

Hydroxylierungen von Steroiden durch biologische Methoden*

Von KLAUS FLOREY, dipl. Chemiker

Division of Steroid Research, Department of Research Medicine
University of Pennsylvania, Philadelphia Pa., U. S. A.

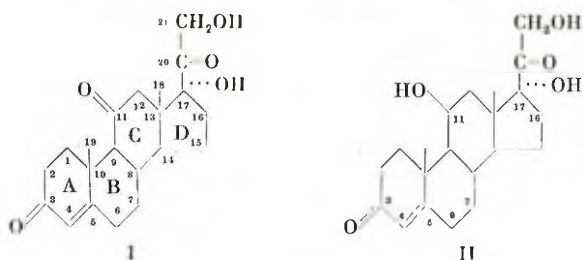
In der Umwandlung leicht zugänglicher, aber im Ring C unsubstituierter Steroide in die therapeutisch wichtigen Nebennierenrindenhormone, Cortison (I) und 17-Oxy-corticosteron (Reichsteins Substanz M; Kennalls Substanz F) (II), erwies sich die Einführung von Sauerstoff am Kohlenstoffatom 11 als die schwierigste

Hormone Cortison (I) und 17-Oxy-corticosteron (II) oder in Zwischenprodukte übergeführt werden können. Letztere sind dann leicht auf chemischem Wege in diese Hormone umwandelbar.

Perfusion durch intakte Nebennieren

HECHTER und Mitarbeiter² wählten die in der Physiologie oft benutzte Perfusionsmethode, um den Mechanismus der Hormonsynthese in der Nebenniere zu studieren. Von ihren vielen interessanten Beobachtungen sollen nur diejenigen hier besprochen werden, die sich mit der Hydroxylierung von zugesetzten Steroidsubstraten befassen. Für diese Versuche wurden Rindernebnieren verwendet, die innerhalb von 60-90 Minuten nach Schlachtung der Tiere in einem Perfusionsapparat montiert wurden³. Das Steroidsubstrat wurde homologem Zitratblut zugesetzt, das arteriell mit oder ohne Rezirkulation eine bestimmte Zeit durch die Nebenniere perfundiert wurde. Als die beste Methode für die Isolierung der Steroide aus dem Perfusat erwies sich Adsorption an aktivierte Kohle, darauffolgende Eluierung mit organischen Lösungsmitteln und direkte Chromatographie an Silikagel, verbunden mit papierchromatographischer Analyse⁴.

Mit dieser Technik konnten HECHTER und Mitarbeiter⁵ erstmalig die direkte 11 β -Hydroxylierung von Desoxycorticosteron (III) zu Corticosteron (IV) demonstrieren. Der Prozentsatz der Umwandlung von Desoxycorticosteron in Corticosteron hing von einer Reihe von Faktoren ab, wie z. B. der Konzentration des Substrats, der Perfusionsdauer und dem Durchströmungsdruck. Das 11 β -Hydroxylierungspotential der Rindernebniere wurde auf mehr als 100 mg pro Stunde und Drüse geschätzt. Durch Zusatz von Adrenocorticotropin (ACTH) wurde die Oxydationsfähigkeit nicht erhöht. Jedoch in Perfusionsstudien ohne Substratzusatz erhöhte ACTH die Ausschüttung von Corticosteroiden. Die obenerwähnten Forscher² hatten Grund, anzunehm-



Aufgabe. Dank intensiver Bearbeitung in einer Reihe von Laboratorien kann dieses Problem heute als weitgehend gelöst betrachtet werden¹. Allerdings erfordern die ausgearbeiteten Methoden eine Reihe umständlicher chemischer Stufen.

Ein origineller Weg, Steroide in einem Arbeitsgange in die entsprechenden 11-Oxy-derivate überzuführen, wurde in den letzten vier Jahren durch Anwendung der drei folgenden biologischen Methoden besprochen: 1. Perfusion durch intakte Nebennieren; 2. Inkubationen mit Gewebsschnitten und -homogenaten; 3. mikrobiologische Fermentationen, angeregt durch die Erfolge auf dem Gebiet der Antibiotika.

Die mit den ersten beiden Arbeitsweisen erzielten Ergebnisse bilden einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Hormonsynthese in der Nebennierenrinde. Die Fermentationsmethode ist nicht nur von akademischem Interesse, sondern auch von großer praktischer Bedeutung, denn sie führte zu neuen Prozessen, in denen Abbauprodukte pflanzlicher Steroide durch Einführung von Sauerstoff am Kohlenstoffatom 11 direkt in die

* Diese Literaturübersicht ist die Übersetzung eines Abschnittes einer unter Leitung von Prof. Dr. M. EBBENSTEIN durchgeführten Doktordissertation. (KLAUS GEORG FLOREY: Investigations on Steroids. Thesis submitted to the Graduate School of Arts and Sciences of the University of Pennsylvania in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy. June 1954).

¹ Vgl. die Übersicht G. ROSENKRANZ und F. SONDIHEIMER, *Syntheses of Cortisone*, Fortschritte der Chemie, Org. Naturstoffe X, 274-389 (1953).

² Vgl. O. HECHTER, A. ZAFFARONI, R. JACOBSEN, H. LEVY, R. JEANLOZ, V. SCHENKER und G. PINCUS, *Recent Prog. Hormone Res.* VI, 215 (1951).

³ O. HECHTER, *Endocrinology* 42, 285 (1948).

⁴ H. LEVY, R. JEANLOZ, C. W. MARSHALL, R. JACOBSEN, O. HECHTER, V. SCHENKER und G. PINCUS, *J. Biol. Chem.* 203, 433 (1953).

