



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: C 12 P 7/26
C 12 P 17/06



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

PATENT SCHRIFT A5

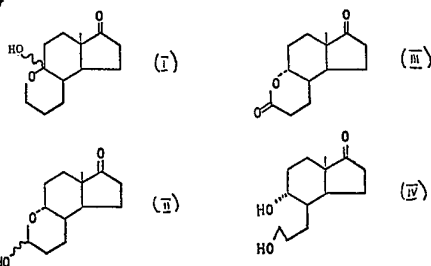
11

634 351

21	Gesuchsnummer:	14411/76	73	Inhaber:	The Upjohn Company, Kalamazoo/MI (US)
22	Anmeldungsdatum:	16.11.1976			
30	Priorität(en):	17.11.1975 US 632650	72	Erfinder:	John Costain Knight, Kalamazoo/MI (US) Merle Gene Wovcha, Kalamazoo/MI (US)
24	Patent erteilt:	31.01.1983			
45	Patentschrift veröffentlicht:	31.01.1983	74	Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich

54 Verfahren zur Herstellung eines Gemisches neuer 7 α -beta-Methylhexahydro-1,(5)-indan(di)on-Verbindungen.

57 Ein Gemisch der neuen Verbindungen der Formeln I bis IV

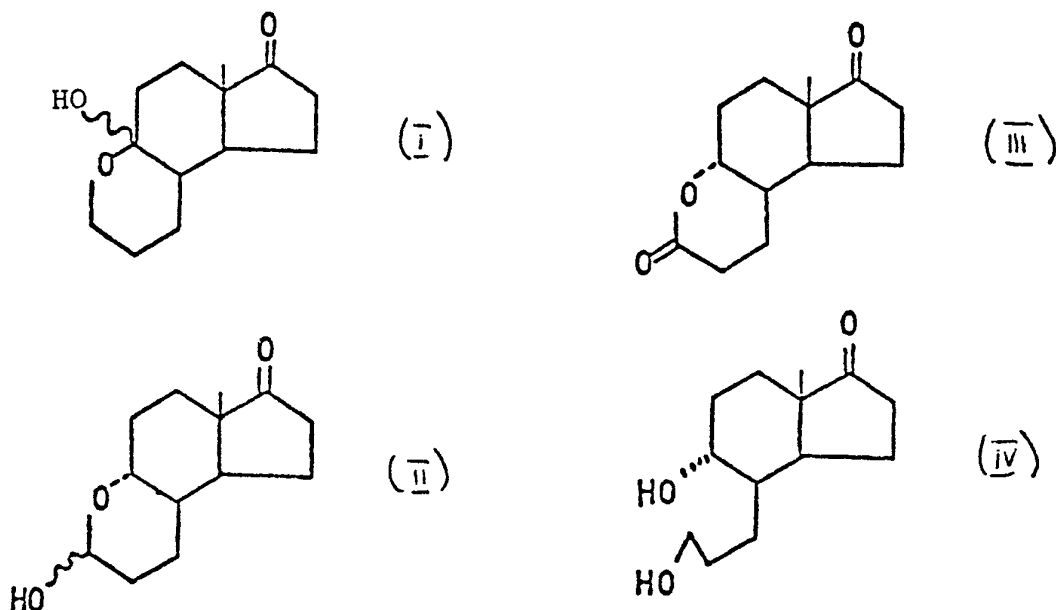


Bedingungen in Gegenwart eines einzigen Steroids mit oder ohne 17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlenstoffatomen oder in Gegenwart eines Gemischs aus zwei oder mehreren Steroiden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Sitosterin, Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin, Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion, Dehydroepiandrosteron und Testosteron züchtet.

wird erhalten, indem man einen Mikroorganismenmutanten aus der Gruppe Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Protaminobacter, Serratia und Streptomyces, welche sich durch ihre Fähigkeiten zum selektiven Abbau von Steroiden mit oder ohne 17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlenstoffatomen und zur Bildung bzw. Ansammlung von 3 α -H-4 α -[3'-Propanol]-7 α - β -methylhexahydro-1,5-indan-dion - hemiketal; 3 α -H-4 α -[3'-Propanol]-5 α -hydroxy-7 α - β -methylhexahydro-1-indanon - hemiacetal; 3 α -H-4 α -[3'-Propionsäure]-5 α -hydroxy-7 α - β -methylhexahydro-1-indanon- δ -lacton und 3 α -H-4 α -[3'-Propanol]-5 α -hydroxy-7 α - β -methylhexahydro-1-indanon in der Gärbrühe auszeichnen, in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines Gemisches der neuen Verbindungen der Formeln I bis IV,



dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismenmu-
tanten aus der Gruppe *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*,
Corynebacterium, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobac-*
ter, *Serratia* und *Streptomyces*, welche sich durch ihre Fähig-
keiten zum selektiven Abbau von Steroiden mit oder ohne
17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlenstoffato-
men und zur Bildung bzw. Ansammlung von 3α-H-4α-[3'-Pro-
panol]-7α-methylhexahydro-1,5-indan-dion-hemiketal; 3α-H-
4α-[3'-Propanal]-5α-hydroxy-7β-methylhexahydro-1-indanon-
hemiacetal; 3α-H-4α-[3'-Propionsäure]-5α-hydroxy-7β-meth-
ylhexahydro-1-indanon-δ-lacton und 3α-H-4α-[3'-Propanol]-
5α-hydroxy-7β-methylhexahydro-1-indanon in der Gärbrühe
auszeichnen, in einem wässrigen Nährmedium unter aeroben
Bedingungen in Gegenwart eines einzigen Steroids mit oder
ohne 17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlen-
stoffatomen oder in Gegenwart eines Gemischs aus zwei oder
mehreren Steroiden ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
Sitosterin, Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin, Androst-4-
en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion, Dehydroepiandroste-
ron und Testosteron züchtet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man *Mycobacterium fortuitum* NRRL N-8128 züchtet.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
dass man die hergestellten Verbindungen anschliessend in die
einzelnen Verbindungen auftrennt.

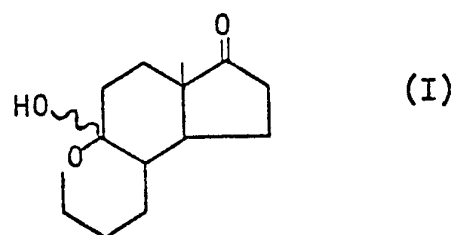
4. Mittel zur Durchführung des Verfahrens gemäss
Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man *Mycobacte-*
rium fortuitum NRRL B-8128 einsetzt.

2 602 769) berichten Peterson und Murray über die 11α-Hydro-
xylierung von Progesteron mit Hilfe des Pilzes *Rhizopus nigri-*
cans. 1972 (vgl. US-PS 3 684 657) berichten Kraychy und Mitar-
beiter über den selektiven mikrobiologischen Abbau von ste-
roidischen 17-Alkylresten durch Vergären von Steroiden mit
mindestens 8 Kohlenstoffatomen in der 17-Alkylseitenkette mit
Mycobacterium sp. NRRL B-3683 unter Bildung von Androst-4-
en-3,17-dion, Androst-1,4-dien-3,17-dion und 20α-Hydroxyme-
thylpregna-1,4-dien-3-on. 1973 (vgl. US-PS 3 759 791) berichten
Marshack und Mitarbeiter über die selektive mikrobiologische
Darstellung von Androst-4-en-3,17-dion durch Vergären eines
Steroids der Cholestan- oder Stigmastanreihe mit mindestens 8
Kohlenstoffatomen in der 17-Alkylseitenkette mit *Mycobacte-*
rium sp. NRRL B-3805.

Die Verbindung III gemäss der Erfindung wird von Wang
und Sih in «Biochem.» 2, 1238 bis 1243 (1963) als Zwischenpro-
dukt beim Abbau von Androst-4-en-17βol-3-on durch *Nocardia*
restrictus beschrieben. Die offene Ringform der Verbindung I,
nämlich 7α-Methylperhydroindandion-(1,5)-[β-propylalkohol-
(4)], wird von Schubert und Mitarbeitern in «Steroids», 4, 581
bis 586 (1964) als Zwischenprodukt beim Abbau von Progesteron
durch *Mycobacterium smegmatis* beschrieben.

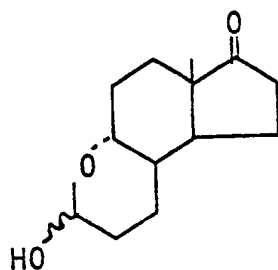
Mutanten, die durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau
von Steroiden mit oder ohne 17-Alkylseitenketten mit 2 bis ein-
schliesslich 10 Kohlenstoffatomen gekennzeichnet sind und in
der Gärbrühe Verbindungen der folgenden Formeln:

3α-H-4α-[3'-Propanol]-7α-methylhexahydro-1,5-indan-
dion, Hemiketal:



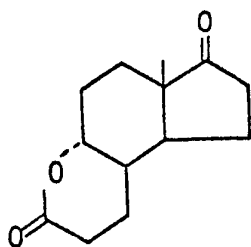
Die Umwandlung von Steroiden durch Mikroorganismen
wurde bereits recht weitgehend untersucht und in der Literatur
veröffentlicht. Die früheste einschlägige Arbeit stammt offen-
sichtlich von Mamoli und Vercellone aus dem Jahre 1937,
«Berichte» 70, 470 und «Berichte» 70, 2079. AaO wird über die
Reduktion von 17-Ketosteroiden zu 17β-Hydroxysteroiden mit
Hilfe von Gärhefe berichtet. Im Jahre 1952 (vgl. US-PS

