Chem. Ber. **103**, 603–609 (1970)

Hans-Joachim Koch, Gerhard Schulz und *Klaus Kieslich*

Mikrobiologische Reduktion von 3-Keto-19-nor-5(10)-en-Steroiden zu entsprechenden 3-Hydroxy-Strukturen

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, Berlin-West

(Eingegangen am 9. September 1969)

17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3) wird mikrobiologisch zu Gemischen von 3α.17β- und 3β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10)) reduziert. Mit speziellen Hefen ist eine Reduktion überwiegend zur 3β-Hydroxy-Struktur möglich. Mit den gleichen Stämmen wurden unterschiedliche 3β-Hydroxy-5(10)-en-Strukturen aus weiteren entsprechenden 3-Keto-Substraten dargestellt.

Microbiological Reduction of 3-Keto-19-nor-5(10)-ene Steroids to the Corresponding 3-Hydroxy-compounds

17β-Hydroxy-19-nor-androst-5(10)-ene-3-one is reduced microbiologically to mixtures of 3α.17β- and 3β.17β-dihydroxy-19-nor-androst-5(10)-ene. A preferred reduction to the 3β-hydroxy structure is possible by means of special yeasts. By the same strains different 3β-hydroxy-5(10)-ene structures are prepared from the corresponding 3-keto-substrates.

Für die Einführung einer Methylgruppe in 10-Stellung bei 19-Nor-steroiden durch *Simmons-Smith*-Reaktion[1] ist als Ausgangsstruktur ein 3β-Hydroxy-5(10)-en-System erforderlich[2].

Der naheliegende Darstellungsweg über die chemische Reduktion von 3-Keto-19-nor-5(10)-en-Steroiden führt jedoch mit komplexen Metallhydriden zu Isomerengemischen, worin das entsprechende 3α-Hydroxy-19-nor-5(10)-en-Steroid überwiegt[3,4]. Auch andere Reaktionsmethoden[2] ergeben bevorzugt 3α-Hydroxyverbindungen.

Eine enzymatische Reduktion, die oft spezifischer erfolgt, war hier bisher nicht untersucht worden. Nach den vielfältigen Literaturangaben über mikrobiologische Reduktion von 3-Keto-steroiden mit unterschiedlichem Sättigungscharakter im A und B-Ring[5] war keine Gesetzmäßigkeit in der Bildung von 3α- oder 3β-Hydroxy-Strukturen zu erwarten.

---

1) *R. Ginsig* und *A. D. Cross*, J. Amer. chem. Soc. **87**, 4629 (1965).

2) *R. Rees, D. P. Strike* und *H. Smith*, J. med. Chem. **10**, 783 (1967).

3) *S. G. Levin*, J. org. Chemistry **31**, 3995 (1966).

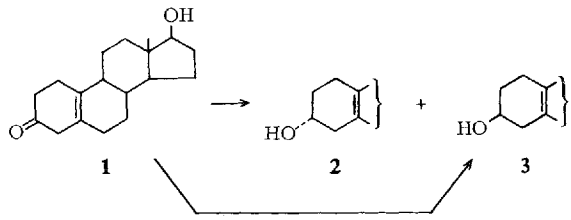
4) *S. G. Levin, N. H. Eudy* und *E. C. Farthing*, Tetrahedron Letters [London] **23**, 1517 (1963).

5) *W. Charney* und *H. L. Herzog*, Microbial Transformation of Steroids, S. 56, Academic Press New York 1967.

Zusätzlich waren als Konkurrenzreaktionen eine Isomerisierung der 5(10)-Doppelbindung zum konjugierten 3-Keto-4-en-System[6] oder eine mögliche Hydrierung der Doppelbindung[7] à priori nicht auszuschließen.

Bei systematischer Prüfung von 220 Mikroorganismen, davon 44 Bakterien, 72 Pilze, 80 Hefen sowie 24 Actinomyceten und Streptomyceten, wurden diese Nebenreaktionen am 17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3) (**1**) bei mehreren Stämmen tatsächlich beobachtet. Daneben dehydrieren einige Bakterien den A-Ring zum aromatischen System, während verschiedene Fungi durch Hydroxylierungen Nebenprodukte bilden. Bei sehr vielen Mikroorganismen traten Abbaureaktionen zu schwer nachweisbaren Skelettbruchstücken auf.

