



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 298 277 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1  
Patentgesetz der DDR  
vom 27. 10. 1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 33/08

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) DD C 12 P / 323 781 6 (22) 23.12.88 (44) 13.02.92

(71) siehe (73)

(72) Schultze, Maria, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Scholz, Christa, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Giest, Erwin, Dipl.-Ing.; Graba, Ulta, Dipl.-Biol.; Feuersenger, Rüdiger, Dipl.-Biol.; Simon, Axel, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem.; Pankalla, Marion, Dipl.-Biol.; Heller, Ingeborg, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Roeder, Bernd, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat. Dipl.-Biol., DE

(73) FZB Biotechnik GmbH, Alt Stralau 62, O - 1017 Berlin; Jenapharm GmbH Jena, O - 6900 Jena; Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena, DE

(54) Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Prednisolon-17-Acetat

(55) Prednisolonherstellung; Prednisolon-17-acetat; mikrobielle 11 $\beta$ -Hydroxylierung; veresterte 11-Desoxy-1,4-dien-steriode der Pregnanreihe; Cochliobolus lunatus 148; Absidia orchicles 409; Absidia coerulea 468; Energiezufuhr, kontinuierlich; Kohlenhydrate; Glucose; cyanidempfindlicher Atmungsweg der Zellen; Indikator; Prozeßkontrolle; Atmungsaktivität der Zellen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Prednisolon-17-Acetat und bezieht sich auf ein Verfahren zur mikrobiellen Transformation von 11-Desoxy-1,4-dien-3-oxosteroiden der Pregnanreihe, die in 17 und 21-Stellung verestert oder nur in 17 $\alpha$ -Stellung verestert sind, zu Prednisolon-17-acetat, d. h. zu 17 $\alpha$ -Acetoxy-11 $\beta$ , 21-dihydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion. Diese mikrobielle Transformation stellt eine vorteilhafte Variante zur Gewinnung von Glucocorticoiden, speziell Prednisolon, dar. Prednisolon ist ein hochwirksames Arzneimittel zur Behandlung von Allergien, rheumatischer Arthritis, Asthma, Dermatosen u. a. Erfindungsgemäß wird dem Mikroorganismus bei ausreichender Belüftung ab dem Zeitpunkt der höchsten Produktbildungsrate bis zum Ende der Fermentation eine dem Verbrauch äquivalente Menge an Energie in Form von Kohlenhydraten, insbesondere Glucose, kontinuierlich zur Verfügung gestellt. Der Beginn der Glucosedosierung erfolgt spätestens, wenn der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Abluft ein Minimum aufweist. Der cyanidempfindliche Atmungsweg der Zellen wird als Indikator einer oxidativen Stoffwechsellage zur Prozeßkontrolle genutzt, indem die Atmungsaktivität der Zellen in bekannter Weise polarographisch gemessen wird. Der pO<sub>2</sub>-Gehalt kann ab Beginn der Glucosedosierung < 30% sein. Die Glucosedosierung erfolgt in Mengen von 30 bis 100 mg, bevorzugt 40 bis 50 mg Glucose/g Biomassetrockengewicht x h. Besonders geeignet sind die Stämme Cochliobolus lunatus 148, Absidia orchicles 409 oder Absidia coerulea 468.

### Patentansprüche:

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Prednisolon-17-acetat durch 11  $\beta$ -Hydroxylierung der veresterten 11-Desoxy-1,4-dien-steroiden der Pregnanreihe, **dadurch gekennzeichnet**, daß dem Mikroorganismus bei ausreichender Belüftung ab dem Zeitpunkt der höchsten Produktbildungsrate eine dem Verbrauch äquivalente Menge an Energie in Form von Kohlenhydraten wie Glucose oder Saccharose kontinuierlich bis zum Ende der Fermentation zur Verfügung gestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Kohlenhydratquelle Glucose eingesetzt wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Beginn der Glucosedosierung spätestens dann erfolgt, wenn der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Abluft ein Minimum aufweist.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der cyanidempfindliche Atmungsweg der Zellen als Indikator für einen oxidativen Stoffwechsel zur Prozeßkontrolle genutzt, indem die Atmungsaktivität der Zellen in bekannter Weise polarographisch gemessen wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Glucose kontinuierlich in Mengen von 30 bis 100 mg Glucose/g Biomassetrockengewicht  $\times$  h, bevorzugt 40 bis 50 mg Glucose/g Biomassetrockengewicht  $\times$  h, zugegeben wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Stämme *Cochliobolus lunatus* 148, *Absidia orchides* 409 oder *Absidia coerula* 468 eingesetzt werden.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Transformation von 11-Desoxy-1,4-dien-3-oxosteroiden der Pregnanreihe, die in 17 und 21-Stellen verestert oder nur in 17 $\alpha$ -Stellung verestert sind, zu Prednisolon-17-acetat, d. h. zu 17 $\alpha$ -Acetoxy-11 $\beta$ , 21-dihydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion.

Die mikrobielle 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxy-1,4-dien-3-oxo-steroiden stellt eine vorteilhafte Variante zur Gewinnung von Glucocorticoiden, speziell Prednisolon dar. Prednisolon ist ein hochwirksames Arzneimittel zur Behandlung von Allergien, rheumatischer Arthritis, Asthma, Dermatosen u. a.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bekannt ist, daß synthetische Glucocorticoide, wie z. B. 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion (Prednisolon), allgemein durch zwei mikrobielle Stufen, eine 11-Hydroxylierung und einer sich anschließenden 1-Dehydrierung, aus den entsprechenden 4-En-3-oxo-11-desoxysteroiden hergestellt werden (vgl. H. J. Rehm, G. Reed; *Biotechnology*, Verlag Chemie, Weinheim 1984, Vol 6a, chap. 2, S. 36).

