

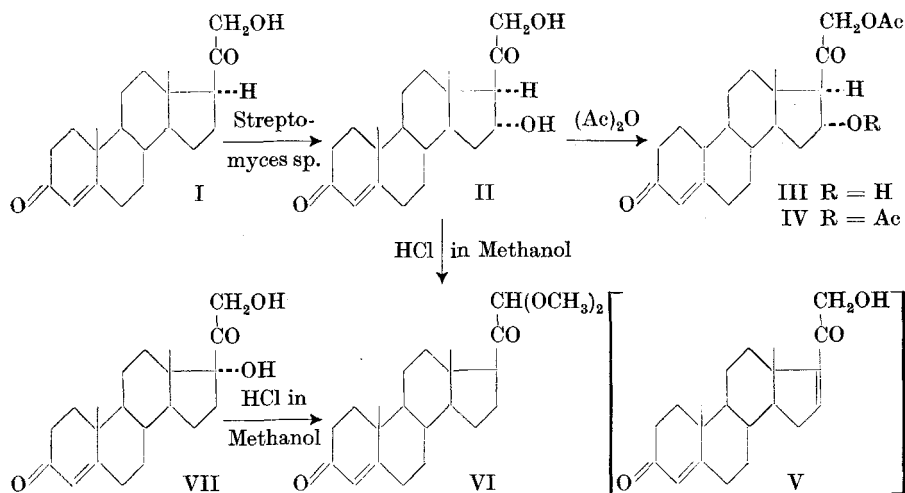
40. 16 α -Oxy-cortexon¹⁾.Mikrobiologische Reaktionen, 3. Mitt.²⁾

von E. Vischer, J. Schmidlin und A. Wettstein.

(14. XII. 53.)

Kürzlich berichteten *Hirschmann, Hirschmann & Farrel*³⁾ in einer vorläufigen Mitteilung über eine etwa achtstufige Synthese von 16 α -Acetoxy-cortexon-acetat (16 α , 21-Diacetoxy-progesteron, IV) aus $\Delta^{5,16}$ -Pregnadien-3 β -ol-20-on. Dabei erwähnten sie auch die enzymatische Hydrolyse des Diacetates IV, ohne dass das Hydrolyseprodukt bisher chemisch charakterisiert worden wäre.

Diese Notiz veranlasst uns, die äusserst einfache Gewinnung des freien 16 α -Oxy-cortexons (II) in nur einer mikrobiologischen Reaktionsstufe aus Cortexon (11-Desoxy-corticosteron, I) bekanntzugeben. Bei der aeroben Einwirkung von Schüttel-Kulturen einer Anzahl *Streptomyces*-Stämme auf Cortexon erhielten wir eine neue, im Papierchromatogramm verhältnismässig polare Verbindung vom Smp. 203–205° und der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{24} = +114,5^0$ (Äthanol).



Sie liess sich leicht durch Chromatographie an Silicagel, noch besser aber durch Entmischung zwischen Benzol und 25-proz. Äthanol reinigen. Die auf $C_{21}H_{30}O_4$ stimmende Analyse ergab den Eintritt nur

¹⁾ 121. Mitt. „Über Steroide“; 120. Mitt. siehe *Helv.* **36**, 1803 (1953).

²⁾ 2. Mitt. siehe *Exper.* **9**, 371 (1953).

³⁾ *H. Hirschmann, F. B. Hirschmann & G. L. Farrel, Am. Soc.* **75**, 4862 (1953).

eines Sauerstoffatoms. Die Substanz enthält nach ihrem UV.-Spektrum ($\lambda_{\text{max.}} = 241 \text{ m}\mu$; $\epsilon = 16300$; in Äthanol) noch die unveränderte Δ^4 -3-Ketogruppierung und entsprechend ihrem Reduktionsvermögen (Silberdiammin) die α -Ketol-Seitenkette. Da sie mit einem Überschuss von Acetanhydrid in Pyridin bei Zimmertemperatur ein Diacetat vom Smp. $151-154^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +113^\circ$ (Äthanol), mit wenig mehr als 1 Äquivalent Acetanhydrid ein Monoacetat bildete, ist die neue Sauerstoff-Funktion als verhältnismässig leicht acetylierbare sekundäre Hydroxylgruppe anzunehmen.

