

Darstellung von 6 α -Fluor-16 α -methyl-11 β .21-dihydroxy-1.4-pregnadien-3.20-dion (Fluocortolon) über eine Substrat-Struktur-gelenkte spezifische 11 β -Hydroxylierung mit *Curvularia lunata*

von Klaus Kieslich, Karl Petzoldt, Horst Kosmol und Wolfgang Koch

Aus dem Hauptlaboratorium der Schering AG, 1 Berlin-West

Eingegangen am 12. Februar 1969

Die bei der 11 β -Hydroxylierung von 6 α -Fluor-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**9b**) mit *Curvularia lunata* entstehenden Nebenprodukte **14** und **13** mit 9 α - und 14 α -Hydroxy-Funktion treten bei Einsatz der 5 α -Brom-substituierten Vorstufe **5** durch sterische Abschirmung der α -Seite nicht auf. Der weitere Synthesegang zu 6 α -Fluor-11 β .21-dihydroxy-16 α -methyl-1.4-pregnadien-3.20-dion (**15**, Fluocortolon) wird beschrieben.

*Preparation of 6 α -Fluoro-11 β ,21-dihydroxy-16 α -methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione (Fluocortolone) via Substrate-Structure-Directed Specific 11 β -Hydroxylation by *Curvularia lunata**

The formation of the by-products **14** and **13**, with 9 α - and 14 α -hydroxy groups, in the 11 β -hydroxylation of 6 α -fluoro-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3,20-dione (**9b**) with *Curvularia lunata* is inhibited by using a similar substrate with 5 α -bromo-substituent by sterical shielding of the α -side. A subsequent route for the synthesis of 6 α -fluoro-11 β ,21-dihydroxy-16 α -methyl-1,4-pregnadiene-3,20-dione (**15**) is described.

Bei der Synthese von entzündungshemmenden Corticosteroiden ist die mikrobiologische Einführung der essentiellen 11 β -Hydroxy-Gruppe ein die Ausbeute entscheidend bestimmender Reaktionsschritt. Alle aussichtsreichen 11 β -hydroxylierenden Pilzstämmen¹⁾ neigen zu erheblichen Nebenreaktionen, wobei 7 α -, 9 α -, 11 α - und 14 α -Hydroxy-Produkte entstehen.

Eine Unterdrückung dieser unerwünschten Nebenhydroxylierungen bei 17 α -Hydroxy-pregnen-Strukturen erzielten *Flines* und *van der Waard*²⁾ durch eine Vergrößerung der α -ständigen Hydroxy-Gruppe durch Acylierung und Bildung anderer Derivate.

Auf die Synthese von anti-inflammatorisch wirksamen Corticosteron-Verbindungen³⁻⁵⁾, die als Merkmal keine 17 α -Hydroxy-Gruppe besitzen, ist diese Art von sterischer Hinderung

¹⁾ A. Čapek, O. Hanč und M. Tadra, *Microbial Transformations of Steroids*, Prag 1966.

²⁾ Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek N. V., Delft (Erf. *J. d. Flines* und *F. W. van der Waard*), Holland Pat. 6605514 v. 25. 4. 1966.

³⁾ D. Branceni, G. Rousseau und R. Jequier, *Steroids* **6**, 451 (1965).

⁴⁾ G. Raspé, K. Kieslich und U. Kerb, *Arzneimittel-Forsch.* **14**, 450 (1964).

⁵⁾ A. Domenico, H. Gibian, U. Kerb, K. Kieslich, M. Kramer, F. Neumann und G. Raspé, *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 46 (1965).

der α -Hydroxylierungen nicht übertragbar. Ein von uns bereits früher gefundener Blockierungseffekt durch eine 16α -Methyl-Substitution⁶⁾ zeigte zwar auch in dieser Strukturklasse einen graduellen, aber nicht ausreichenden Einfluß.

So liefert der bestgeeignete Pilz, *Curvularia lunata*, bei der Hydroxylierung von drei unterschiedlichen Desoxycorticosteronen folgende Verhältnisse:

	11 β	14 α	7 α	9 α
21-Hydroxy-4-pregnen-3.20-dion	1	1	0.5	0
21-Hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion	4	1	1	0
6 α -Fluor-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (9b)	6	1	0	1

Der 6 α -Fluor-Substituent lenkt vermutlich durch Polarisation der Nachbarstellung die 7 α -Hydroxylierung in die 9 α -Stellung um.

