach Zersetzen mit 125 ccm Äthanol, Verdampfen des Ammoniaks und Zugabe von 250 ccm gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung wurde mit Äther extrahiert, der Auszug mit gesätt. NaCl-Lösung und Wasser neutralgewaschen, getrocknet und evaporiert. Nach Umkristallisieren aus Hexan/Aceton erhielt man 11.0 g Reinprodukt (76%), Schmp. 126–128°. — NMR (Aceton):  $\delta$  0.78 ppm (13-CH<sub>3</sub>), 1.25 t ( $J = 7$  Hz) (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O), 3.77 q ( $J = 7$  Hz) (—CH<sub>2</sub>O—), 3.45–3.80 (17-H), 4.57–4.75 (2-H).

C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> (302.5) Ber. C 79.4 H 10.0 O 10.6 Gef. C 78.4 H 10.1 O 10.6

$\beta$ ) Reduktion zu 3: Nach den unter a) beschriebenen Bedingungen wurden 2.25 g 4 in 32 Stdn. Fermentationszeit (20 Stdn. Kontaktzeit) umgewandelt und aufgearbeitet. Reinausb. 1.5 g (73%), Schmp. 145–147°<sup>5)</sup>, nach Misch-Schmp. und NMR-Vergleich identisch mit dem aus a) erhaltenen Produkt.

Unter gleichen Bedingungen wurden mit *Pichia fermentans* umgewandelt:

2.25 g 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-18-methyl-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (5)<sup>7)</sup> in 35 Stdn. zu 3 $\beta$ .17 $\beta$ -Dihydroxy-13-äthyl-gonen-(5(10)), Ausb. 73.6%, Schmp. 160–161.4°<sup>1)</sup>. — NMR:  $\delta$  0.97 ppm t (18-CH<sub>3</sub>), 3.55–4.20 (3-H und 17-H).

1.0 g 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-7 $\alpha$ -methyl-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (6)<sup>8)</sup> in 12 Stdn. zu 3 $\beta$ .17 $\beta$ -Dihydroxy-7 $\alpha$ -methyl-19-nor-androsten-(5(10)), Ausb. 64%, Schmp. 165–167°. — NMR:  $\delta$  0.75 ppm (13-CH<sub>3</sub>), 0.77 d ( $J = 6.5$  Hz) (7 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 3.50–3.85 (17-H), 3.90–4.20 (3-H).

1.5 g 16 $\alpha$ .17 $\beta$ -Dihydroxy-3-methoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (7)<sup>9)</sup> in 14 Stdn. zu 3 $\beta$ .16 $\alpha$ .17 $\beta$ -Trihydroxy-19-nor-androsten-(5(10)), Ausb. 35%, Schmp. 203–205°. — NMR (Pyridin):  $\delta$  1.0 ppm (13-CH<sub>3</sub>), 4.02 d ( $J_{16,17} = 5.5$  Hz) (17-H), 4.10–4.40 (3-H), 4.45–4.75 (16-H).

Unter analogen Bedingungen wurden mit *Candida tropicalis* umgewandelt:

2.25 g 3-Methoxy-19-nor-androstadien-(2.5(10))-on-(17) (8)<sup>10)</sup> in 55 Stdn. zu 3 $\beta$ -Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(17), Ausb. 14%, Schmp. 128–130°<sup>1,11)</sup>. — NMR:  $\delta$  0.90 ppm (13-CH<sub>3</sub>), 3.90–4.20 (3-H).

2.25 g 17 $\beta$ -Hydroxy-3-methoxy-17 $\alpha$ -methyl-19-nor-androstadien-(2.5(10)) (9)<sup>12)</sup> in 15 Stdn. zu 3 $\beta$ .17 $\beta$ -Dihydroxy-17 $\alpha$ -methyl-19-nor-androsten-(5(10)), Ausb. 14%, Schmp. 159 bis 161°<sup>13)</sup>. — NMR:  $\delta$  0.90 ppm s (13-CH<sub>3</sub>), 1.25 s (17 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>), 3.90–4.20 (3-H).

<sup>6)</sup> R. Courrier, C. R. Séances Soc. Biol. **139**, 128 (1945), C. A. **40**, 2209 (1946).

<sup>7)</sup> C. Rufer, H. Kosmol, E. Schröder, K. Kieslich und H. Gibian, Liebigs Ann. Chem. **702**, 1411 (1967).

<sup>8)</sup> G. Anner, J. Kaldova und P. Wieland, Chimia [Aarau, Schweiz] **20**, 434 (1966).

<sup>9)</sup> O. Schindler, Helv. chim. Acta **42**, 1955 (1959).

<sup>10)</sup> F. B. Colton, L. N. Nysted, B. Riegel und A. L. Raymond, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1123 (1957).

<sup>11)</sup> Searle & Co. (Erf. W. F. Johns), Amer. Pat. 2 944 067 (1960), C. A. **55**, 1709 e (1961).

<sup>12)</sup> Searle & Co. (Erf. F. B. Colton), Amer. Pat. 2 905 676 (1955), C. A. **54**, 3518 g (1960).

<sup>13)</sup> K. Nakama, M. Sawai und Y. Suzuki, Japan. Pat. 6667/1961, C. A. **58**, 10268 (1963).