3α-H-4α-[3'-Propanal]-5α-hydroxy-7β-methylhexahydro-1-
indanon, Hemiacetal:

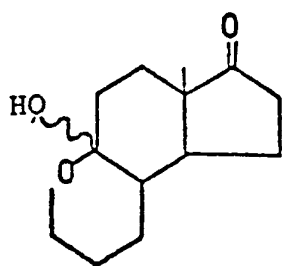


(II) 5

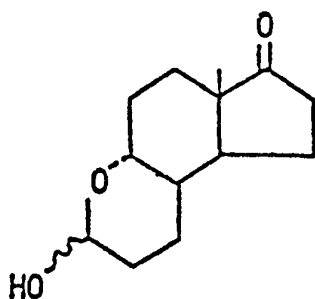
3α-H-4α-[3'-Propionsäure]-5α-hydroxy-7α-methylhexahydro-1-indanon-δ-lacton:



(III)

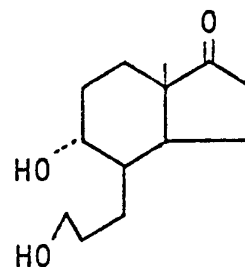


(I)



(II)

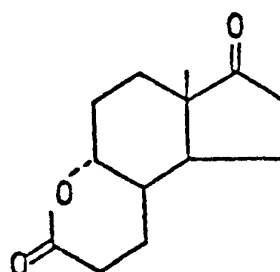
3α-H-4α-[3'-Propanol]-5α-hydroxy-7α-methylhexahydro-1-indanon:



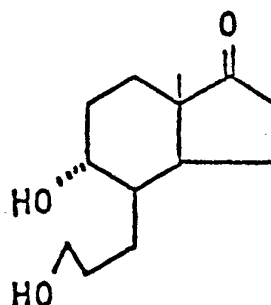
(IV)

anhäufen, erhält man nach den im folgenden näher erläuterten
15 Mutationsmassnahmen oder anderen Mutationsmassnahmen
aus sterinabbauenden Mikroorganismen der Gattungen
Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium,
Mycobacterium, Nocardia, Protaminobacter, Serratia und
Streptomyces, vorzugsweise Mycobacterium. Beispiele für
20 Arten dieser Gattung sind *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. rhodochrous*, *M. muscosum*, *M. fortuitum* und *M. butyricum*.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung eines
Gemisches der neuen Verbindungen der Formeln I bis IV



(III)



(IV)

ist dadurch gekennzeichnet, dass man einen Mikroorganismen-
mutanten aus der Gruppe Arthrobacter, Bacillus, Brevibacte-
rium, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Protamino-
bacter, Serratia und Streptomyces, welche sich durch ihre
Fähigkeiten zum selektiven Abbau von Steroiden mit oder
ohne 17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlen-
stoffatomen und zur Bildung bzw. Ansammlung von 3α-H-4α-
[3'-Propanol]-7α-methylhexahydro-1,5-indandion-hemiketal,
3α-H-4α-[3'-Propanal]-5α-hydroxy-7α-methylhexahydro-1-
indanon-hemiacetal; 3α-H-4α-[3'-Propionsäure]-5α-hydroxy-
7α-methylhexahydro-1-indanon-δ-lacton und 3α-H-4α-[3'-
Propanol]-5α-hydroxy-7α-methylhexahydro-1-indanon in der
Gärbrühe auszeichnen, in einem wässrigen Nährmedium unter
aeroben Bedingungen in Gegenwart eines einzigen Steroids
mit oder ohne 17-Alkylseitenkette mit 2 bis einschliesslich 10
Kohlenstoffatomen oder in Gegenwart eines Gemischs aus
zwei oder mehreren Steroiden ausgewählt aus der Gruppe
bestehend aus Sitosterin, Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin,
Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion, Dehydro-
epiandrosteron und Testosteron züchtet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird insbesondere

ein neuer Mikroorganismenmutant, nämlich Mycobacterium
fortuitum NRRL B-8128, zum selektiven Abbau von Steroiden
mit oder ohne 17-Alkylseitenketten mit 2 bis einschliesslich 10
Kohlenstoffatomen zu Gemischen von Verbindungen der For-
meln I, II, III und IV benutzt. Geeignete Steroide sind Sitoste-
rin, Cholesterin, Stigmasterin, Campesterin und dergleichen
mit 17-Alkylseitenketten mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlen-
stoffatomen und Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-
dion, Dehydroepiandrosteron und Testosteron. Diese Steroid-
substrate können entweder in reiner Form oder in Rohform
zum Einsatz gelangen.