Für eine vollständige Unterdrückung der an der Rückseite des Steroid-Moleküls angreifenden Nebenhydroxylierungen war demnach eine raumerfüllende Substitution im Zentrum der α -Seite notwendig. An den theoretisch geeigneten, zentralgelegenen, axialen α -Positionen 7 α , 9 α , 12 α , 14 α , 17 α ist jedoch ein sterisch blockierender Substituent, der anschließend leicht reeliminierbar sein sollte, nur über mehrere Reaktionsstufen einzubauen. Eine solche Substitution wäre beim 6 α -Fluor-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**9b**) nur unter weitgehender Abweichung vom normalen Syntheseweg möglich. Eine der möglichen Vorstufen dieser Verbindung ist jedoch ein 6 β -Fluor-5 α -brom-21-acetoxy-16 α -methyl-pregnan-3.20-dion (**5**), das mit seinem sterisch gut wirksamen 5 α -Brom-Substituenten geeignet sein sollte.

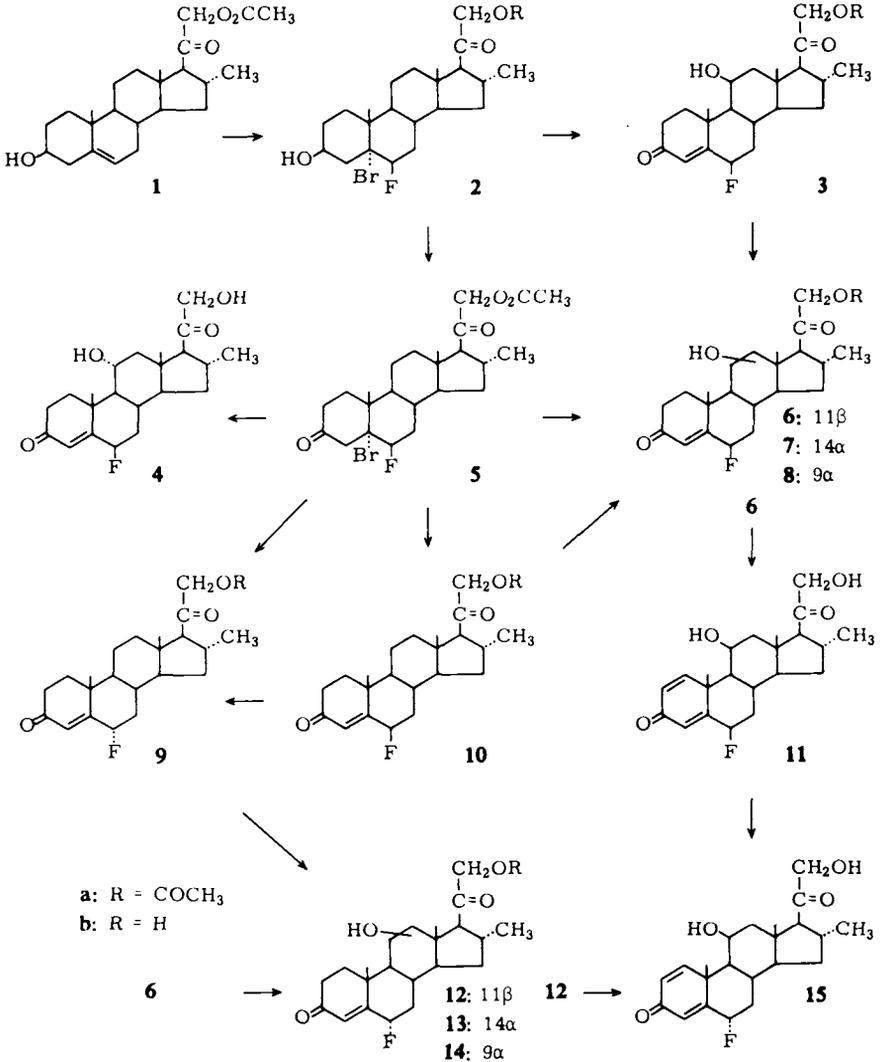
Die labile Struktur des β -Halogen-Ketons führt aber leider zu einer schnellen Abspaltung von Bromwasserstoff unter Ausbildung des 3-Keto- Δ^4 -Systems (**4**), die offensichtlich auch unter den Fermentationsbedingungen primär erfolgt. Damit liegt letztlich zur Hydroxylierung wiederum nur eine an der α -Seite des Steroides ungenügend substituierte Struktur vor. Dieses Intermediärprodukt 6 β -Fluor-21-hydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**10b**) wurde durch dünnschichtchromatographischen Vergleich mit einem authentischen Produkt identifiziert.