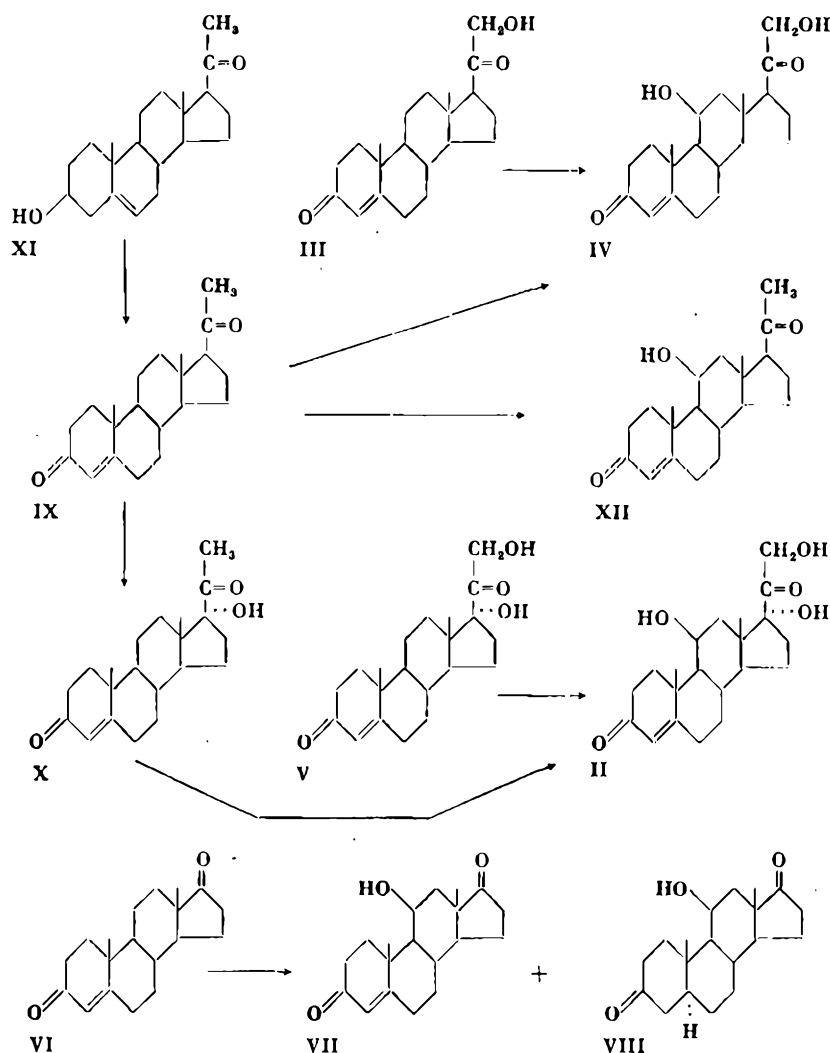
⁵ O. HECHTER, R. JACOBSEN, R. JEANLOZ, H. LEVY, C. MARSHALL, G. PINCUS und V. SCHENKER, *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 3261 (1949).

men, daß dies auf *de novo*-Synthese und nicht auf Ausschüttung schon in der Drüse vorhandener Steroide zurückzuführen sei.

Ferner wurde Reichsteins Substanz S (V) zu 17-Oxy-corticosteron (Reichsteins Substanz M; Kendalls Substanz F) (II) oxydiert und Δ^4 -Androsten-3,17-dion (VI) zu Δ^4 -11 β -Oxy-androsten-3,17-dion (VII) und kleinen Mengen einer teilweise reduzierten Substanz, 11 β -Oxy-androstan-3,17-dion (VIII)⁸. Die Isolierung dieser letzteren Verbindung zeigte erstmalig die Gegenwart eines reduktiven Enzymsystems in der Nebennierenrinde, während die Fähigkeit anderer Organe, den Ring A des Steroidgerüsts zu reduzieren, schon länger bekannt ist⁷. – Vinyl-testosteron und Δ^4 -17 α ,20,21-Trioxy-pregnen-3-on wurden durch Perfusion nicht in die entsprechenden 11 β -Oxy-derivate umgewandelt. Weitere Beispiele, die die Selektivität der Nebennierenfermente illustrieren, werden in dem Abschnitt über Homogenate behandelt werden.

Interessante Einblicke in den Mechanismus der Hormonsynthese gewährten die Durchströmungsversuche mit Progesteron (IX), 17-Oxyprogesteron (X) und Pregnenolon (XI)². Aus Progesteronperfusaten wurde 17-Oxyprogesteron (X), Corticosteron (IV), 17-Oxy-corticosteron (II) und 11 β -Oxyprogesteron (XII) isoliert. Pregnenolon (XI) gab Progesteron (IX); 17-Oxyprogesteron (X) lieferte 17-Oxy-corticosteron (II). Die Umwandlung von Pregnenolon (XI) in Progesteron (IX) demonstrierte erstmalig die Anwesenheit eines Fermentsystems in der Nebenniere, das die Hydroxylgruppe in 3 β -Stellung zu einer Carbonylgruppe mit gleichzeitiger Wanderung der Doppelbindung aus der 5,6- in die 4,5-Stellung oxydierte. Dies wurde vor kurzem durch Umwandlung von Dehydroepiandrosteron in Δ^4 -11 β -Oxy-androsten-3,17-dion (VII) mittels Perfusion bestätigt⁸. Die Umwandlung von Progesteron (IX) in Corticosteroide vom Typus der α -Ketoseitenkette (Corticosteron) und der Dioxy-aceton-Seitenkette (17-Oxy-corticosteron) deuten die Anwesenheit zweier weiterer Fermentsysteme in der Nebenniere an, die der Oxydation an Kohlenstoffatomen 17 und 21

fähig sind. Weitere Beweise für das Vorhandensein dieser Fermente werden in dem Abschnitt über Homogenate gegeben werden.