Wie bereits erwähnt, erhält man durch ihre Fähigkeit zum
selektiven Abbau von Steroiden der beschriebenen Art
gekennzeichnete und Verbindungen der Formeln I, II, III und
IV in der Gärbrühe anhäufende Mutanten durch Mutation von
sterinabbauenden Mikroorganismen der Gattungen Arthro-
bacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Mycobac-
terium, Nocardia, Protaminobacter, Serratia und Streptomy-
ces.

Mycobacterium fortuitum, ATCC 6842 ist seit dem 9. April
1937 bei der American Type Culture Collection, 12301 Park-

lawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA hinterlegt und kann dort seit dem genannten Datum auf Verlangen von jedermann frei bezogen werden.

Für den Erfindungszweck wurde in der später beschriebenen Weise die Art *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 zu einem neuen Labor-Mikroorganismusmutanten mutiert. Der ATCC-Katalog von 1974 erläutert neben der Auflistung von ATCC 6842 folgendes: «J.C. Cruz 2. Cold abscess. Acta Med. Rio de Janeiro 1:1, 1936, Medium 90 37C». *M. fortuitum* ATCC 6842 baut Sterine nicht selektiv zu niedrigmolekularen Verbindungen, beispielsweise $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$, ab. Somit eignet sich dieser Mikroorganismus nicht zum selektiven Steroidabbau.

Bei der Mutation von *M. fortuitum* ATCC 6842 mittels Nitrosoguanidin erhält man einen neuen Mutanten, der selektiv Steroide des beschriebenen Typs zu Gemischen von Verbindungen der Formeln I, II, III und IV abzubauen vermag. Diesem Mikroorganismenmutanten von *M. fortuitum* wurde durch das Northern Regional Research Laboratory, U.S.-Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA (der Mikroorganismenmutant wurde an dieser Hinterlegungsstelle in der Dauersammlung hinterlegt), die Nummer NRRL B-8128 zugeteilt. Eine Subkultur dieses Mikroorganismus ist auf Anfrage von dieser Hinterlegungsstelle frei erhältlich. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Verfügbarkeit bzw. Aushändigung der Kultur keine Lizenz an einem etwa auf die vorliegende Erfindung erteilten Patent begründet.

Die Morphologie und die Chemikalien- bzw. Drogenempfindlichkeit von *M. fortuitum* NRRL B-8128 sind von den entsprechenden Eigenschaften der Ausgangsart *M. fortuitum* ATCC 6842 nicht zu unterscheiden. Beide *M. fortuitum*-Kulturen stellen säurefeste, unbewegliche, nicht-sporenbildende Bacilli aus der Familie Mycobacteriaceae der Ordnung Actinomycetales dar. Nach der Runyon's Klassifizierung (vgl. E.H. Runyon «Med. Clin. North America», 43, 273 [1959]) handelt es sich um ein nicht-chromogenes, der Gruppe IV angehörendes *Mycobacterium*, d.h. es wächst rasch bei niedriger Temperatur unter Bildung nicht-pigmentierter Kolonien auf relativ einfach zusammengesetzten Medien.

M. fortuitum ATCC 6842 und *M. fortuitum* NRRL B-8128 lassen sich hinsichtlich ihrer Wirkung auf Steroidmoleküle eindeutig voneinander unterscheiden. Wie bereits ausgeführt, kommt es beim Einsatz von *M. fortuitum* ATCC 6842 zu einem nicht-selektiven Abbau von Steroiden, bei Einsatz von *M. fortuitum* NRRL B-8128 erfolgt dagegen ein selektiver Steroidabbau. Diese Eigenschaft von *M. fortuitum* NRRL B-8128 stellt eine in hohem Masse wertvolle Eigenschaft dar.

Die Mutation von *M. fortuitum* ATCC 6842 zu *M. fortuitum* NRRL B-8128 erfolgt mit Hilfe von Nitrosoguanidin. Die Einzelheiten der Mutationsmassnahmen werden im folgenden noch näher erläutert werden. Obwohl Mutationsverfahren allgemein bekannt sind, gibt es auf dem einschlägigen Fachgebiet keine Lehren oder sogar Vermutungen bezüglich der möglicherweise bei Durchführung der im vorliegenden Falle eingehaltenen Mutationsmassnahmen erhältlichen Arten von Mutanten. Die im folgenden näher erläuterten Mutations- und Umwandlungs- bzw. Transformationsmassnahmen werden zwar im einzelnen für ein *Mycobacterium* beschrieben, es ist jedoch ohne weiteres möglich, ähnliche oder äquivalente Massnahmen bei Mikroorganismen der anderen genannten Gattungen anzuwenden.