Als analytische Vergleichssubstanz diente ein bekanntes Reaktionsgemisch von 3α- und 3β-Hydroxyverbindungen (**2** und **3**), welches durch chemische Reduktion von **1** erhalten wurde. In dem Dünnschichtchromatographiesystem Isopropyläther/Amylalkohol (95 : 5) an Kieselgelplatten PF (E. Merck AG) wurde eine Auftrennung erreicht. Durch das bekannte Verhältnis der Reaktionsprodukte 3α-OH : 3β-OH (9 : 1 bis 8 : 2) und der dadurch auftretenden unterschiedlichen Fleckengröße war eine eindeutige Zuordnung der mikrobiologischen Reaktionsprodukte möglich.



Über 50% der geprüften Mikroorganismen zeigten die Fähigkeit, die 3-Ketogruppe zu reduzieren (Tab. 1).

Tab. 1. Ergebnisse von aeroben Schüttelkolben-Fermentationen (20 ccm Füllung) mit Substratkonzentrationen von 150 mg 17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3) (**1**) pro Liter Kulturbrühe und Kontaktzeiten von 20 Stdn.

	Anzahl der Mikroorganismen-Stämme				
	Keine Reduktion der 3-Ketogruppe	Überwiegende Bildung von 3α-OH	Überwiegende Bildung von 3β-OH	Fast ausschließliche Bildung von 3β-OH	Σ
Bakterien	28	10	6	—	44
Pilze	33	32	7	—	72
Hefen	23	19	32	6	80
Actinomyceten, Streptomyceten	22	2	—	—	24
	106 (48.2%)	63 (28.7%)	45 (20.4%)	6 (2.7%)	220 (100%)

[6] *F. S. Kawara*, J. biol. Chemistry **237**, 1500 (1962).

[7] *K. Schubert, J. Schlegel* und *C. Hörold*, Steroids, Suppl. **1**, 175 (1965).

Mehr als die Hälfte dieser aktiven Stämme jedoch lieferte die 3α-Hydroxyverbindung oder Gemische mit überwiegendem α-Anteil. Dagegen reduzierten 45 Stämme überwiegend zur 3β-Hydroxy-Struktur, wobei jedoch die 6 aufgeführten Bakterien wegen gleichzeitiger Isomerisierungsreaktion und die 7 Pilzstämme wegen relativ langsamer Umsetzung nur bedingt geeignet erschienen.

Als brauchbare Stämme erwiesen sich verschiedene Hefen; speziell einige *Candida species*. 5 dieser *Candida*-Arten hoben sich durch besonders spezifische Reduktion zur gewünschten 3β-Hydroxy-Struktur hervor. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Hefestamm *Pichia fermentans* erzielt.

Zum Strukturbeweis des als 3α-Hydroxyverbindung angesprochenen Produktes wurde die Umsetzung mit *Saccharomyces uvarum* (CBS 1508) im präparativen Maßstab wiederholt. Das isolierte Reaktionsprodukt war in seinen physikalischen Daten mit dem von *Levin*[3] auf chemischem Weg erhaltenen identisch.

Das gewünschte 3β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10)) (**3**) wurde durch mikrobiologische Reduktion u.a. mit den Stämmen der Tab. 2 präparativ dargestellt.

Tab. 2. Mikrobiologische Reduktion von 17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3) (**1**) zu 3β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10)) (**3**)

	Ausb.	enthaltene Verunreinig. 3α-OH
Aspergillus fischerii (ATCC 1020)	10%	(3%)
Rhodotorula mucilaginosa (NCYC 63)	11%	(10%)
Clasterosporium maydicum (CBS)	27%	(10%)
Candida krusei (NCYC 338)	21%	(8%)
Candida krusei (NCYC 562)	36%	(10%)
Candida krusei (NCYC 337)	57%	(10%)
Candida pelliculosa (NCYC 471)	46%	(5%)
Candida tropicalis St. *Monilia* (IfG)	29%	—
Pichia fermentans (NCYC 246)	52—70%	—

ATCC = American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive, Rockeville, Maryland 20852.
NCYC = National Collection of Yeast Cultures, maintained of the Brewing Ind. Res. Founs. Nutfield Surrey Great Britain.
CBS = Centralbureau voor Schimmelcultures Javallaan 20, Baarn Netherlands (für Fungi und Actinomyceten) Yeast Division Julianalaan 67A Delft, Netherlands (für Hefen).
IfG = Institut für Gärungsgewerbe, Berlin, 1000 Berlin 65, Seestraße 13.
Schering = Chemisch Mikrobiol. Abtlg., Charlottenburg.