Perfusion von Desoxy-corticosteron (III) durch Rattenleber und menschliche Placenta ergab keine Umwandlung in Corticosteron (IV)².

Inkubation mit Gewebsschnitten und -homogenaten

In einer vorläufigen Mitteilung nahmen HAYANO, DORFMAN und PRINS⁹ 11 β -Hydroxylierung von Desoxy-corticosteron (III) durch Inkubation mit Nebennierenschnitten und -homogenaten an. SAVARD, GREEN und LEWIS¹⁰ konnten die Umwandlung von Desoxy-corticosteron (III) in Corticosteron (IV) und von Reichsteins Substanz S (V) in 17-Oxy-corticosteron (II) durch Nebennierenhomogenate papierchromatographisch nach-

⁶ R. JEANLOZ, H. LEVY, R. JACOBSEN, O. HECHTER, V. SCHENKER, und G. PINCUS, *J. Biol. Chem.* 203, 453 (1953).

⁷ Vgl. J. J. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* 199, 235 (1952).

⁸ A. MEYER, R. JEANLOZ und G. PINCUS, *J. Biol. Chem.* 203, 463 (1953).

⁹ M. HAYANO, R. DORFMAN und D. PRINS, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 72, 700 (1949).

¹⁰ K. SAVARD, A. A. GREEN und L. A. LEWIS, *Endocrinology* 47, 418 (1950).

weisen. Dies wurde auch von MCGINTY und Mitarbeitern¹¹ bestätigt.

Die erste ausführliche Veröffentlichung dieser Art ist die Arbeit von KAHNT und WETTSTEIN¹². Diese Autoren benutzten die Hydroxylierung von Reichsteins Substanz S (V) als Testsystem zum Studium der optimalen Inkubationsbedingungen. Sie wiesen besonders darauf hin, daß Zusatz von Fumarsäure oder anderer Säuren des KREBSSchen Zitronensäurezyklus und die weitere Zugabe von Bausteinen der Cozymase I, wie z. B. Nicotinsäureamid, die Ausbeute wesentlich erhöhte. Es war ihnen ferner möglich, aus größeren Ansätzen 17-Oxy-corticosteron kristallisiert zu erhalten. Homogenate von Leber (Kalb, Kaninchen) oder Niere (Kalb) wurden als wirksam gefunden, wenn auch in geringerem Maße als Nebennierenhomogenate.

Die Oxydation von Steroiden durch Schweinsnebennierenhomogenate wurde von HAINES¹³ untersucht. Seine Methode war die folgende: Tiefgefrorene Schweinsnebennieren wurden im gefrorenen Zustand homogenisiert. Den in KREBS-RINGER-Bicarbonat-Puffer (pH 7,4) suspendierten Homogenaten wurde Steroidsubstrat (ungefähr 100 mg per 100 g gefrorene Nebennieren) und Nicotinsäureamid zugesetzt. In die Mischung wurde unter Rühren zwei Stunden lang Sauerstoff eingeleitet. Dann wurde das Homogenat mit Aceton extrahiert. Das nach weiterer Reinigung erhaltene neutrale Hormonkonzentrat wurde an Silikagel chromatographiert und die Eluate papierchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft. Als Hauptumwandlungsprodukt von Desoxy-corticosteron (III) wurde wieder Corticosteron (IV) gefunden. Eines der Nebenprodukte, das HAINES in 3,6prozentiger Ausbeute isolierte, schien auf Grund der Analyse ein Isomer von Corticosteron zu sein. Der Identifizierung dieses Steroids kam ein glücklicher Umstand zu Hilfe. DOBRINER und HUMPHRIES (Sloan-Kettering Institut, New York) fanden, daß das Infrarotspektrum des Diacetates identisch war mit dem des Diacetates von 6 β -Oxy-11-desoxy-corticosteron (XIII), das gerade auf teilsynthetischem Wege von HERZIG und EHRENSTEIN¹⁴ hergestellt worden war. Durch Mischschmelzpunkte und Vergleiche der physikalischen Konstanten wurde die Identität der synthetischen und biosynthetischen Präparate von 6 β -Oxy-11-desoxy-corticosteron (XIII) und seines Diacetates streng bewiesen^{15, 16}. Die Anwesenheit einer 6 β -Hydroxylase wurde kürzlich auch von HAYANO, WIENER und LINDBERG¹⁵ im Corpus luteum von Kuhovarien demonstriert.

HAINES¹³ fand 17-Oxy-corticosteron (II) und Cortison (I) als die Hauptumwandlungsprodukte der Inku-

bation von Reichsteins Substanz S (V) mit Schweinsnebennierenhomogenaten. Er nahm allerdings an, daß die Bildung von Cortison, das aus der Inkubationsmischung in wechselnder Ausbeute isoliert wurde, auf unspezifische Oxydation zurückzuführen sei, wie es überhaupt eine noch zu klärende Frage ist, ob Cortison in der Nebenniere durch direkte Oxydation von 17-Oxy-corticosteron oder auf anderem Wege entsteht. In den Perfusionsexperimenten wurde nicht beobachtet, daß 11 β -hydroxylierte Steroide weiter zu den entsprechenden 11-Carbonyl-Verbindungen oxydiert wurden. HAINES fand ferner, daß aus Schweinsnebennierenhomogenaten nach Inkubation mit radioaktivem Acetat isoliertes Cortison ungefähr die doppelte spezifische Radioaktivität wie 17-Oxy-corticosteron besaß. Da der Unterschied in spezifischer Radioaktivität außerhalb der Fehlergrenze zu liegen schien, konnte dies als Beweis für einen getrennten Weg der Biosynthese von Cortison gedeutet werden.