Die selektive Umwandlung lässt sich in einer wachsenden Kultur von *M. fortuitum* NRRL B-8128 entweder durch Zugabe des jeweiligen Steroidsubstrats zu der Kultur während der Inkubationsdauer oder durch Zusatz des jeweiligen Steroidsubstrats zu dem Nährmedium vor dem Beimpfen bewerkstelligen. Das Steroid kann entweder alleine oder in Kombination mit einem anderen Steroid zugesetzt werden. Der bevorzugte, jedoch nicht zwingend erforderliche Konzentrationsbereich für das Steroid in der Kultur beträgt etwa 0,1 bis etwa 100 g/l.

Die Kultur wird in einem Nährmedium mit einem Kohlenstofflieferanten, beispielsweise einem assimilierbaren Kohlenhydrat, und einem Stickstofflieferanten, beispielsweise einer assimilierbaren Stickstoffverbindung oder einem eiweissartigen Material, wachsen gelassen bzw. gezüchtet. Bevorzugte Kohlenstofflieferanten sind Glucose, brauner Zucker, Rohrzucker, Glycerin, Stärke, Maisstärke, Lactose, Dextrin, Melasse und dergleichen. Bevorzugte Stickstofflieferanten sind Mais-einweichflüssigkeit, Hefe, autolytierte Brauhefe mit Milchfeststoffen, Sojabohnenmehl, Baumwollsaatmehl, Maismehl, Milchfeststoffe, Pankreas-Verdauungsprodukte von Casein, Fischmehl, Brennereirückstände, Tierpeptonflüssigkeiten, Fleisch- und Knochenabfälle, Ammoniumsalze und dergleichen. In vorteilhafter Weise können Kombinationen dieser Kohlenstoff- und Stickstofflieferanten zum Einsatz gelangen. Den Gär- bzw. Fermentationsmedien brauchen keine Spurenmetalle, z.B. Zink, Magnesium, Mangan, Kobalt, Eisen und dergleichen, zugesetzt zu werden, da vor der Sterilisation des Mediums vorzugsweise Leitungswasser und ungereinigte Bestandteile als Komponenten des Mediums zum Einsatz gelangen.

Das Umwandlungsverfahren dauert normalerweise etwa 72 h bis 15 Tage. Die Inkubationstemperatur während des Umwandlungsverfahrens reicht im allgemeinen von etwa 25° bis etwa 37 °C und beträgt vorzugsweise 30 °C. Der Inhalt des Umwandlungsgefässes wird mit sterilisierter Luft belüftet und zum leichteren Wachstum des Mikroorganismus normalerweise bewegt. Auf diese Weise lässt sich der Wirkungsgrad des Umwandlungsverfahrens erhöhen.

Nach beendeter Umwandlung, ermittelt durch Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von handelsüblichen Silikagelplatten und eines Lösungsmittelsystems aus 2 Volumina Äthylacetat und 3 Volumina Cyclohexan, kann das umgewandelte Steroid in üblicher bekannter Weise isoliert werden. So kann beispielsweise das Gär- bzw. Fermentations- oder Umwandlungsgemisch einschliesslich der Gärbrühe und der Mikroorganismenzellen mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel für Steroide extrahiert werden. Geeignete Lösungsmittel sind Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Äthylenchlorid, Trichloräthylen, Äther, Amylacetat, Benzol und dergleichen, vorzugsweise Methylenchlorid.

Andererseits können die Gär- bzw. Fermentationsbrühe und die Zellen zunächst in üblicher bekannter Weise, beispielsweise durch Filtrieren oder Zentrifugieren voneinander getrennt und dann getrennt mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert werden. Die Zellen können entweder mit einem mit Wasser mischbaren oder mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel extrahiert werden. Die zellenfreie Gär- oder Fermentationsbrühe lässt sich mit mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln extrahieren.

Die Extrakte können durch Diatomeenerde filtriert werden, worauf das Filtrat im Vakuum zur Trockene destilliert wird. Der die gewünschten umgewandelten Steroide enthaltende Destillationsrückstand kann in einem 10% Chloroform enthaltenden handelsüblichen Hexanisomerengemisch gelöst und auf Silikagel chromatographiert werden, wobei als Entwickler das handelsübliche Hexanisomerengemisch einerseits und Mischungen desselben mit zunehmenden Mengen Äthylacetats verwendet werden. Bei diesen Massnahmen lassen sich die Verbindungen I, II und III eluieren. Die Verbindung IV lässt sich beispielsweise mit 5% Methanol enthaltendem Äthylacetat eluieren. Kristalline Produkte erhält man mit Hilfe eines Lösungsmittels, beispielsweise Äthylacetat. Die gewünschten umgewandelten Steroide erhält man auch aus der überstehenden Flüssigkeit nach dem Verdampfen des in der überstehenden Flüssigkeit enthaltenen Lösungsmittels.