Die bekannten 6α -¹⁾, 6β -¹⁾²⁾³⁾ und 11α -²⁾⁴⁾Oxy-cortexone bzw. ihre Diacetate schieden beim Vergleich mit unserem Oxy-cortexon bzw. seinem Diacetat für die Formulierung der letzteren Verbindungen aus. Dagegen stimmten die Eigenschaften des 16α ,21-Diacetoxy-progesterons (IV), und zwar auch die Banden des IR.-Spektrums, mit denjenigen unseres Diacetates überein⁵⁾.

Die Konstitution unseres Oxy-cortexons ergab sich insbesondere aus der Einwirkung von Chlorwasserstoff in Methanol⁶⁾, welche vermutlich über V oder sein Δ^{20} -Endiol in glatter Reaktion das α -Ketoaldehyd-dimethyl-acetal VI lieferte. Dieses stimmte mit einer aus Reichstein's Substanz S (VII) analog bereiteten Verbindung sowie mit der aus dem freien Ketoaldehyd durch Acetalisierung hergestellten Substanz⁷⁾ in Smp. und Misch-Smp. überein.

Wenn man bei dieser Reaktion weitergehende Umlagerungen ausschliesst, so bleiben für unser Oxy-cortexon nurmehr die Formeln eines 16α - oder 16β -Oxy-cortexons. Dass erstere zutrifft, zeigte, neben dem Vergleich des Diacetats mit demjenigen von Hirschmann⁵⁾, die Untersuchung der molekularen Drehungsbeiträge. Perlman et al.⁸⁾, die bei der mikrobiologischen Hydroxylierung von Progesteron mittels eines Actinomyceten-Stammes ein 16α -Oxy-progesteron erhalten hatten, stellten bei letzterem bzw. seinem Acetat folgende Drehungsverschiebungen gegenüber Progesteron fest: $M_{\text{D}}^{16\alpha\text{OH-H}} = -82^\circ$; $M_{\text{D}}^{16\alpha\text{OAc-H}}$

¹⁾ P. T. Herzog & M. Ehrenstein, J. Org. Chem. **16**, 1050 (1951).

²⁾ S. H. Eppstein, P. D. Meister, D. H. Peterson, H. C. Murray, H. M. Leigh, D. A. Lytle, L. M. Reinecke & A. Weintraub, Am. Soc. **75**, 408 (1953).

³⁾ W. J. Haines, Recent Progress in Hormone Research **7**, 282 (1952).

⁴⁾ F. W. Kahnt, Ch. Meystre, R. Neher, E. Vischer & A. Wettstein, Exper. **8**, 422 (1952); J. Fried, R. W. Thoma, J. R. Gerke, J. E. Herz, M. N. Donin & D. Perlman, Am. Soc. **74**, 3962 (1952).

⁵⁾ Zusatz bei der Korrektur: Inzwischen hat Hr. Dr. Hirschmann, Cleveland, Ohio, freundlicherweise sein Diacetat mit dem unsrigen verglichen und dabei Übereinstimmung im Misch-Smp. und IR.-Spektrum festgestellt.

⁶⁾ Methode vgl. V. R. Mattox, Am. Soc. **74**, 4340 (1952).

⁷⁾ H. Reich & T. Reichstein, Helv. **22**, 1124 (1939).

⁸⁾ D. Perlman, E. Titus & E. Fried, Am. Soc. **74**, 2126 (1952).