HAYANO und DORFMAN¹⁶ erbrachten den Nachweis einer 21-Hydroxylase in Rindernebennierenhomogenaten. So wurde Progesteron (IX) in Corticosteron (IV), 17-Oxyprogesteron (X) in 17-Oxy-corticosteron (II) und 21-Desoxycortison in Cortison (I) umgewandelt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Resultaten von Perfusionsexperimenten.

Der Sitz der Hydroxylierungsfermente in der Zellstruktur wurde in drei Laboratorien untersucht^{17, 18, 19}. SWEAT¹⁷ fand 11 β -Hydroxylaseaktivität nur in der granularen Fraktion von Homogenaten, die der Differentialzentrifugierung nach SCHNEIDER und HOGEBOOM²⁰ unterworfen worden waren. Die lose gepackte Schicht über den Granula und die überstehende Flüssigkeit zeigten nur Spuren von Enzymaktivität. Dem Testsystem mußte Fumarsäure zugegeben werden.

11 β -Hydroxylasepräparaten, die von HAYANO und DORFMAN¹⁶ durch Zentrifugierung gewaschener Rindernebennierenhomogenate erhalten worden waren, mußten Fumarsäure und Magnesiumionen unbedingt zugesetzt werden. Adenosintriphosphat hatte eine stimulierende Wirkung. Wenn Nebennieren längere Zeit in gefrorenem Zustande aufbewahrt worden waren, so mußte den daraus hergestellten Präparaten zur Reaktivierung Cozymase I (DPN) zugegeben werden. Kürzlich¹⁵ wurde gefunden, daß Cozymase II (TPN) nicht nur Cozymase I (DPN), sondern auch ATP und Magnesiumionen voll ersetzt. Obwohl eine ganze Reihe von Steroiden, wie z. B. Allopregnan-21-ol-3,20-dion, Δ^4 -Androsten-3,17-dion und Testosteron, in 10–40prozentiger Ausbeute von diesen Präparaten 11 β -hydroxyliert wurden, so wurde maximale (92prozentige) Umwandlung nur mit Substraten von echter Nebennierenrindenhormonstruktur

¹¹ D. MCGINTY, G. SMITH, M. WILSON und C. WORREL, *Science* 112, 506 (1950).

¹² F. W. KAHNT und A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 34, 1790 (1951).

¹³ W. J. HAINES, *Recent Progr. Hormone Res.* 7, 255 (1952).

¹⁴ P. T. HERZIG und M. EHRENSTEIN, *J. Org. Chem.* 16, 1050 (1951).

¹⁵ M. HAYANO, M. WIENER und M. C. LINDBERG, *Federation Proc.* 12, 216 (1953).

¹⁶ M. HAYANO und R. DORFMAN, *Arch. Biochem.* 36, 237 (1952).

¹⁷ M. SWEAT, *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 4056 (1951).

¹⁸ M. HAYANO und R. DORFMAN, *J. Biol. Chem.* 201, 175 (1953).

¹⁹ J. E. PLAGER und L. T. SAMUELS, *Arch. Biochem.* 42, 477 (1953).

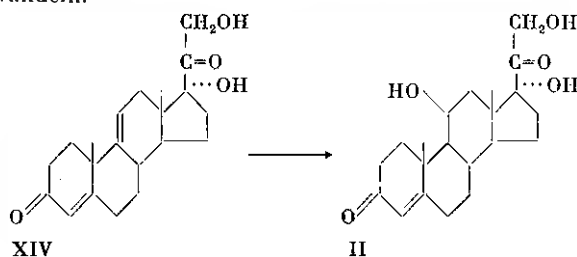
²⁰ W. C. SCHNEIDER und G. HOGEBOOM, *J. Biol. Chem.* 183, 123 (1950).

(Desoxy-corticosteron, Reichsteins Substanz S) erhalten. Progesteron wurde nicht hydroxyliert. Das kann damit erklärt werden, daß Hydroxylierung in 21-Stellung der in 11-Stellung voranzugehen scheint. Allerdings muß daran erinnert werden, daß in den Perfusions-experimenten Progesteron (IX) in 11 β -Oxy-progesteron (XII) umgewandelt wurde, wenn auch nur in minimaler Ausbeute.

PLAGER und SAMUELS¹⁹ lokalisierten die Ferment-systeme, die in 17 α - und 21-Stellung hydroxylieren, in der überstehenden Flüssigkeit von zentrifugierten Rindernebennierenhomogenaten. Dies Präparat oxydierte radioactives Progesteron (IX) zu radioaktiver Substanz S (V) von REICHSTEIN.

Bis jetzt kann über den Mechanismus der Hydroxylierung nur gemutmaßt werden. HAYANO, DORFMAN und YAMADA²¹ formulierten eine zweistufige Reaktionsfolge: 1. Dehydrierung zu einer Doppelbindung; 2. Wasseranlagerung an die Doppelbindung; gemäß der Reaktionskette Bernsteinsäure-Fumarsäure-Äpfelsäure des KREBS-Zyklus. LEVY und Mitarbeiter¹ formulierten einen freien Radikalmechanismus mit Entfernung eines Wasserstoffatoms von dem betreffenden Kohlenstoffatom, gefolgt von Kombination dieses Radikals mit einem freien Hydroxylradikal unter Bildung des hydroxylierten Steroids.

Die erstere Theorie wird durch eine Beobachtung von MIESCHER, WETTSTEIN und KAHNT²² gestützt. Diesen Autoren gelang es, mit Nebennierenhomogenaten $\Delta^4, 9(11)$ -Pregnadien-17 $\alpha, 21$ -diol-3,20-dion (XIV) unter Wasseranlagerung in 17-Oxy-corticosteron (II) umzuwandeln.