Auch bei der Fermentation mit *Aspergillus ochraceus* wurde dieses Intermediärprodukt vor der Hydroxylierung beobachtet, die jedoch wie erwartet zur analogen 11 α -Hydroxy-Verbindung **4** führte. Das Verhältnis von gewünschtem 11 β -Hydroxylierungsprodukt (**6**) zu den Nebenprodukten **7** und **8** mit 14 α - und 9 α -Hydroxyl-Struktur ist ähnlich dem Ergebnis bei der entsprechenden 6 α -Fluor-Verbindung (**12**, **13**, **14**). Nur die 9 α -Hydroxylierung ist demgegenüber vermindert wie bei der Fermentation von 6 β -Fluor-21-acetoxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**10a**), woraus nach vorangehender enzymatischer Verseifung die identischen 11 β - und 14 α -Hydroxy-Vergleichsprodukte (**6** und **7**) erhalten wurden.

Wegen der zu erwartenden größeren Stabilität der Vorstufe **2a** mit 3-Hydroxy-Struktur wurde diese unter gleichen Bedingungen mit *Curvularia lunata* fermentiert. Eine Substratkonzentration von 600 mg/l wurde relativ langsam umgewandelt

⁶⁾ Schering AG (Erf. K. Kieslich, G. Raspé, R. Müller, E. Olivar und B. Wagner), Dtsch. Bundes-Pat. 1 226 575 v. 13. 5. 1960 [C. A. 66, 38165 h (1967)].

(44 Stdn. Kontaktzeit). Tatsächlich wurde aber bei Fermentation in neutralem oder schwach basischem Bereich nur ein Produkt beobachtet, das in einer Ausbeute von 45% d. Th. isoliert werden konnte.



Die Verbindung besitzt nach IR- und NMR-Spektrum die Struktur eines 6 β -Fluor-3 β ,11 β ,21-trihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-20-ons (3). Somit ist auch während dieses

mikrobiologischen Prozesses nach der 21-Acetat-Verseifung zu **2b** eine Bromwasserstoff-Spaltung eingetreten. Sehr wahrscheinlich handelte es sich jedoch hier um eine Folgereaktion nach der gewünschten Hydroxylierung, so daß der sterisch wirksame Schutz des 5 α -Brom-Substituenten zunächst erhalten blieb.

Diese 3 β -Hydroxy-4-en-Struktur **3b** wird zum Schutz der 21-Hydroxy-Gruppe mit Acetanhydrid und Pb(CH₃CO₂)₂-Zusatz selektiv zum Monoacetat **3a** acetyliert. Die 3 β -Hydroxy-Gruppe dieser Verbindung kann in schlechter Ausbeute mit Dichlordicyan-chinon oder nach Oppenauer mit Methyläthylketon zum 3.20-Dion **6a** oxydiert werden. Eine mikrobiologische Dehydrierung der chemisch verseiften Verbindung **6b** mit *Arthrobacter simplex* führt zur entsprechenden 1.2-Dehydro-Verbindung **11**, die jedoch nur ölig anfiel. Die saure Isomerisierung des 6 β -Fluor-Substituenten zur 6 α -Stellung **15** verläuft unvollständig und führt zu Gemischen.

Vorteilhafter ist die Isomerisierung auf der Δ^4 -Stufe (**6a**) zum 6 α -Fluor-11 β -hydroxy-21-acetoxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**12a**), welches, wie bereits beschrieben³⁾, nach chemischer Verseifung zu **12b** mit *Bacillus lentus* (ATCC 13805) in guter Ausbeute zum 1.4-Dien **15** umgewandelt wird.