Die aus dem erfindungsgemäss hergestellten Gemisch aufgetrennten Verbindungen der Formeln I, II, III und IV eignen sich als Zwischenprodukte bei der chemischen Synthese wertvoller Steroide. So lassen sich beispielsweise die aufgetrennten

Verbindungen in bei dem aus der US-PS 3 880 884 bekannten Verfahren zur Totalsynthese wertvoller 19-Norsteroiden verwendeten Ausgangssubstanzen überführen. Diese Umwandlung zu den genannten Ausgangssubstanzen lässt sich in üblicher bekannter Weise durchführen, beispielsweise durch Oxidation mit Chromsäure in Essigsäure und anschliessender Nachbehandlung mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat (vgl. «Biochem.» 2, 1238 bis 1243 und «J.A.C.S.» 85, 2135 bis 2137).

Die folgenden Beispiele sollen das Verfahren gemäss der Erfindung näher veranschaulichen. Sofern nichts anderes angegeben, bedeuten sämtliche Prozentangaben «Gewichtsprozent». Ferner bedeuten sämtliche Mengenangaben bei Lösungsmittelgemischen, sofern nichts anderes angegeben, «Volumina».

Beispiel 1

Herstellung des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128 aus *M. fortuitum* ATCC 6842:

a) Nitrosoguanidin-Mutagenese:

Zellen von *M. fortuitum* ATCC 6842 werden bei einer Temperatur von 28 °C in einem sterilen Saatmedium der folgenden Zusammensetzung wachsen gelassen:

Nährbrühe (Difco)	8 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Natriumpropionat	0,5 g/l
mit destilliertem Wasser aufgefüllt auf	1 l

Der pH-Wert des Mediums wird mit 1N-NaOH vor einer 20minütigen Sterilisation bei 121 °C auf 7,0 eingestellt.

Die Zellen werden bis zu einer Dicke von etwa 5×10^8 /ml wachsen gelassen, durch Zentrifugieren in Kügelchen überführt und dann mit einem gleichen Volumen sterilen 0,1M-Natriumcitrat eines pH-Werts von 5,6 gewaschen. Die gewaschenen Zellen werden in demselben Volumen Citratpuffer resuspendiert, worauf ein aliquoter Teil zur Titerfeststellung (d.h. zur Zellenzählung) abgetrennt wird. Schliesslich wird Nitrosoguanidin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Die Zellsuspension wird in einem Wasserbad 30 min lang bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, worauf erneut ein aliquoter Teil zur Titerfeststellung abgetrennt wird. Der Rest wird abzentrifugiert und mit einem gleichen Volumen sterilen 0,1M-Kaliumphosphats eines pH-Werts von 7,0 gewaschen. Schliesslich werden die Zellen in einem sterilen Minimal-salzmedium ohne Kohlenstofflieferant der folgenden Zusammensetzung:

NH ₄ NO ₃	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	0,25 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g/l
NaCl	0,005 g/l
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001 g/l
mit destilliertem Wasser aufgefüllt auf	1 l

resuspendiert. Der pH-Wert dieses Mediums wird vor einem 20minütigen Sterilisieren bei 121 °C mit 1N-HCl auf 7,0 eingestellt. Endlich werden die Zellen zur Auswahl der Mutanten ausgebreitet.

b) Auswahl und Isolierung des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128:

Die in der geschilderten Weise mutagenisierten Zellen werden verdünnt und auf Platten verstrichen, die ein Medium der folgenden Zusammensetzung enthalten (modifiziert nach Fraser und Jerrel, 1963 «J. Biol. Chem.», 205, 291 bis 295):

Glyzerin	10,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	8,4 g/l
KH ₂ PO ₄	4,5 g/l
NH ₄ Cl	2,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,05 g/l
mit destilliertem Wasser aufgefüllt auf	1 l

Nach Zugabe von 15 g/l Agar wird das Medium 30 min lang

in einem Autoklaven auf eine Temperatur von 121 °C erhitzt und dann in sterile Petrischalen gegossen. Das Wachsen bzw. die Züchtung auf diesem Medium eliminiert die meisten durch das Mutageneseverfahren gebildeten Nährauxotrophe. So werden beispielsweise Kulturen, die zum Wachsen auf chemisch definierten Medien Vitamine, Wachstumsfaktoren und dergleichen erfordern, eliminiert. Nach etwa 7-tägiger Inkubation bei einer Temperatur von 28 °C werden die gebildeten Kolonien auf zur Auswahl von Mutanten geeignete Testplatten und dann zurück auf das auf Glycerin basierende Medium enthaltende Kontrollblatt repliziert. Die Testplatten werden entsprechend der Veröffentlichung von G.E. Peterson, H.L. Lewis und J.R. Davis «Preparation of uniform dispersions of cholesterol and other water-insoluble carbon sources in agar media», J.Lipid Research 3, 275 bis 276 (1962) hergestellt. Das Minimalsalzmedium auf diesen Platten ist unter (a) von Beispiel 1 beschrieben. Nach Zugabe von 15 g/l Agar und 1,0 g/l eines geeigneten Kohlenstofflieferanten werden Steroide, wie Sitosterin oder Androstendion (AD), zugesetzt, worauf die erhaltene Suspension 30 min lang bei 121 °C im Autoklaven erhitzt wird. Das sterile, heisse Gemisch wird hierauf in ein steriles Mischgefäss gegossen, mehrere min lang durchgemischt und schliesslich in sterile Petrischalen gegossen. Bei diesen Massnahmen kann es infolge Schaumbildung zu Schwierigkeiten kommen, diese lassen sich jedoch durch Durchmischen des heissen Gemischs und durch Abflammen der Oberfläche der geschmolzenen Agarplatten verringern. Auf diese Weise erhält man gleichmässige Dispersionen wasserunlöslicher Kohlenstofflieferanten, wodurch die Herstellung sehr homogener, jedoch opaker Agarplatten erleichtert wird.