= -205° (in CHCl_3)¹⁾. Bei unserem Oxy-cortexon bzw. seinem Diacetat wurden im Vergleich mit Cortexon bzw. dessen Acetat als Drehungsbeiträge der neuen Oxy- bzw. Acetoxygruppe -191° bzw. -168° (in Äthanol) errechnet, also ebenfalls stark negative Werte. Bei 16β -Oxy- bzw. -Acetoxy-Verbindungen wären sehr starke Drehungsverschiebungen nach der positiven Seite zu erwarten gewesen¹⁾.

Die somit für unser Hydroxylierungsprodukt abgeleitete Konstitution eines 16α -Oxy-cortexons (II) ist früher von *Simpson & Tait*²⁾ tentativ als eine der Formulierungen für das hochwirksame Mineralocorticoid Electrocortin in Betracht gezogen worden. Wohl veranlasst durch das Vorkommen verschiedener 16α -Oxy-steroiden im Urin und die nachgewiesene 16α -Hydroxylierung mittels Leber-Schnitten³⁾, hat man später dem Electrocortin etwas voreilig die Formel eines 16 -Oxy-cortexons zugeschrieben⁴⁾. Die an dem inzwischen kristallisiert erhaltenen Wirkstoff⁵⁾ erhobenen, noch nicht publizierten Befunde schließen eine solche Struktur aus. Im Glykogentest⁶⁾ erwies sich unser 16α -Oxy-cortexon noch in 1000facher Menge der Grenzdosis von Cortison bzw. in 5facher Menge der an sich schon sehr hohen Grenzdosis von Cortexon als unwirksam. Im Lebenserhaltungstest am nebennierenlosen Hund⁷⁾ zeigte es hingegen eine deutliche Wirkung, die z. Z. qualitativ und quantitativ noch abgeklärt wird. Über die Resultate der biologischen Untersuchungen soll noch eingehender berichtet werden.

Experimenteller Teil⁸⁾.

16α -Oxy-cortexon (II): 4 l einer Nährlösung, enthaltend 40 g Rohglucose, 20 g Pepton, 20 g NaCl, 12 g Oxo Lab Lemco (Fleischextrakt) und 40 g CaCO_3 in Leitungs-

¹⁾ Aus früheren Arbeiten ergeben sich für die Drehungsbeiträge der 16α -OH, bzw. 16α -OAc-Werte von etwa -44° bis -71° bzw. -276° bis -333° . Siehe u.a. *H. Hirschmann, F. B. Hirschmann & M. A. Daus*, J. Biol. Chem. **178**, 751 (1949); *H. Hirschmann & F. B. Hirschmann*, ibid. **184**, 259 (1950); *D. K. Fukushima & T. F. Gallagher*, Am. Soc. **73**, 196 (1951).

²⁾ *S. A. Simpson & J. F. Tait*, Memoirs of the Society for Endocrinology, Memoir Nr. 2, 9 (1953).

³⁾ *J. J. Schneider & H. L. Mason*, J. Biol. Chem. **172**, 771 (1948).

⁴⁾ Lancet **265**, 551 (1953); Farmaceutisk Revy **1953**, 695; Drug Trade News **1953** 7. XII.

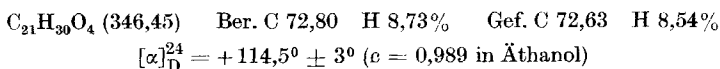
⁵⁾ *S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. von Euw & T. Reichstein*, Exper. **9**, 333 (1953); *V. R. Mattox, H. L. Mason & A. Albert*, Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **28**, 569 (1953).

⁶⁾ *E. H. Venning, V. E. Kazmin & J. C. Bell*, Endocrinology **38**, 79 (1951); *M. Sprechler*, Acta Endocrinol. **6**, 133 (1951).

⁷⁾ Lit. siehe in ⁵⁾. Herrn Dr. *F. Gross* sei auch hier bestens für diese Bestimmung gedankt.