Dieser Syntheseweg, der durch die Verschiebung der mikrobiologischen Hydroxylierungsstufe auf eine sterisch günstigere Substratstruktur neu ist, kann zwar grundsätzlich durchgeführt werden, liefert aber wegen der offensichtlichen Instabilitäten der verwendeten 5 α -Brom-6 β -fluor-Steroide unbefriedigende Stoffbilanzen. Zusätzliche Ausbeuteverminderungen treten durch die Labilität des 6 β -Fluor-3 β .11 β .21-trihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-20-on (**3**) auf, welches bereits im schwach sauren Milieu der *Curvularia*-Fermentation zu Umlagerungen neigt.

Wir danken den Herren Dr. W. Neudert, Dr. G. Cleve und Dr. G. Schulz für die Interpretation der Spektren und Herrn H. Wiegelp und Frau U. Rabel für die präparative Mitarbeit.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden im Apparat nach Tottoli bestimmt und sind unkorrigiert. — Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten (Fa. Merck) verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurde im System Benzol/Essigester (1 : 4) 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. — Die Säulenchromatographie wurde an Kieselgel G mit linearen Gradienten der angegebenen Gemische vorgenommen. — Zur Messung der Spektren dienten folgende Geräte: Varian A 60 (NMR in CDCl₃, innerer Standard Tetramethylsilan), Perkin-Elmer, Modell 21, (IR) und Beckman DK 1 (UV in Methanol). — Die Mikroanalysen wurden in unserem Kontrollaboratorium unter Leitung von Dipl.-Ing. J. Huber durchgeführt.

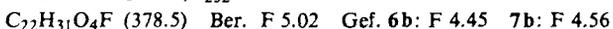
1) 6 β -Fluor-11 β .21-dihydroxy- und 6 β -Fluor-14 α .21-dihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion (**6b** und **7b**). — a) Aus 6 β -Fluor-5 α -brom-21-acetoxy-16 α -methyl-pregnan-3.20-dion⁷⁾ (**5**):

⁷⁾ K. Kieslich und N. Kerb, in Fluocortolon-Symposium Wien 1967, S. 5, Sala-Druck, Berlin 1967.

500 ccm einer 30 Min. bei 120° sterilisierten Nährlösung aus 1% Cornsteep liquor, 1% Sojapuder und 0.005% Sojaöl, eingestellt auf pH 6.2, wurde mit einer Lyophilkultur von *Curvularia lunata* beimpft und 72 Stdn. bei 30° mit einer Frequenz von 145/Min. geschüttelt. — Diese Vorkultur diente zur Beimpfung von 15 l eines bei 121° und 2.1 at sterilisierten Mediums aus 1% Cornsteep liquor, 0.5% Stärkezucker und 0.05% Sojaöl, eingestellt auf pH 6.2, in einen 20-l-Glasfermenter. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel wurde bei 29° unter Belüftung (10 l/Min.), 1.7 at Druck und Rühren (220 U/Min.) 24 Stdn. germiniert. 1 l der Kulturbrühe wurde unter sterilen Bedingungen in 14 l eines wie oben sterilisierten Mediums aus 1% Cornsteep liquor, 1.25% Sojapuder und 0.005% Sojaöl übergeführt und unter gleichen Bedingungen angezüchtet. Nach 6 Stdn. wurde eine Lösung von 3 g **5** in 90 ccm Methylcellosolve zugegeben und weiterfermentiert. Dünnschichtchromatographisch an Methylisobutylketon-Extrakten wurde zunächst beobachtet, daß **5** (R_F 0.89) sich schnell zu *6β-Fluor-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**10a**, R_F 0.85) umwandelte. Daraus bildete sich durch Verseifung offensichtlich die UV-aktive, freie 21-Hydroxy-Verbindung **10b** (R_F 0.67), die rasch hydroxyliert wurde. Nach 22 Stdn. Kontaktzeit wurde die Fermentation abgebrochen, 2 mal mit je 10 l Methylisobutylketon ausgerührt und filtriert. Die organische Phase wurde abgetrennt und die Emulsionsschicht über Glaswolle separiert.