Die auf den Kontrollplatten gewachsenen Kolonien, jedoch nicht die auf den AD als einzigen Kohlenstofflieferanten enthaltenden Testplatten gewachsenen Kolonien, werden durch Ausstreichen auf Nähragarplatten gereinigt. Nach dem Wachsen bei einer Temperatur von 28 °C werden mit Hilfe steriler Zahnstocher Einzelklonen von den Nähragarplatten gepflückt und durch Beimpfen netzartig gemusterter Platten mit AD als Kohlenstofflieferanten erneut getestet. Gereinigte Isolate, die noch einen von der Mutterkultur unterschiedlichen Phänotypus aufweisen, werden dann in Schüttelflaschen ausgewertet.

c) Schüttelflaschenauswertung:

Es werden 500 ml fassende Schüttelflaschen mit 100 ml eines Biotransformationsmittels der folgenden Zusammensetzung verwendet:

Glyzerin	10,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	8,4 g/l
KH ₂ PO ₄	4,5 g/l
NH ₄ Cl	2,0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,05 g/l
mit destilliertem Wasser aufgefüllt auf	1 l

Hierauf werden in das Medium 1 g/l Sojamehl und dann 10 g/l Sitosterin eingemischt. Nach 20minütigem Erhitzen der Flaschen in einem Autoklaven auf 121 °C werden sie auf 28 °C abgekühlt und dann mit 10 ml eines wie folgt hergestellten Saatguts beimpft:

Die gereinigten Isolate aus Stufe (b) werden bei einer Temperatur von 28 °C auf geneigtem Agar wachsen gelassen. Zum Beimpfen einer 500 ml fassenden Flasche mit 100 ml eines sterilen Saatmediums der folgenden Zusammensetzung:

Nährbrühe (Difco)	8 g/l
Hefeextrakt	1 g/l
Glyzerin	5 g/l
mit destilliertem Wasser aufgefüllt auf	1 l

wird eine von einem geeigneten Agar entnommene Öse voll Zellen verwendet.

Der pH-Wert des Saatmediums wird vor dem 20minütigen Erhitzen der Flaschen auf 121 °C in einem Autoklaven mit

1n-NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Saatflaschen werden 72 h lang bei einer Temperatur von 28 °C inkubiert.

Wie bereits erwähnt, werden 10 ml gewachsene Saat zum Beimpfen sämtlicher 500-ml-Flaschen mit jeweils 100 ml sterilen Transformationsmediums verwendet. Hierauf werden die Flaschen bei einer Temperatur von 28° bis 30 °C auf einem Drehrüttler inkubiert, wobei von Zeit zu Zeit aliquote Proben entnommen werden. Diese Proben umfassen jeweils 10 ml und werden nach dem Austragen durch Schütteln mit 3 Volumina Methylenchlorid extrahiert. Teile der Extrakte werden durch Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von Silikagel und des beschriebenen Lösungsmittelsystems, d.h. 2 Volumina Äthylacetat und 3 Volumina Cyclohexan, sowie durch Gas/Flüssig-Chromatographie analysiert. Ein Nachweis der Anwesenheit der Verbindungen der Formeln I, II, III und IV bestätigt den selektiven Abbau von Sitosterin durch den neuen Mutanten aus dem Muttermycobacterium *M. fortuitum* ATCC 6842.