Die Fermentation kann jedoch in allen Fällen nur mit relativ geringen Substratkonzentrationen von 150 mg/l durchgeführt werden.

Die Reduktion zum 3β-Alkohol ist mit den ausgewählten besten Hefestämmen auch auf andere Substratstrukturen übertragbar, wie an folgenden eingesetzten Verbindungen gezeigt werden konnte (Tab. 3).

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

Tab. 3. Reduktion von 3-Keto-steroiden zu den 3β-Alkoholen durch Mikroorganismen

g/Füllvol.	Eingesetztes Produkt	Mikro-organismus	Kontakt-Zeit (Stdn.)	Reaktionsprodukt	% Ausb.	Schmp.	NMR-Signale (ppm)	Summenformel (Mol.-Gew.)	Analysen	C	H	O
3.75/30 *l*	17β-Hydroxy-17α-methyl-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)[8]	A	23	3β.17β-Dihydroxy-17α-methyl-19-nor-androsten-(5(10))[9]	25	154–158°	δ 0.90 s (13-CH_3) δ 1.25 s (17α-CH_3) δ 3.90–4.20 (3-H)	$C_{19}H_{30}O_2$ (290.5)	Ber. Gef.	78.6 78.4	10.4 10.7	11.0 11.4
4.5/30 *l*	17β-Hydroxy-17α-äthinyl-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)[10]	A	34	3β.17β-Dihydroxy-17α-äthinyl-19-nor-androsten-(5(10))	29	129–135°	δ 1.10 s (13-CH_3) δ 3.35 (C≡CH) δ 4.10–4.45 (3-H)	$C_{20}H_{28}O_2$ (300.5)	Ber. Gef.	80.0 78.2	9.4 9.6	10.7 10.7
2.25/30 *l*	19-Nor-androsten-(5(10))-dion-(3.17)[11]	A	16	3β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(17)[12] 3β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))	13 9	129–130°	δ 0.90 (13-CH_3) δ 3.90–4.20 (3-H)	$C_{18}H_{26}O_2$ (274.4)	Ber. Gef.	78.8 78.7	9.6 9.6	11.7 11.9
1.5/10 *l*	19-Nor-pregnen-(5(10))-dion-(3.20)[13]	A	35	3β-Hydroxy-19-nor-pregnen-(5(10))-on-(20) 19-Nor-progesteron[14]	9.5 9	96–104°	δ 0.63 (13-CH_3) δ 2.12 (21-CH_3) δ 3.90–4.20 (3-H)	$C_{20}H_{30}O_2$ (302.5)	Ber. Gef.	79.4 79.8	10.0 10.4	10.6 10.2
2.25/15 *l*	17β-Acetoxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)	A	39	3β-Hydroxy-17β-acetoxy-19-nor-androsten-(5(10))	10	110–112°	δ 0.82 (13-CH_3) δ 2.05 (OAc) δ 3.90–4.20 (3-H) δ 4.50–4.85 (17-H)	$C_{20}H_{30}O_3$ (318.5)	Ber. Gef.	75.4 73.3	9.5 9.1	15.1 15.3
6 × 75 mg je 500 ccm (2-*l*-Schüttelkolben)	17β-Hydroxy-16β-methyl-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)[15]	A	48	3β.17β-Dihydroxy-16β-methyl-19-nor-androsten-(5(10))	26	160–161°	δ 0.77 (13-CH_3) δ 1.02 d (J = 7 Hz) (16β-CH_3) δ 3.65 ($J_{16,17}$ = 9.5 Hz) (17-H) δ 3.90–4.20 (3-H)	$C_{19}H_{30}O_2$ (290.5)	Ber. Gef.	78.6 78.0	10.4 10.7	11.0 11.6
1.3/13 *l*	17β-Hydroxy-15β.16β-methylen-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)	B	11	3β.17β-Dihydroxy-15β.16β-methylen-19-nor-androsten-(5(10))	33	158–159°	δ 0.80 (13-CH_3) δ 3.85–4.15 (3- und 17-H)	$C_{19}H_{28}O_2$ (288.4)	Ber. Gef.	79.1 78.4	9.8 10.2	11.1 11.0
2.25/15 *l*	17β-Hydroxy-13-äthyl-gonadien-(2.5(10))-on-(3)	A	42	3β.17β-Dihydroxy-13-äthyl-gonen-(5(10))	38	160–161.5°	δ 0.97 t (18-CH_3) δ 3.55–4.20 (3- u. 17-H)	$C_{19}H_{30}O_2$ (290.5)	Ber. Gef.	78.6 77.6	10.4 10.5	11.0 10.7
1.5/15 *l*	6β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)	B	36	3β.6β.17β-Trihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))[16]	5	191–193°	Massenspektrum Mol.-Gew. 290 intensives Ion bei m/e 274	$C_{18}H_{26}O_3$ (290.4)	Ber. Gef.	74.5 74.2	9.0 9.3	16.5 16.8
0.6/10 *l*	17α-Hydroxy-19-nor-pregnen-(5(10))-dion-(3.20)	A	21	3β.17α.20β-Trihydroxy-19-nor-pregnen-(5(10))	32	185–188°	δ 0.75 (13-CH_3) 1.20 d (J = 6.5 Hz) (21-CH_3) δ 3.86 q (J = 6.5 Hz) (H-20) δ 3.90–4.20 (3-H)	$C_{20}H_{28}O_3$ (316.4)	Ber. Gef.	75.9 75.9	8.9 9.3	15.2 14.9