⁸⁾ Die Smp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert.

wasser, wurden mit verd. NaOH auf pH 7,5 gebracht, gleichmässig auf vierzehn *Erlenmeyer*-Kolben von einem Liter Fassungsvermögen verteilt und sterilisiert. Nach Impfen mit dem *Streptomyces*-Stamm No. 7747 (Institut für spez. Botanik, ETH., Zürich)¹⁾ wurden sie bei 27° auf einer rotierenden Maschine geschüttelt (200 U/Min.). Nach 48 Std. hatte sich der Organismus gut entwickelt. Unter sterilen Bedingungen wurde dann eine Lösung von 1,0 g Cortexon (I) in 45 cm³ Methanol gleichmässig zu den 14 Kulturen gegeben und noch weitere 48 Std. bei 27° geschüttelt. Das Mycel wurde abgetrennt und das Kulturfiltrat (pH 7,95) erschöpfend mit Essigester ausgeschüttelt. Den Extrakt wusch man mit 0,1-n. Salzsäure, 2-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, trocknete ihn über Natriumsulfat und dampfte ihn im Vakuum bei 30° ein. Der Rückstand (970 mg) wurde in warmem Benzol aufgenommen und an einer mit Benzol bereiteten Säule von 30 g Silicagel nach der Durchlaufmethode chromatographiert. Es wurde mehrere Male mit je 100 cm³ Benzol, Äther, Äther-Essigester 19:1, Äther-Essigester 1:1, Essigester und Methanol eluiert. Die papierchromatographische Untersuchung²⁾ der einzelnen Fraktionen zeigte, dass in den Benzol- und Ätherfraktionen Ausgangsmaterial und eine höher polare Substanz vorlag, die im Phosphorsäuretest³⁾ eine intensive Orangefärbung gab. Die letztere, im Vergleich mit Cortison etwas weniger polare Substanz war der Hauptbestandteil der Äther-Essigester- und der Essigesterfraktionen. Diese wurden vereinigt (387 mg). Durch Umkristallisieren aus Aceton erhielt man Nadeln vom Smp. 196–201°. Umkristallisieren aus Methanol ergab gut ausgebildete Prismen vom Smp. 203–205°. Zur Analyse wurde 4 Std. im Hochvakuum bei 80° über P₂O₅ getrocknet.



Absorptionsbanden bei: 5,83 (20-Keton); 5,97 (Δ^4 -3-Keton); 6,16 (Δ^4); 2,70 und 2,84 μ (Oxygruppen) in Chloroform und 241 m μ ($\epsilon = 16300$) in Äthanol.

Die Methanolfractionen des Chromatogramms enthielten nur wenig hochpolares Material, das nicht näher untersucht wurde.

In einem analogen Ansatz, bei dem man 2,5 g Cortexon (I) einsetzte, wurde der Essigesterextrakt des Kulturfiltrates in gleicher Weise eingedampft und der Rückstand (2,115 g) im Gegenstromverfahren aufgetrennt. Dazu löste man in 105 cm³ abs. Alkohol und 315 cm³ Wasser und zog mit 420 cm³ Benzol aus. Die untere Schicht wurde abgetrennt und pas-sierte 6 weitere Scheidetrichter, die mit je 420 cm³ mit 25-proz. Alkohol gesättigtem Benzol beschickt waren. Diese Prozedur wurde sechsmal wiederholt, so dass schliesslich 7 Benzol- und 7 wässrige Alkoholphasen vorlagen. Letztere wurden im Vakuum konzentriert und mit Essigester ausgeschüttelt. Die Extrakte und die Benzol-Lösungen wurden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingedampft und papierchromatographisch untersucht. Die erste Benzol-Lösung enthielt nur I und Verunreinigungen, während II in den übrigen Benzol-Lösungen und den drei letzten wässrigen Alkohol-Lösungen nachgewiesen wurde. Diese Fraktionen wurden vereinigt und gaben nach Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther und aus Methanol 350 mg reines II. Aus den Mutterlaugen konnten noch weitere 63 mg II gewonnen werden.