Beispiel 2

Umwandlung von Sitosterin zu einem Gemisch der Verbindungen der Formeln I, II, III und IV und anschließende Auftrennung in die einzelnen Verbindungen:

Das verwendete Medium entspricht dem Medium von Beispiel 1 (c). Dieses Medium wird durch 30minütiges Erhitzen auf 121 °C sterilisiert, dann auf 30 °C abgekühlt und schliesslich mit 10 Teilen einer Saatkultur des Mutanten-*Mycobacterium M. fortuitum* NRRL B-8128, die entsprechend Beispiel 1 (c) hergestellt worden war, beimpft. Das beimpfte Gemisch wird unter Bewegung 336 h lang bei einer Temperatur von 30 °C zur Begünstigung eines submersen Wachstums inkubiert. Nach der Inkubation wird das Gemisch mit Methylenchlorid extrahiert. Der Extrakt wird durch Diatomeenerde filtriert, worauf das Filtrat im Vakuum zur Trockene destilliert wird. Der hierbei angefallene Destillationsrückstand wird mit einem handelsüblichen, 10% Chloroform enthaltenden Hexanisomergemisch aufgenommen und auf Silikagel chromatographiert, wobei als Entwickler das handelsübliche Hexanisomergemisch und Mischungen desselben mit zunehmenden Mengen an Äthylacetat verwendet werden. Hierbei lassen sich die Verbindungen I, II und III eluieren. Die Verbindung IV lässt sich aus der Säule mit 5% Methanol enthaltendem Äthylacetat eluieren. Die Reihenfolge des Eluierens der betreffenden Verbindungen ist I → II → III → IV. Die R_f -Werte dieser Verbindungen auf einem Dünnschichtchromatogramm unter Verwendung eines 3:2-Cyclohexan/Äthylacetat-Gemischs sind: I = 0,37, II = 0,28, III = 0,16, IV = 0,05.

Auf dünnsschichtchromatographischem Wege ermittelte geeignete Fraktionen werden gesammelt und zur Trockene eingedampft, wobei die Verbindungen I, II, III und IV in guter Ausbeute erhalten werden.

Beim Umkristallisieren aus Äthylacetat erhält man die Verbindung I in Form eines 1:1-Epimerengemischs eines Fp. von 100° bis 112 °C; die Verbindung II stellt ein Öl dar; die Verbindung III besitzt einen Fp. von 122° bis 124 °C und die Verbindung IV besitzt einen Fp. von 148° bis 150 °C.

Beispiel 3

Beim Ersatz des im Beispiel 2 verwendeten Sitosterins durch Cholesterin erhält man ebenfalls die Verbindungen I, II, III und IV.

Beispiel 4

Beim Ersatz des im Beispiel 2 verwendeten Sitosterins durch Stigmasterin erhält man ebenfalls die Verbindungen I, II, III und IV.

Beispiel 5

Beim Ersatz des im Beispiel 2 verwendeten Sitosterins

durch Campesterin erhält man ebenfalls die Verbindungen I, II, III und IV.

Beispiel 6

Durch Zusatz einer Kombination aus beliebigen Steroiden der Beispiele 2 bis 5 zu dem Sitosterin in Beispiel 2 oder durch Verwendung einer beliebigen Kombination der Steroide der Beispiele 2 bis 5 anstelle des Sitosterins in Beispiel 2 erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 7

Bei Ersatz von *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6842 in Beispiel 1 durch einen Mikroorganismus der Gattung *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* und *Streptomyces* erhält man Mikroorganismenmutanten, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit oder ohne 17-Alkylseitenketten mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlenstoffatomen und zur Bildung von Verbindungen der Formeln I, II, III und IV in der Gärbrühe auszeichnen.

Beispiel 8

Durch Ersatz des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128 in den Beispielen 2 bis 6 durch die gemäss Beispiel 7 hergestellten Mutanten erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 9

Durch Ersatz des *M. fortuitum* ATCC 6842 in Beispiel 1 durch einen sterinabbauenden Mikroorganismus der Gruppe *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis*, *M. rhodochrous*, *M. mucosum* und *M. butyricum* erhält man Mikroorganismenmutanten, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit oder ohne 17-Alkylseitenketten mit 2 bis einschliesslich 10 Kohlenstoffatomen und zur Bildung bzw. Anhäufung von Verbindungen der Formeln I, II, III und IV in der Gärbrühe auszeichnen.

Beispiel 10

Durch Ersatz des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128 in den Beispielen 2 bis 6 durch die gemäss Beispiel 9 hergestellten Mutanten erhält man ebenfalls Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 11

Durch Ersatz des Sitosterins im Beispiel 2 durch Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion, Dehydroepiandrosteron oder Testosteron erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 12

Durch Ersatz des Sitosterins im Beispiel 2 durch eine Kombination aus zwei oder mehreren Sterinen, bestehend aus Sitosterin, Cholesterin, Stigmasterin, Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion, Dehydroepiandrosteron und Testosteron, erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 13

Durch Ersatz des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128 in den Beispielen 11 und 12 durch die gemäss Beispiel 7 hergestellten Mutanten erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.

Beispiel 14

Durch Ersatz des Mutanten *M. fortuitum* NRRL B-8128 in den Beispielen 11 und 12 durch die gemäss Beispiel 9 hergestellten Mutanten erhält man ebenfalls die Verbindungen der Formeln I, II, III und IV.