Mikrobiologische Fermentationen

Die Fähigkeit von Mikroorganismen, oxydative und reduktive Veränderungen an einer bereits im Steroidgerüst vorhandenen Sauerstofffunktion bewirken zu können, ist schon geraume Zeit bekannt^{23,24}. Über die erste mikrobiologische Hydroxylierung wurde von KRAMLÍ und HORVATH²⁵ berichtet. *Proactinomyces roseus* fermentierte Cholesterin zu 7-Oxy-cholesterin. Die

mikrobiologische Hydroxylierung an dem so wichtigen Kohlenstoffatom 11 wurde erstmalig von PETERSON und MURRAY²⁶ beschrieben. Kurz danach erschienen ähnliche Berichte aus mehreren anderen Laboratorien²⁷⁻³⁰. Am intensivsten ist allerdings auf diesem Gebiet von PETERSON und Mitarbeitern publiziert worden³¹⁻³⁰.

Obwohl das Patent von MURRAY und PETERSON³⁰ eine große Anzahl von Mikroorganismen aufzählt, die unter geeigneten Bedingungen Sauerstoff in das Steroidgerüst einzuführen imstande sein sollen, so wurden doch in den meisten Arbeiten dieser Forscher Schimmelpilze der Klasse *Mucorales*, besonders die Stämme *Rhizopus arrhizus* FISHER und *Rhizopus nigricans* EHRBACH, benutzt.

Die Fermentationsmethode ist in Kürze die folgende: Der Schimmelpilz wird in einer geeigneten Nährlösung, wie z. B. Edamin (einem enzymatischen Lactalbuminhydrolysat), Maisquellwasser, Dextrose und Leitungswasser 12 bis 24 Stunden gezüchtet. Dann wird das Steroidsubstrat in Aceton oder Alkohol gelöst in einer Konzentration von 10 bis 100 mg pro 100 cm³ Nährlösung zugegeben. Die Mischung wird unter Belüftung und Rühren 24 bis 48 Stunden lang fermentiert. Dann wird das Myzel durch Filtrieren entfernt. Sowohl Myzel als auch Filtrat werden mit geeigneten Lösungsmitteln, wie z. B. Methylenchlorid, extrahiert. Die Umwandlungsprodukte werden direkt aus dem Lösungsmittel kristallisiert oder durch Chromatographie weiter gereinigt.

Zwar wird in dem Patent³⁰ der Anspruch erhoben, daß Oxydationen auch mit dem Kulturfiltrat nach Entfernung des Myzels ausgeführt werden können, doch besaß in dem angeführten Beispiel das Filtrat nur schwache Fermentaktivität. Vollständige Hydroxylierung des Steroidsubstrates wurde nur mit dem Myzelrückstand erreicht.

Die erste erfolgreiche mikrobiologische Oxydation, die von PETERSON und Mitarbeitern beschrieben

²⁶ D. H. PETERSON und H. C. MURRAY, J. Amer. Chem. Soc. 74, 1871 (1952).

²⁷ D. PERLMAN, E. TITUS und J. FRIED, J. Amer. Chem. Soc. 74, 2126 (1952).

²⁸ J. FRIED, R. THOMA, J. GERKE, J. HERZ, M. DONIN und D. PERLMAN, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3962 (1952).

²⁹ O. MANCERA, A. ZAFFARONI, B. RUBIN, F. SONDHEIMER, G. ROSENKRANZ und C. DJERASSI, J. Amer. Chem. Soc. 74, 3711 (1952).

³⁰ E. KAHNT, CH. MEYSTRE, R. NEHER, E. VISCHER und A. WETTSTEIN, Experientia 8, 422 (1952).

³¹ D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, S. H. EPPSTEIN, L. M. REINEKE, A. WEINTRAUB, P. D. MEISTER und H. LEIGH, J. Amer. Chem. Soc. 74, 5933 (1952).

³² P. D. MEISTER, D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, S. EPPSTEIN L. REINEKE, A. WEINTRAUB und H. LEIGH, ebenda 75, 55 (1953).

³³ S. EPPSTEIN, P. MEISTER, D. PETERSON, H. MURRAY, H. LEIGH, D. LITTLE, L. REINEKE und A. WEINTRAUB, ebenda 75, 408 (1953).

³⁴ D. PETERSON, S. EPPSTEIN, P. MEISTER, B. MAGERLEIN, H. MURRAY, H. LEIGH, A. WEINTRAUB und L. REINEKE, ebenda 75, 412 (1953).

³⁵ P. MEISTER, D. PETERSON, H. MURRAY, G. SPERO, S. EPPSTEIN, A. WEINTRAUB, L. REINEKE und H. LEIGH, ebenda 75, 416 (1953).

³⁶ D. PETERSON, A. NATHAN, P. MEISTER, S. EPPSTEIN, H. MURRAY, A. WEINTRAUB, L. REINEKE und H. LEIGH, ebenda 75, 419 (1953).

³⁷ S. EPPSTEIN, D. PETERSON, H. LEIGH, H. MURRAY, A. WEINTRAUB, L. REINEKE und P. MEISTER, ebenda 75, 421 (1953).

³⁸ H. C. MURRAY und D. H. PETERSON, U. S. Pat. 2602769 (1952).

³⁹ D. H. PETERSON, Research (London) 6, 309 (1953).

²¹ M. HAYANO, R. DORFMAN und E. YAMADA, J. Biol. Chem. 193, 175 (1952).

²² K. MIESCHER, A. WETTSTEIN und F. KAHNT, Acta Physiol. Latino Amer. (im Druck), vgl. R. CASANOVA, C. SHOPPEE und G. SUMMERS, J. Chem. Soc. 1953, 2983.

²³ F. G. FISCHER, in *Newer Methods of Preparative Chemistry*, S. 182, Interscience Publishers, New York (1948).

²⁴ M. WELSCH und G. HEUSGHEM, C. R. Soc. Biol. 142, 1074 (1948).