Der Extrakt wurde bei 50° (Bad) i. Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde mit Hexan von anhaftendem Siliconöl freigewaschen und ergab ein ölig-kristallines Rohprodukt, was durch Säulenchromatographie [Gradienten-Elution Hexan/(Hexan/Aceton = 2 : 1) (1 : 1)] aufgetrennt wurde. Dabei wurde aus den unpolaren Fraktionen *6β-Fluor-14α,21-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**7b**) isoliert. Ausbeute nach Umkristallisation aus Essigester/Isopropyläther 5% d. Th. vom Schmp. 184/185–87°. — R_F 0.47; $\epsilon_{232} = 11600$.

Die folgenden Fraktionen lieferten *6β-Fluor-11β,21-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**6b**), Ausbeute nach Umkristallisieren aus Essigester/Isopropyläther 21% d. Th. vom Schmp. 221/223–25°. — R_F 0.35; $\epsilon_{232} = 11200$.



b) Aus *6β-Fluor-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion*⁸⁾ (**10a**): Wie unter 1a) wurden 3 g **10a** in 30 l Kulturbrühe mit *Curvularia lunata* 23 Stdn. fermentiert.

Nach Dünnschichtchromatographie betrug die Ausbeute vor der Ernte ca. 40% 11β-Hydroxy-Verbindung **6b** (R_F 0.39) und 5% 14α-Hydroxy-Produkt **7** (R_F 0.52) neben einem stark polaren unbekanntem Nebenprodukt. Nach Aufarbeitung wurden durch Chromatographie an *Silikagel* unter Elution mit Methylenechlorid/Chloroform 660 mg **9b** isoliert und aus Essigester/Isopropyläther umkristallisiert; 230 mg (9%) vom Schmp. 220/221–223°. — R_F 0.39; $\epsilon_{231} = 11200$. — Die Verbindung war nach IR- und NMR-Spektrum identisch mit dem nach 1a) erhaltenen Produkt.

Die 14α-Hydroxy-Verbindung **7** konnte nicht rein isoliert werden. Die unpolaren Chromatographie-Fractionen enthielten jedoch eine Substanz, die im DC-Vergleich der nach 1a) entstandenen Verbindung glich; R_F 0.5.

c) Aus *6β-Fluor-11β-hydroxy-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**6a**): 100 mg **6a** wurden in 4 ccm Methylenechlorid + 4 ccm Methanol suspendiert und unter Stickstoff und Rühren innerhalb 30 Min. mit einer Lösung von 4 mg *Natriummethylat* in 2 ccm Methanol

⁸⁾ A. Domenico, H. Gibian, U. Kerb, K. Kieslich, N. Kramer, F. Neumann und G. Raspé, *Arzneimittel-Forsch.* **15**, 3 (1965).

versetzt. Nach 15stdg. Rühren wurde mit Essigsäure auf pH 6 angesäuert, mit Methylchlorid verdünnt und 2 mal mit Wasser gewaschen. Die wäsr. Phase wurde 2 mal mit Methylchlorid reextrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit Wasser versetzt und i. Vak. konzentriert. Das ausfallende Kristallisat wurde abfiltriert und getrocknet: 70 mg vom Schmp. 218–222°. Die Verbindung war nach Dünnschichtchromatogramm und Mischprobe identisch mit dem nach 1 a) und 1 b) erhaltenen **6b**.

d) **6a** als Vergleichssubstanz: 100 mg **6b** wurden in Acetanhydrid / Pyridin bei Raumtemperatur wie üblich acetyliert und aufgearbeitet. **6a**: R_F 0.8 (Benzol Essigester = 1 : 4).

Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Aceton/Isopropyläther betrug der Schmp. 127/131–133°.

e) 10 mg 6β -Fluor- 3β - 11β -dihydroxy-21-acetoxy-16 α -methyl-4-pregnen-20-on (**3a**) wurden in 5 ccm Tetrahydrofuran gelöst, mit 25 mg 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-benzochinon-(1.4) versetzt und zum Sieden erhitzt. Nach 2 Stdn. hatten sich 50% UV-aktive Substanz (R_F -Wert 0.82, Benzol/Essigester = 1 : 4) gebildet. Die Verbindung war in mehreren DC-Systemen identisch mit **6a**.

f) 300 mg **3a** wurden in 30 ccm Benzol und 20 ccm Methyläthylketon gelöst und mit 600 mg Aluminiumisopropylat + 5 Tropfen Wasser 16 Stdn. zum Sieden erhitzt. Dann wurde mit Wasser ausgeschüttelt und nach dem Trocknen i. Vak. eingeengt. **6a** vom Schmp. 130–134° (aus Aceton/Isopropyläther).

2) 6β -Fluor-11 α -21-dihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3,20-dion (**4**). — Eine 5 Tage alte Schrägröhrchenkultur (Biomalzagar) von *Aspergillus ochraceus* wurde mit 4 ccm physiologischer Kochsalz-Lösung abgeschwemmt und diese Suspension zu 250 ccm sterilem Medium, bestehend aus 4.4% Stärkezucker, 1.5% Cornsteep liquor, 0.3% NaNO₃, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ und 0.002% FeSO₄, eingestellt auf pH 7.0, gegeben.

Nach 72stdg. Schütteln bei 30° wurden damit 30 l eines sterilen Mediums aus 2% Sojamehl (pH 6.2) in einem 50-l-Fermenter aus nichtrostendem Stahl beimpft. Unter den technischen Bedingungen von 1 a) wurde 24 Stdn. germiniert. 1.8 l dieser Kultur wurden in 28 l sterilen Mediums aus 1% Stärkezucker und 1% Sojamehl, eingestellt auf pH 6.0, übergeführt und angezüchtet. Nach 6 Stdn. wurde eine Lösung von 18 g **5** in 200 ccm DMSO zugesetzt, 44 Stdn. fermentiert und wie bei 1 a) aufgearbeitet.

Der Eindampfrückstand des Methylisobutylketon-Extraktes wurde an Silikagel mit einer Gradienten-Elution Hexan/Aceton (1 : 1) chromatographiert. **4** wurde aus Essigester/Isopropyläther umkristallisiert. Ausbeute 45% d. Th.; Schmp. 165/166–168°. — R_F 0.2, ϵ_{232} = 11 500.



3) 6β -Fluor- 3β - 11β - 21 -trihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-20-on (**3b**). — Analog Versuch 1 a) wurden 3 g 6β -Fluor-5 α -brom- 3β -hydroxy-21-acetoxy-16 α -methyl-pregnan-20-on (**2a**) gelöst in 90 ccm Methylcellosolve, in 15 l Kulturbrühe von *Curvularia lunata* fermentiert. Dabei wurde der pH-Wert während der gesamten Fermentationszeit zwischen 7.5 und 8.5 gehalten. Es wurde die Abnahme von **2a** (R_F 0.8) und des verseiften Ausgangsmaterials **2b** (R_F 0.4) kontrolliert und bei beendeter Umsetzung nach 44 Stdn. Kontaktzeit wie beschrieben geerntet und aufgearbeitet. Das ölig-kristalline Rohprodukt wurde durch Chromatographie an Silikagel, welches zuvor mit 1 n methanol. NaOH auf pH 8.0 alkalisiert wurde, mit Gradienten-

Elution Hexan/Aceton (1:1) gereinigt. Nach Umkristallisieren aus Aceton/Isopropyläther erhielt man 45% d. Th. **3b** vom Schmp. 161/162–164°; R_F 0.16. — NMR vgl. Lit. 9).



4) *6β-Fluor-3β.11β-dihydroxy-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-20-on* (**3a**). — 1.1 g **3b** wurden in 12 ccm Dimethylformamid und 2.2 ccm *Acetanhydrid* gelöst, mit 113 mg Blei(II)-acetat versetzt und 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde mit 10 ccm 10proz. Natriumacetat-Lösung versetzt und nach 10 Min. mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über wasserfreiem Natriumacetat getrocknet und i. Vak. bei 40° eingedampft. Aus Aceton/Isopropyläther kristallisierten 0.52 g (42%) **3a** (ein Ansatz mit 500 mg ergab 74% d. Th.) vom Schmp. 99–101°; R_F 0.47.