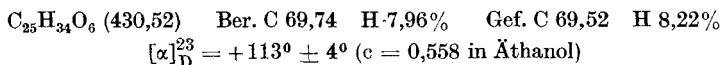
Diacetat (IV): 18 mg 16 α -Oxy-cortexon (II) wurden in 1 cm³ Pyridin gelöst und mit 1 cm³ Essigsäureanhydrid versetzt. Die Lösung wurde 16 Std. bei 23° stengelassen, schliesslich 1 Std. auf 40° erwärmt, dann unter Kühlung mit etwas Wasser versetzt und

¹⁾ Wir danken Prof. Dr. E. Gäumann und Dr. L. Ettlinger bestens für Überlassung von *Streptomyces*-Stämmen.

²⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **35**, 276 (1952). System Propylenglykol-Toluol siehe R. B. Burton, A. Zaffaroni & E. H. Keutmann, *J. Biol. Chem.* **188**, 763 (1951).

³⁾ R. Neher & A. Wettstein, *Helv.* **34**, 2278 (1951).

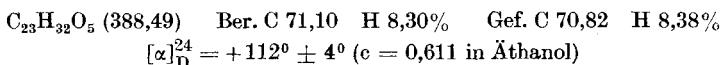
nach 1 ½ Std. im Vakuum bei 40° eingedampft. Den Rückstand nahm man in Äther auf und wusch die Lösung unter Eiskühlung je dreimal mit 0,1-n. Schwefelsäure, 1-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung wurde eingedampft, der Rückstand (25 mg) in wenig Benzol gelöst und an einer Säule von 1,0 g alkalifreiem Aluminiumoxyd chromatographiert. Die mit Benzol und Äther eluierten Fraktionen gaben beim Befeuchten mit Methanol Kristalle und wurden vereinigt (21 mg). Nach Umkristallisieren aus Aceton-Petroläther erhielt man das Diacetat IV als Nadeln vom Smp. 151–154°. Zur Analyse wurde 4 Std. bei 70° im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet.



Absorptionsbanden bei: 5,74, mit schwacher Schulter bei 5,70 (Acetat und 20-Keton); 5,94 (Δ⁴-3-Keton); 8,16 mit Nebenmaximum 8,10 μ, in CS₂. Vergleiche die Banden der Hirschmann'schen Substanz.

Durch 2stündiges Kochen in Eisessig wurde das Diacetat IV nicht verändert. Auch durch 12stündige Einwirkung von Al-Isopropylat in Toluol bei Zimmertemperatur blieb die Verbindung unangegriffen.

Monoacetat (III): Eine Lösung von 86 mg 16α-Oxy-cortexon (II) in 3 cm³ Aceton wurde mit 3 cm³ abs. Benzol versetzt und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde 1 Std. bei 35° im Hochvakuum getrocknet, dann in 1 cm³ frisch destilliertem abs. Pyridin gelöst und mit 0,35 cm³ einer 10-proz. Lösung von Essigsäureanhydrid in abs. Benzol (entspr. 1,4 Mol. Essigsäureanhydrid) versetzt. Die Lösung liess man 16 Std. bei 23° stehen und dampfte sie dann im Vakuum bei 35° ein. Der Rückstand wurde in Äther-Chloroform 4:1 aufgenommen und die Lösung je 3mal unter Eiskühlung mit 0,5-n. Schwefelsäure, 2-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen, über wenig Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das rohe Gemisch (99 mg) wurde in wenig Benzol gelöst und an einer aus 5 g alkalifreiem Aluminiumoxyd bereiteten Säule chromatographiert. Während mit Äther und Äther-Essigester gemischen 29 mg des Diacetates IV eluiert wurden, erhielt man aus den Essigesterfraktionen papierchromatographisch einheitliches Monoacetat III (48 mg). Die Methanolfractionen enthielten noch Spuren von Ausgangsmaterial II. Das Monoacetat kristallisierte aus Methanol-Äther in feinen Prismen vom Smp. 207–209°. Im Gemisch mit dem freien 16α-Oxy-cortexon (II) zeigte es eine starke Smp.-Erniedrigung. Zur Analyse wurde 5 Std. bei 70° im Hochvakuum über P₂O₅ getrocknet.