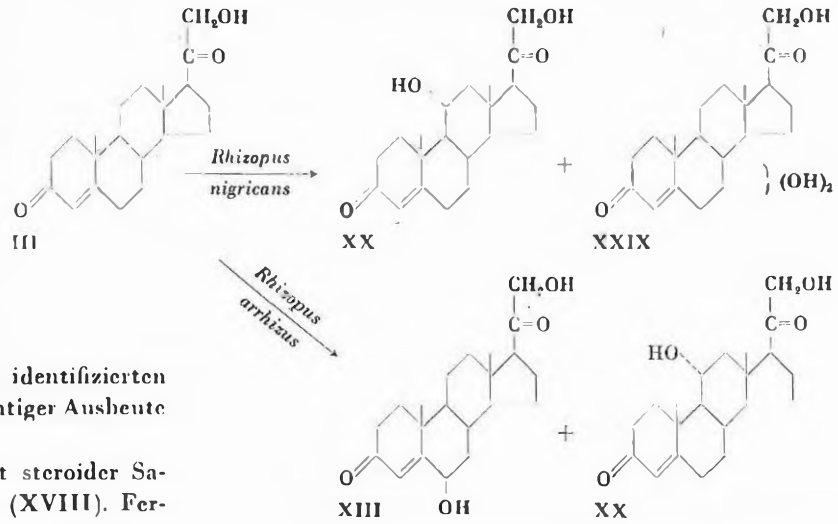
²⁵ A. KRAMLÍ und J. HORVATH, Nature 163, 219 (1949).

wurde^{26,31}, ist die Fermentation von Progesteron (IX) zu 11 α -Oxy-progesteron (XV) (50–95%), 6 β ,11 α -Dioxy-progesteron (XVI) (0,5 bis 15%) und Spuren von 11 α -Oxy-allopregnan-3,20-dion (XVII) mit *Rhizopus arrhizus* und *Rhizopus nigricans*.

Die mikrobiologische Umwandlung von Progesteron (IX) in 11 α -Oxy-progesteron (XV) und 6 β ,11 α -Dioxy-progesteron (XVI) wurde gleichzeitig auch von FRIED und Mitarbeitern²⁸ berichtet. Diese Autoren arbeiteten mit dem Schimmelpilz *Aspergillus niger*. MANCERA und Mitarbeiter²⁹ fermentierten Progesteron (IX) mit einem nicht näher identifizierten Stamm der Gattung *Rhizopus* in 45prozentiger Ausbeute zu 11 α -Oxy-progesteron (XV).

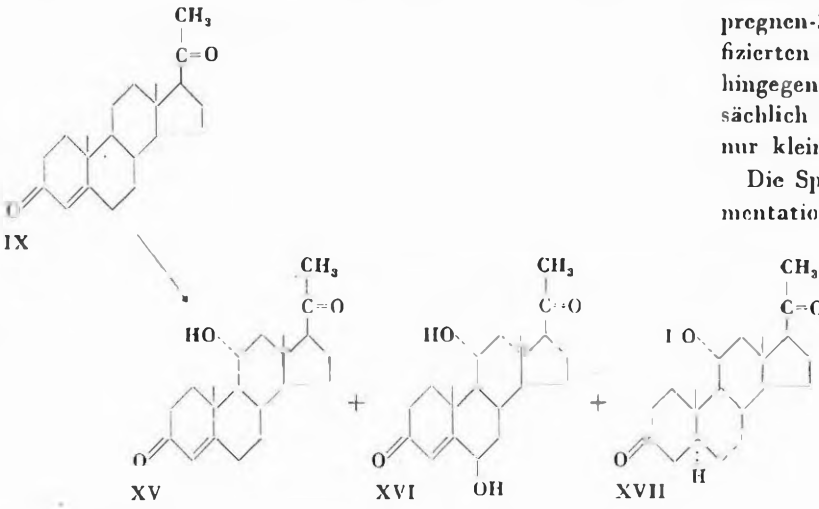
Ein leicht zugängliches Abbauprodukt steroider Saponine ist Δ^4 ,16-Pregnen-3,20-dion (XVIII). Fermentation dieser Verbindung mit *Rhizopus nigricans*

zopus-Stämme dar³³. *Rhizopus nigricans* oxydierte Desoxy-corticosteron (III) in 60–75prozentiger Aus-



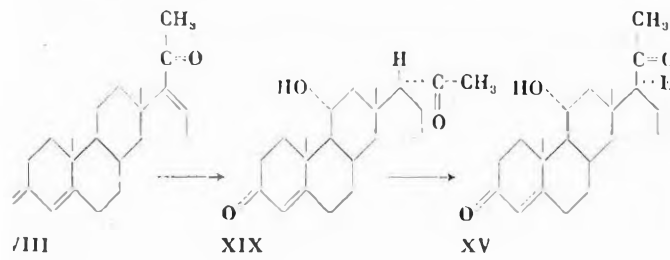
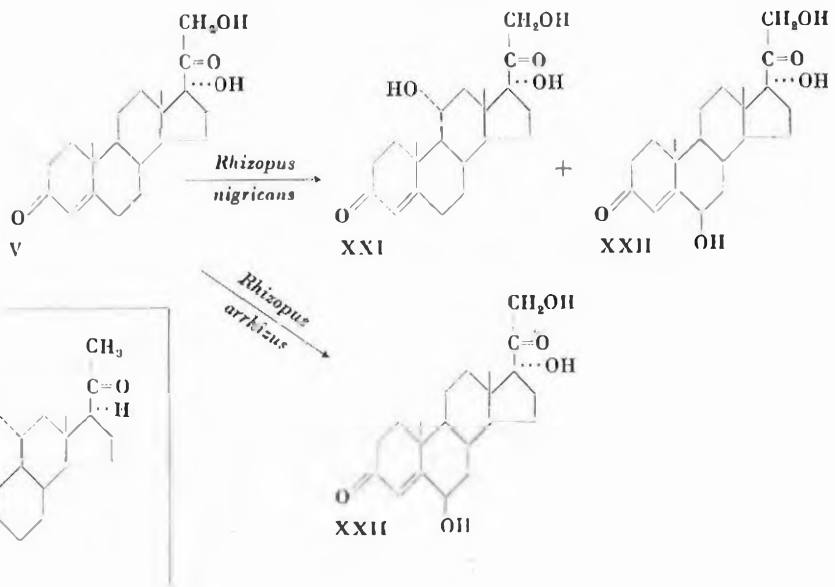
beute zu «11-Epi-corticosteron» (Δ^4 -11 α , 21-Dioxy-pregnen-3,20-dion) (XX) und Spuren einer nicht identifizierten Dioxyverbindung (XXIX). *Rhizopus arrhizus* hingegen verwandelte Desoxy-corticosteron (III) hauptsächlich in 6 β -Oxy-11-desoxy-corticosteron (XIII) und nur kleine Mengen von «11-Epi-corticosteron» (XX).