A = *Candida tropicalis*, Stamm *Monilia* (IfG) B = *Pichia fermentans* (NCYC 246)

8) *Searle & Co.* (Erf. *F. B. Colton*), Amer. Pat. 2905676 (1955), C. A. **54**, 3518g (1960).
9) *K. Nakamo, M. Sawai* und *Y. Suzuki*, Jap. Pat. 6667 (1961), C. A. **58**, 10268 (1963).
10) *Searle & Co.* (Erf. *F. B. Colton*), Amer. Pat. 2725389 (1955), C. A. **50**, 9454e (1956).
11) *Searle & Co.* (Erf. *F. B. Colton*), Amer. Pat. 2729654 (1956), C. A. **50**, 11372f (1956).
12) *Searle & Co.* (Erf. *W. F. Johns*), Amer. Pat. 2944067 (1960), C. A. **55**, 1709e (1961).
13) *R. Gardi, C. Pedrali* und *A. Ercoli*, Gazz. chim. Ital. **93**, 525 (1963).
14) *C. Djerassi*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4440 (1953).
15) *F. A. Kincl* und *M. Garcia*, Chem. Ber. **92**, 595 (1959).
16) *M. Akthar* und *D. H. R. Barton*, J. Amer. chem. Soc. **86**, 1528 (1964).

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert. Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgelfertigplatten (Fa. Merck AG, Darmstadt) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde im System Isopropyläther/Amylalkohol (95 : 5) aufsteigend entwickelt. Zur Anfärbung wurde mit einem Reagenz aus 1 ccm konz. Schwefelsäure und 20 ccm 95proz. Äthanol angesprüht, 30 Min. bei 140° getrocknet und im UV-Licht betrachtet. Für die Säulenchromatographien diente Kieselgel G, wobei stets mit linearen Gradienten Hexan zu Hexan/Aceton (1 : 1) eluiert wurde. Die Lösungsmittel für UV waren Methanol, für NMR $CDCl_3$ (innerer Standard Tetramethylsilan, Geräte Varian A 60 (NMR) und Beckman DK 1 (UV)). Die Mikroanalysen wurden in unserem Kontrollaboratorium unter Leitung von Dipl.-Ing. *J. Huber* durchgeführt.