5) *6β-Fluor-11β.21-dihydroxy-16α-methyl-1.4-pregnadien-3.20-dion* (**11**). — 500 ccm eines sterilen Mediums aus *6α-Fluor-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**9a**) werden mit einer Lyophilkultur von *Arthrobacter simplex* beimpft und 48 Stdn. zur Anzucht geschüttelt. — 50 ccm der Brühe wurden mit weiteren 500 ccm des gleichen Mediums 24 Stdn. geschüttelt; dann wurden nochmals 50 ccm ebenso behandelt. Nach 6 stdg. Anwachsen wurde mit einer Lösung von 100 mg **6b** in 4 ccm Dimethylformamid versetzt und weiter geschüttelt. Nach 12 Stdn. Kontaktzeit war im Dünnschichtchromatogramm kein Ausgangsmaterial mehr zu erkennen; die 8 Ansätze wurden 2 mal mit je 2 l Methylisobutylketon extrahiert. Der filtrierte Extrakt wurde eingedampft und ergab 850 mg öligen Rückstand. Durch fraktionierte Ausfällung von Verunreinigungen aus der äther. Lösung mit Hexan erhielt man aus der so vorge reinigten Lösung zuletzt ein farbloses Öl, das sich beim Anreiben mit Hexan verfestigte. R_F 0.27 (**6b**: 0.32), $\epsilon_{241} = 8600$ (**6b**: $\epsilon_{231} = 11200$). Die entsprechenden 6α-Fluor-Verbindungen **12** und **15** zeigen analoge Unterschiede in den R_F -Werten (S. 175).

6) *6α-Fluor-11β.21-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**12b**). — a) Aus *6α-Fluor-21-acetoxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**9a**): Wie in Versuch 1 a) wurden 10 g **9a** gelöst in 100 ccm Methylcellosolve in 30 l einer Kultur von *Curvularia lunata* fermentiert. Nach 24 Stdn. Kontaktzeit waren **9a** und das Verseifungsprodukt **9b** vollständig umgewandelt. Nach Aufarbeitung wurde an *Silikagel* chromatographiert und durch Elution mit Hexan/Aceton-Gradienten in zwei Hauptfraktionen getrennt. Aus den *unpolaren Fraktionen* wurde ein DC-analytisch einheitliches Rohprodukt erhalten, das nach Umkristallisieren aus Essigester *6α-Fluor-14α.21-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnen-3.20-dion*¹⁰⁾ (**13b**) ergab. Schmp. 231/232–233°. — R_F 0.61; $\epsilon_{237} = 15200$. — NMR (in Pyridin): $\delta = 0.93, 1.10, 1.13$ (d), 3.43 ppm.



Die *polaren Eluate* enthielten zwei Verbindungen, die mit der 40fachen Menge siedendem Benzol weitgehend getrennt wurden. Der *unlösliche Anteil* wurde aus Essigester umkristall-

9) K. Kieslich und G. Schultz, Liebigs Ann. Chem. **726**, 152 (1969), voranstehend, und zwar Verbindung **2** in Tabelle I.

10) Durch das Fehlen von NMR-Spektren wurde früher der 9α-Hydroxy-Verbindung die 14α-Hydroxy-Struktur zugeschrieben³⁾. Die 14α-Hydroxy-Verbindung war früher irrtümlich als 7α-Hydroxy-Produkt angesehen worden³⁾.

siert und ergab *6 α -Fluor-9 α .21-dihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion*¹⁰⁾ (**14b**) vom Schmp. 250/252—253°. — R_F 0.34; $\epsilon_{236} = 14000$. — *NMR* (in Pyridin): $\delta = 0.83, 0.87$ (d), 1.26 ppm.



Die *Benzol-lösliche Fraktion* ergab nach Umkristallisation aus Chloroform *6 α -Fluor-11 β .21-dihydroxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**12b**) vom Schmp. 195/197—199°. — R_F 0.32; $\epsilon_{237} = 15800$.



b) Aus *6 α -Fluor-11 β -hydroxy-21-acetoxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**12a**): 10 g **12a** wurden in 40 ccm Methylenchlorid und 40 ccm Methanol suspendiert und mit einer Lösung von 320 mg *Natriummethylat* in 20 ccm Methanol wie bei 1c) beschrieben verseift und aufgearbeitet. Man erhält 7.5 g **12b** vom Schmp. 175/175—179°; nach R_F 0.33 identisch mit dem aus **9a** durch mikrobiologische Umwandlung erhaltenen Produkt.