Δ⁴-3,20-Diketo-21,21-dimethoxy-pregnen (VI). a) Aus Δ⁴-17α,21-Dioxy-3,20-diketo-pregnen (VII): 346,5 mg VII (Reichstein's Substanz S) übergoss man mit 20 cm³ wasserfreier 0,275-n. Salzsäure in Methanol und kochte die entstandene Lösung unter Feuchtigkeitsausschluss 2 Std. auf dem Wasserbad. Das Reaktionsgemisch wurde alsdann auf Raumtemperatur abgekühlt, unter Umschwenken mit 5 cm³ Wasser versetzt und das Methanol im Vakuum abdestilliert. Das Rohprodukt löste man in Äther, wusch die Lösung mit 2-proz. Natriumcarbonatlösung und Wasser, trocknete sie mit Natriumsulfat und dampfte sie ein. Der amorphe Rückstand (398 mg) wurde in 16 cm³ Benzol gelöst, mit 64 cm³ Hexan versetzt und an 10 g Aluminiumoxyd chromatographiert. Die mit Hexan-Benzol-Gemischen (4:1) und (1:1), reinem Benzol und Benzol-Äther-Gemisch (9:1) erhaltenen Eluate (total 241 mg) kristallisierten aus Petroläther und ergaben insgesamt 201 mg farblose Oktaeder vom Smp. 86,5–87,5°. Die Substanz erwies sich nach Smp. und Mischprobe mit authentischem Δ⁴-3,20-Diketo-21,21-dimethoxy-pregnen (VI), das wir zum Vergleich aus dem freien Ketoaldehyd bereiteten, als identisch.



b) Aus 16 α -Oxy-cortexon (II): Eine Lösung von 35 mg II vom Smp. 198–202° in 2,5 cm³ wasserfreier 0,275-n. methanolischer Salzsäure wurde 2 Std. unter Rückfluss gekocht. Nach dem Abkühlen setzte man dem Gemisch 0,625 cm³ Wasser zu und destillierte hierauf das Methanol im Vakuum bei 25° ab. Durch Extrahieren mit Äther, Waschen mit 2-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser, Trocknen und Eindampfen im Vakuum liessen sich 34 mg Neutralstoffe abtrennen, die an 2,0 g Aluminiumoxyd nach der Durchlaufmethode fraktioniert wurden. Gemische von Hexan und Benzol (4:1) und (1:1) lösten nur Spuren amorpher Substanz ab. Die mit reinem Benzol und Benzol-Äther-Gemisch (9:1) erhaltenen Eluate kristallisierten aus Petroläther und ergaben insgesamt 10 mg VI in farblosen Oktaedern vom Smp. 86,5–87,5°. Mischproben mit dem aus VII erhaltenen Umlagerungsprodukt (siehe vorstehenden Abschnitt) als auch mit authentischem Δ^4 -3,20-Diketo-21,21-dimethoxy-pregnen (VI) schmolzen genau gleich. Im papierchromatographischen Verhalten bestand zwischen den drei Präparaten ebenfalls völlige Übereinstimmung.

Die im Chromatogramm später folgenden, mit Äther abgelösten Anteile (total 13 mg) enthielten eine papierchromatographisch einheitliche, von VI eindeutig verschiedene Substanz, die jedoch bisher nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte.

Die Analysen und die Aufnahmen der UV.-Spektren wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. H. Gysel durchgeführt. Die IR.-Spektren verdanken wir Herrn Dr. E. Ganz.

SUMMARY.

Submerged cultures of several species of streptomyces under aerobic conditions converted cortexone into 16 α -hydroxy-cortexone. The diacetate of this new compound is identical with a compound obtained by *Hirschmann* et al. in a chemical multistage synthesis.

Forschungslaboratorien der *CIBA Aktiengesellschaft*, Basel,
Pharmazeutische Abteilung.