1. *Vorversuche*

100-ccm-Erlenmeyer-Kolben wurden mit 20 ccm eines 30 Min. bei 120° sterilisierten Mediums beschickt, mit einer Abschwemmung einer Schrägagarkultur des entsprechenden Stammes beimpft und 24 Stdn. bei 29° auf einem Rotationsschüttler (145 U/Min.) geschüttelt. Es wurden folgende Medien verwendet:

Für Bakterien: 0.1% Pepton, 0.2% Cornsteep-liquor, 0.5% Stärkezucker, 0.5% Hefeextrakt, pH nach Sterilisation 7.0—7.2.

Für Pilze: 3.0% Stärkezucker, 1.0% Cornsteep-liquor, 0.2% Natriumnitrat, 0.1% Kaliumdihydrogenphosphat, 0.2% Dikaliumhydrogenphosphat, 0.05% Magnesiumsulfat, pH nach Sterilisation 5.7—6.0.

Für Hefen: 5.0% Stärkezucker, 2.0% Cornsteep-liquor, pH nach Sterilisation 6.0—6.5.

2 ccm der vermehrten Kultur wurden unter sterilen Bedingungen in einen 100-ccm-Erlenmeyer-Kolben, gefüllt mit 20 ccm des jeweils gleichen Mediums, übergeführt und wie vorher geschüttelt. Nach 4 Stdn. wurden pro Kolben 0.15 ccm einer Lösung von *17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)* (**1**)[17] (20 mg pro 1 ccm DMF) zugegeben und weitere 20 Stdn. geschüttelt. Anschließend wurde mit jeweils 5 ccm Methylisobutylketon extrahiert. 10 bis 20 µl der Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch verglichen gegenüber unterschiedlichen Mengen eines Standardgemisches von 3α- und 3β-Hydroxyverbindung; später gegenüber definierten Mengen von isolierten Reinprodukten.

2. *3α.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))* (**2**) *durch mikrobiologische Reduktion*

a) *Mit Saccharomyces uvarum (CBS 1508)*

α) *Anzucht:* Ein 2-*l*-Erlenmeyer-Kolben wurde mit 500 ccm des Hefemediums beschickt, sterilisiert und mit einer Suspension von *Saccharomyces uvarum* — erhalten durch Abschwemmen einer Schrägagarkultur mit 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung — beimpft und 24 Stdn. bei 29° und 145 U/Min. geschüttelt.

β) *Vorkultur:* Ein 50-*l*-Fermenter aus rostfreiem Stahl wurde mit 30 *l* des Hefemediums beschickt, durch halbstündiges Erhitzen auf 120° sterilisiert und bei 29° mit 100 ccm der Anzuchtskultur beimpft. Die Vorkultur wurde 24 Stdn. bei 29° unter Rühren (220 U/Min.) und Belüftung (1.65 m^3/Stde.) vermehrt.

γ) *Fermentation:* 1.5 *l* dieser Vorkultur wurden in einen gleichen Fermenter — beschickt mit 28.5 *l* sterilen Mediums der gleichen Zusammensetzung — unter sterilen Bedingungen übergeführt und unter Belüften wie oben gerührt. Nach 6 Stdn. wurden 1.5 g *17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)* (**1**) in 20 ccm DMF zugesetzt und 28 Stdn. fermentiert.

[17] *A. L. Wilds* und *N. A. Nelson*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5366 (1953).

δ) *Isolierung:* Die Kulturbrühe wurde 2mal mit je 10 *l* Methylisobutylketon extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden i. Vak. bei 40° evaporiert. Der Rückstand wurde durch Säulenchromatographie mit Gradientenelution Hexan/Aceton aufgetrennt. Die Anfangsfraktionen enthielten ca. 20% unumgewandeltes Ausgangsmaterial, die Folgefraktionen ergaben über 500 mg rohes **2**, das aus Aceton/Hexan 352 mg Reinprodukt ergab. Schmp. 194—195°[17]. UV: ε_{206}= 5030 (Endabsorption). — NMR: δ 0.77 ppm s (13-CH_3), 3.50—3.90 (3-H und 17-H).

b) *Mit Saccharomyces chevalieri (NCYC 123)*

Unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen wurden 2.0 g **1** in 500 ccm Äthanol in 30 *l* einer wie oben angezüchteten Hefesuspension von *Saccharomyces chevalieri* 27 Stdn. fermentiert und aufgearbeitet. Beim Konzentrieren des Extraktes wurde direkt ein einheitliches kristallines Rohprodukt erhalten, das aus Aceton/Hexan 1.3 g Reinprodukt (**2**) lieferte. Schmp. 202—204°. — NMR: δ 0.77 ppm s (13-CH_3), 3.50—3.92 (3-H und 17-H).