7) *6 α -Fluor-11 β -hydroxy-21-acetoxy-16 α -methyl-4-pregnen-3.20-dion* (**12a**). — a) Aus **12b**: 1 g **12b** wurde mit 3 ccm Pyridin + 1.5 ccm *Acetanhydrid* 2 Stdn. bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann wurde in 20 ccm 8proz. kalte Schwefelsäure eingerührt; nach 1 stdg. Rühren wurde das kristalline Rohprodukt abfiltriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Äthylenchlorid umkristallisiert. Schmp. 246/247—249°; R_F 0.45 (Cyclohexan/Essigester = 1 : 1).



b) Aus **6a** mit konz. Salzsäure: 50 mg **6a** wurden in 2 ccm Dimethylformamid gelöst, mit 0.5 ccm konz. Salzsäure versetzt und 22 Stdn. bei Raumtemperatur belassen. Nach Neutralisation mit Na_2CO_3 -Lösung wurde mit Methylisobutylketon extrahiert. Der Extrakt wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und evaporiert. Der kristalline Rückstand war nach DC-Analyse (R_F 0.3) identisch mit **12a** und enthielt noch geringe Anteile **6a** (R_F 0.4).

c) Aus **6a** mit *HCl-Gas*: Durch eine Lösung von 20 mg **6a** in 20 ccm Chloroform wurde bei 0° ein trockner *HCl-Strom* durchgeleitet. Nach 22 Stdn. wurde i. Vak. eingeengt, mit $NaHCO_3$ Lösung und Wasser gewaschen und eingedampft. Der Rückstand (14 mg) bestand nach DC bis auf Spuren von Ausgangsmaterial aus **12a**.

8) *6 α -Fluor-11 β .21-dihydroxy-16 α -methyl-1.4-pregnadien-3.20-dion* (**15**). — a) Aus *6 β -Fluor-Verbindung 11*: Durch eine Lösung von 60 mg **11** in 30 ccm Chloroform wurde bei 0° ein trockner *HCl-Strom* geleitet; nach Sättigung wurde stehengelassen. In Abständen wurde die Gasdurchführung wiederholt. Selbst nach 90 Stdn. wurde nur ein Gemisch von **11/15** = 1 : 1 erhalten (R_F 0.31 bzw. 0.25 in Cyclohexan/Essigester = 1 : 1); es wurde nicht weiter aufgetrennt.

b) Aus **12a**: Eine Lyophilkultur von *Bacillus lentus* (ATCC 13805) wurde mit 200 ccm eines Mediums aus 1.2% Cornsteep und 1.5% Pepton 2 Tage bei 30° geschüttelt.

Mit dieser Suspension wurden 30 l einer sterilen Nährlösung aus 0.1% Hefeextrakt, 0.5% Cornsteep liquor und 0.2% Glucose in einem 50-l-Fermenter aus rostfreiem Stahl beimpft.

Nach 24 stdg. Vermehrung bei 28° wurden wie im Versuch 1a) 1.8 l der Kultur unter sterilen Bedingungen in einen gleichgroßen Fermenter mit 28 l der gleichen, sterilisierten Nährlösung übergeführt.

Nach 6 Stdn. Anwachszeit wurde eine Lösung von 6 g (**12b**) in 200 ccm DMF zugesetzt und 40 Stdn. fermentiert. Nach DC-Analyse war zu diesem Zeitpunkt das Ausgangsmaterial vollständig umgesetzt. Die Aufarbeitung lieferte 5.5 g Rohprodukt, nach Umkristallisieren aus Essigester/Benzol 4.8 g **15** vom Schmp. 180/181 – 182° (205 – 207°). — R_F 0.25 (**12b**: 0.30); $\epsilon_{242} = 15900$.

$C_{22}H_{29}O_4F$ (376.5) Ber. F 5.1 Gef. F 4.9

[36/69]