Die Spezifität war noch ausgesprochener in der Fermentation von Reichsteins Substanz S (V)^{34, 38}. Verwendung von *Rhizopus nigricans* führte in 60–80prozentiger Ausbeute zu «17-Oxy-11-epi-corticosteron» (Δ^4 -11 α , 17 α , 21-Trioxypregnen-3,20-dion) (XXI) und in kleinen Mengen zu einem Isomeren (Δ^4 -6 β , 17 α , 21-Trioxypregnen-3,20-dion) (XXII). Fermentation mit *Rhizopus arrhizus* führte ausschließlich und in guter Ausbeute zu XXII. Die

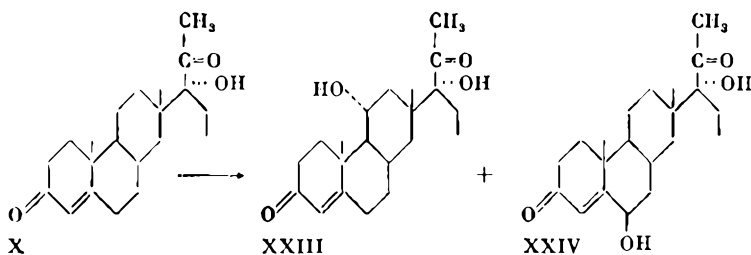


führte unter Hydroxylierung in 11 α -Stellung und Hydrierung der Doppelbindung in 16,17-Stellung zu 11 α -Oxy-17 α -progesteron (XIX), das durch Behandlung mit alkoholischem Chlorwasserstoff zu 11 α -Oxy-progesteron (XV) epimerisiert wurde³².

Die Fermentation von Desoxy-corticosteron (III) stellt einen interessanten Fall von Spezifität der benutzten *Rhi-*

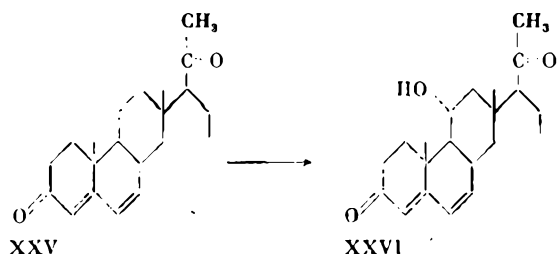


von PETERSON und Mitarbeitern für diese Substanz vermutete Struktur eines 6β -Oxy-derivates von Reichsteins Substanz S wurde von FLOREY und EHRENSTEIN⁴⁰ durch chemische Partialsynthese bewiesen.



Rhizopus nigricans wie auch *Rhizopus arrhizus* oxydierten 17α-Oxy-progesteron (X) in 75- bzw. 2-prozentiger Ausbeute zu 11α,17α-Dioxy-progesteron (XXIII). Außerdem wurde in Spuren bzw. 45prozentiger Ausbeute eine isomere Verbindung erhalten, die als 6β ,17α-Dioxy-progesteron (XXIV) bezeichnet wurde³⁵. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde von FLOREY und EHRENSTEIN⁴⁰ durch chemische Partialsynthese von 6β ,17α-Dioxy-progesteron (XXIV) sichergestellt.

6-Dehydro-progesteron (XXV) wurde durch *Rhizopus nigricans* zu 11α-Oxy-6-dehydro-progesteron (XXVI) fermentiert³⁶.



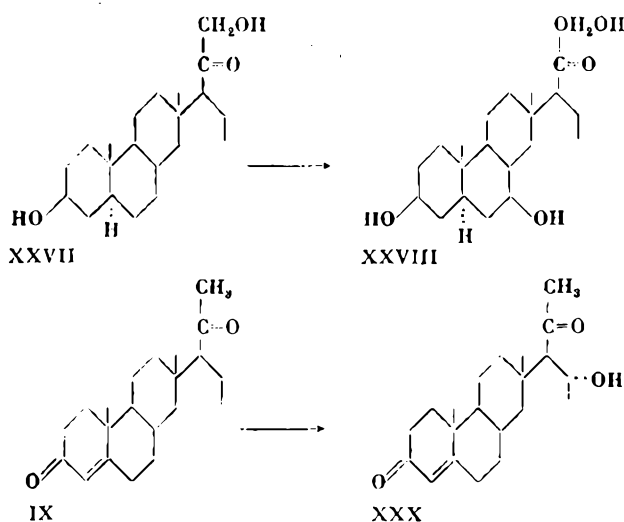
In den bisher beschriebenen Fermentationen waren die Steroidsubstrate 4,5-ungesättigte 3-Keto-Verbindungen. Die Oxydation von Pregnan-3,20-dion und Allopregnan-3,20-dion zu den entsprechenden 11α-Oxy-derivaten³⁷ durch *Rhizopus nigricans* beweist, daß auch im Ring A gesättigte Steroide in 11α-Stellung hydroxyliert werden. Allerdings wurde keine Hydroxylierung in 6-Stellung beobachtet.