$C_{18}H_{28}O_2$ (276.4) Ber. C 78.3 H 10.2 O 11.6 Gef. C 77.6 H 10.2 O 12.0

3. *3β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))* (**3**) *durch mikrobiologische Reduktion*

a) *Mit Aspergillus fischeri (ATCC 1020)*

Unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen wurde auf dem im screening-Versuch genannten Pilzmedium eine Kultur von *Aspergillus fischeri* angezüchtet. Nach 12 Stdn. in einem 20-*l*-Glasfermenter mit 15 *l* Füllung wurden 1.0 g *17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)* (**1**) in 50 ccm DMF zugesetzt und weitere 13 Stdn. fermentiert. Das erhaltene Rohprodukt mußte durch Säulenchromatographie gereinigt werden, wobei nur 67 mg **3** (verunreinigt mit ca. 2—3% 3α-Hydroxy-Anteil **2**) erhalten werden konnten. Schmp. 144.5—146°.

b) *Mit Candida krusei (NCYC 337)*

Unter den Bedingungen der Reduktion mit Hefen wurden 15 *l* einer Hefekultur von *Candida krusei* angezüchtet und nach 6 Stdn. mit einer Lösung von 2.25 g **1** in 75 ccm DMF versetzt. Nach 30 Stdn. Kontaktzeit wurde geerntet, aufgearbeitet und durch Säulenchromatographie gereinigt. 2.7 g Rohprodukt gaben aus Aceton/Hexan 1.29 g kristallisiertes **3** (mit 8—10% 3α-OH-Verbindung **2**), Schmp. 111—124° (vorgereinigtes Produkt).

c) *Mit Pichia fermentans (NCYC 246)*

Unter den vorstehend beschriebenen Bedingungen wurden 4.5 g **1** in 30 *l* einer wie oben angezüchteten Hefesuspension von *Pichia fermentans* 20 Stdn. fermentiert. Die Extraktion wurde bei ausbeutereichen Ansätzen vorteilhafter mit Toluol durchgeführt. Durch die dabei günstige Abtrennung von Medienstoffen und anderen Verunreinigungen (Antischaummittel) ergab der Extrakt beim Konzentrieren direkt ein relativ reines Produkt (69%). Nach einmaligem Umkristallisieren aus Hexan/Aceton erhielt man 2.4 g reines **3**, Schmp. 146—147°[18]. UV: ε_{192}= 6320 (Endabsorption). — NMR: δ 0.77 ppm s (13-CH_3), 3.50—3.85 (17-H), 3.90—4.20 (3-H).

Die folgenden Ausgangsprodukte waren bisher nicht bekannt: *17β-Hydroxy-13-äthyl-gonadien-(2.5(10))-on-(3):* 5.0 g *3-Methoxy-13-äthyl-gonadien-(2.5(10))-on-(17)*[19] wurden in 125 ccm Aceton mit 4 g *Oxalsäure* und 25 ccm *Wasser* 3 Stdn. bei Raumtemp. belassen. Die Lösung wurde in Natriumhydrogencarbonat-Lösung eingerührt, die Fällung abgesaugt, mit Wasser neutralgewaschen und getrocknet. Ausb. 3.1 g (70%), Schmp. 99—101°.

---

[18] *J. A. Hartmann*, J. Amer. chem. Soc. **77**, 5151 (1955).

[19] *C. Rufer, H. Kosmol, E. Schröder, K. Kieslich* und *H. Gibian*, Liebigs Ann. Chem. **702**, 141 (1967).

17β-Hydroxy-15β.16β-methylen-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3): 1.9 g *17β-Hydroxy-15β-16β-methylen-3-methoxy-19-nor-androsten-(5(10))*[20] wurden in 47 ccm Aceton mit 1.4 g *Oxalsäure* in 9.5 ccm *Wasser* 3 Stdn. bei Raumtemp. gespalten. Das ölig ausfallende Produkt wurde mit Äther extrahiert, der Extrakt gewaschen, getrocknet und verdampft. Das zurückbleibende Öl (1.3 g) wurde direkt zur mikrobiologischen Reduktion verwendet.