Bis jetzt sind nur zwei Mikroorganismen in der Literatur beschrieben worden, die Steroidsubstrate in der für die 17-Oxy-corticosteron-Synthese so wichtigen 11β-Stellung hydroxylieren. *Streptomyces fradiae* WAKSMAN 3535 fermentierte Desoxy-corticosteron (III) zu Corticosteron (IV) und ferner Reichsteins Substanz S (V) zu 17-Oxy-corticosteron (II) in ungefähr 1,5prozentiger Ausbeute⁴¹. *Cunninghamella blakesleeana*, ein Schimmelpilz der Klasse *Mucorales*, fermentierte Reichsteins Sub-

stanz S (V) in 35prozentiger Ausbeute zu 17-Oxy-corticosteron (II)⁴².

Hydroxylierungen an den Kohlenstoffatomen 7 und 16 sind ebenfalls beschrieben worden. Die Fermentation von Cholesterin zu 7-Oxy-cholesterin²³ wurde bereits erwähnt. KAHNT, MEYSTRE, NEHER, VISCHER und WETTSTEIN³⁰ berichten die Oxydation von Allopregnan-3β, 21-diol-20-one (XXVII) zu Allopregnan-3β,7β, 21-triol-20-on (XXVIII) durch Fermentation mit *Rhizopus arrhizus*. Ein unbekanntes *Actinomyces* fermentierte Progesteron (IX) zu 16α-Oxy-progesteron³⁷ (XXX).

Die im Patent von PETERSON und MURRAY³⁸ erwähnten Hydroxylierungen in 8- und 14-Stellung sind experimentell noch besser zu belegen, ehe sie voll akzeptiert werden können.



Nachtrag

In einer vorläufigen Mitteilung berichteten PETERSON und Mitarbeiter⁴³ über den mikrobiologischen Abbau von C_{21} -Steroiden zu C_{19} -Ketonen und Testolacton. Gleichzeitig wurde Hydroxylierung beobachtet. Unter der Einwirkung verschiedener Mikroorganismen wurde Progesteron (IX) in Testolacton (XXXI), Δ^4 -Androsten-3,17-dion (VI) und Δ^4 -6β-Oxy-androsten-3,17-dion (XXXII) übergeführt. Die Struktur der letzteren Verbindung wurde durch Vergleich mit einem auf teilsynthetischem Wege erhaltenen Präparat⁴⁴ sichergestellt.

Weiterhin wird in einer Arbeit aus dem Laboratorium von PETERSON⁴⁵ beschrieben, daß die androgenen Wirk-

⁴⁰ K. FLOREY und M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. 19 (1954), im Druck.

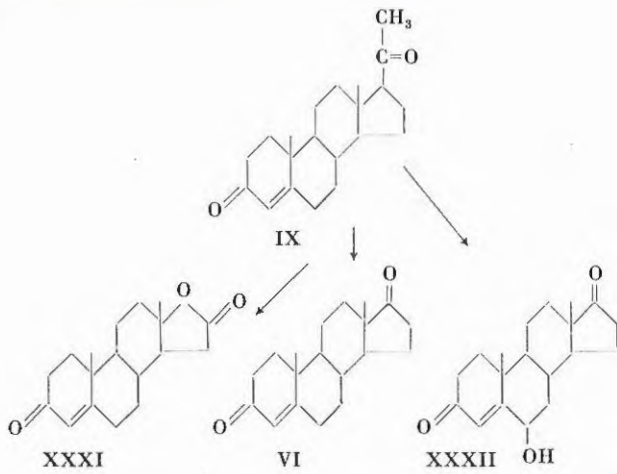
⁴¹ D. H. COLLINGSWORTH, J. KARNEMAAT, F. HANSON, M. BRUNNER, K. MANN und W. HAINES, J. Biol. Chem. 203, 807 (1953).

⁴² F. HANSON, K. MANN, E. NIELSON, H. ANDERSON, M. BRUNNER, J. KARNEMAAT, D. H. COLLINGSWORTH und W. HAINES, J. Amer. Chem. Soc. 75, 5369 (1953).

⁴³ D. H. PETERSON, S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. C. MURRAY, H. M. LEIGH, A. WEINTRAUD und I. M. REINEKE, J. Amer. Chem. Soc. 75, 5768 (1953).

⁴⁴ C. P. BALANT und M. EHRENSTEIN, J. Org. Chem. 17, 1587 (1952).

⁴⁵ S. H. EPPSTEIN, P. D. MEISTER, H. M. LEIGH, D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, I. M. REINEKE und A. WEINTRAUD, J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954), im Druck.



stoffe Δ^1 -Androsten-3,17-dion, Testosteron und α -Methyl-testosteron unter der Einwirkung verschiedener Stämme der Gattung *Rhizopus* sowohl in der 11 α - als auch in der 6 β -Stellung hydroxyliert werden können.

VISCHER, SCHMIDLIN und WETTSTEIN⁴⁶ erhielten 16 α -Oxy-11-desoxy-corticosteron bei der aeroben Einwirkung von Schüttelkulturen einer Anzahl von *Streptomyces*-Stämmen auf 11-Desoxycorticosteron.

Der Verfasser ist Herrn Prof. Dr. M. EHRENSTEIN für wertvolle Anregungen bei der Abfassung des Manuskriptes zu großem Danke verpflichtet.

⁴⁶ E. VISCHER, J. SCHMIDLIN und A. WETTSTEIN, *Helv. Chim. Acta* 37, 321 (1954).