6β.17β-Dihydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3): Ein 50-*l*-Fermenter aus rostfreiem Stahl, beschickt mit 29 *l* eines sterilen Mediums aus 1% Stärkezucker und 1% Sojamehl, wurde mit ca. 1 *l* einer Anzuchtskultur *Aspergillus ochraceus* im gleichen Medium (48 stdg. Schüttelkultur, beimpft mit der Abschwemmung einer Schrägagarkultur) inoculiert und bei 29° unter Belüftung mit 1650 *l*/Stde. und Rühren mit 220 U/Min. fermentiert. Nach 8 Stdn. wurde eine Lösung von 9.0 g *17β-Hydroxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3)* (**1**) in 150 ccm Dimethylformamid zugesetzt und weitere 26 Stdn. fermentiert. Nach Abfiltrieren des Mycels wurde 2mal mit je 15 *l* Methylisobutylketon ausgerührt. Die vereinigten Extrakte wurden i. Vak. bei 40° evaporiert. Den Rückstand von 2 Ansätzen trennten wir durch Säulenchromatographie auf und erhielten 5.4 g kristallines Rohprodukt. Aus Hexan/Aceton 2.5 g Reinprodukt, Schmp. 177.5–179°.

$C_{18}H_{26}O_3$ (290.4) Ber. C 74.5 H 9.0 O 16.6 Gef. C 74.2 H 9.3 O 16.8
Mol.-Gew. 290 (Massenspektrum), intensives Ion bei *m/e* 272

Zum Strukturbeweis wurden das Diacetat und ein Oxydationsprodukt hergestellt:

6β.17β-Diacetoxy-19-nor-androsten-(5(10))-on-(3): 100 mg des vorstehenden *Diols* wurden in 2 ccm *Pyridin* mit 1 *l* *Acetanhydrid* 4 Stdn. bei Raumtemp. wie üblich acetyliert und aufgearbeitet. Das ölige Rohprodukt kristallisierte aus Isopropyläther mit Schmp. 151–154°. – NMR: δ 0.85 ppm (13-CH_3), 2.05 (2 CH_3CO), 2.5 (J = 4 Hz) (1α-, 1β-, 2α-, 2β-H), 2.8 (J = 2 Hz) (4α-, 4β-H), 5.10–5.25 (6α-H).

19-Nor-androsten-(4)-trion-(3.6.17): 450 mg des *Diols* wurden in 11 ccm *Pyridin* mit einer Lösung von 450 mg *Chrom(VI)-oxid* in 0.45 ccm Wasser versetzt. Nach 3 Stdn. Rühren bei 50° wurde mit Natriumhydrogensulfit versetzt und mit Methylisobutylketon extrahiert. Daraus erhielten wir nach Waschen, Trocknen und Evaporieren 65 mg gelbes Öl, das im UV-Spektrum ein Doppelmaximum bei 251 und 255 nm (ε ~5000) zeigte [-en-(4)-dion-(3.6) ε_{252} = 10900[21]].

17α-Hydroxy-19-nor-pregnen-(5(10))-dion-(3.20): 5.0 g *17α-Hydroxy-3-methoxy-19-nor-pregnadien-(2.5(10))-on-(20)-äthylenacetal*[22] wurden in 250 ccm Aceton mit 7.5 g *Oxalsäure* in 50 ccm *Wasser* 3 Stdn. bei Raumtemp. belassen und, wie bereits beschrieben, aufgearbeitet. Aus Methylenchlorid/Isopropyläther 2.1 g (50%) Kristalle, Schmp. 168/169–172°.

$C_{20}H_{28}O_3$ (316.4) Ber. C 75.91 H 8.92 O 15.17 Gef. C 75.86 H 9.26 O 14.85

---

[20] *O. Schmidt, K. Prezewowski, G. Schulz* und *R. Wiechert*, Chem. Ber. **101**, 939 (1968).
[21] *W. Neudert* und *H. Röpke*, Steroid-Spektrenatlas, Substanzbeispiel N 474, Springer-Verlag, Berlin 1965.
[22] *Schering AG* (Erf. *J. Hilscher*), D.A.S. 1266300 (1968).

[348/69]