11 $\beta$ -Hydroxylierungen der entsprechenden 1,4-Dienverbindungen sind aus der DE-OS 2901 561 bekannt. Dieses Verfahren arbeitet mit dem 17 $\alpha$ -21-Orthoester eines 1,4-Dien-3-oxo-steroids, läßt aber nur Umsätze von 0,5g Steroid/l Kulturlösung zu. Es werden zur 11 $\beta$ -Hydroxylierung geeignete Mikroorganismen wie *Curvularia*, *Cunninghamella* und *Trichothecium* verwendet. Es wurden auch mikrobielle Verfahren zur Herstellung der 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-Trihydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion-Derivate (Prednisolon) sowie Prednisolon-17-acetat aus den zugehörigen 11-Desoxy-Verbindungen vorgeschlagen, in denen die 11 $\beta$ -Hydroxylierung unter Einsatz von Pilzen der Gattungen *Cochliobolus* bzw. *Absidia* und Zusatz eines Induktors realisiert wird. Nach einem dieser Verfahren erfolgt die 11 $\beta$ -Hydroxylierung in der Weise, daß die Biotransformation hauptsächlich am Ende der logarithmischen Wachstumsphase nach Eintritt der Glucose- und Stickstofflimitation stattfindet. Die Prozeßführung ist auf eine pH-Einstellung zwischen 5 bis 7 ausgerichtet, wobei Glucose oder Schwefelsäure zur pH-Stabilisierung verwendet werden. Bei Einsatz von Glucose wird ein Spiegel von 0,02 bis 0,04g/l angegeben. Für den O<sub>2</sub>-abhängigen Hydroxylierungsprozeß wird ein pO<sub>2</sub> von mehr als 30% für erforderlich gehalten. Die Kultivierungszeit bis zum vollständigen Steroidumsatz von 2 bis 5g/l wird mit 52 bis 60 Stunden angegeben.

Diese Verfahren haben den Nachteil, daß in ihnen vollständige Steroidumsätze nur bei geringeren Substrateinsatzkonzentrationen oder bei relativ langen Kultivierungszeiten erreichbar sind.

### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Raum-Zeit-Ausbeute der mikrobiellen 11 $\beta$ -Hydroxylierung veresteter 11-Desoxy-1,4-diensteroiden der Pregnanreihe, die zum Prednisolon-17-acetat führt, zu erhöhen.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den mikrobiellen Prozeß der 11 $\beta$ -Hydroxylierung durch Verbesserung der Permeation des Steroids durch die Zellumhüllung zu fördern.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß dem Mikroorganismus bei ausreichender Belüftung zur Sicherung der oxidativen Phosphorylierungsprozesse ab dem Zeitpunkt der höchsten Fortbildungsrate eine der zu diesem Zeitpunkt dem

Verbrauch äquivalente Menge an Energie in Form von Kohlenhydraten wie Glucose oder Saccharose, bevorzugt Glucose, kontinuierlich bis zum Fermentationsende zur Verfügung gestellt wird.

Glucose wird in Mengen von 30 bis 100 mg/g Biomassetrockengewicht  $\times$  h (entsprechend 0,45 bis 1,5 g Glucose/l), bevorzugt 40 bis 50 mg/g Biomassetrockengewicht  $\times$  h (entsprechend 0,6 bis 0,75 g Glucose/l) dosiert.

Der Beginn der Glucosedosierung muß spätestens dann erfolgen, wenn der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Abluft ein Minimum aufweist.

Bei dem so geführten Hydroxylierungsprozeß wird der cyanid-empfindliche Atmungsweg der Zellen als Indikator einer oxidativen Stoffwechsellage zur Prozeßkontrolle genutzt, indem die Atmungsaktivität der Zellen polarographisch gemessen wird. Die Messung erfolgt nach bekannten Methoden. Es zeigt sich, daß dieser oxidative Stoffwechselzustand auch bei pO<sub>2</sub>-Werten von <30% aufrechterhalten werden kann.

Durch die erfindungsgemäße Verfahrensweise werden eine Erhöhung des Steroidumsatzes und eine Verkürzung der Fermentationszeit erreicht. Es werden bis 5 g Steroid/l Kulturlösung nahezu vollständig bei ca. 30stündiger Fermentationszeit umgesetzt.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind speziell die Stämme *Cochliobolus lunatus* 148, *Absidia orchides* 409 und *Absidia coerula* 468 geeignet.

#### Ausführungsbeispiele

Das erfindungsgemäße Verfahren soll nachfolgend an Ausführungsbeispielen näher erläutert werden:

##### Beispiel 1

Das Laborverfahren umfaßt folgende Stufen:

Vorkultur 1, Vorkultur 2 und die Hauptkulturstufe, die durch die 11 $\beta$ -Hydroxylierung gekennzeichnet ist.

Ein 500-ml-Rundkolben, befüllt mit 200 ml Vorkulturmedium 1 und mit 1,5 ml einer Sporensuspension von *Cochliobolus lunatus* 148 (ZIMET 43797) beimpft.

Das Vorkulturmedium 1 hat folgende Zusammensetzung: 3% Glucose, 1% Maisquellwasser flüssig, 0,2% NaNO<sub>3</sub>, 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,05% MgSO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 0,002% FeSO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 0,05% KCl, Aqua dest.; pH-Wert 6,5–6,7; Sterilisation 20 min bei 120°C. Die beimpfte Vorkultur wird 72 h bei einer Temperatur von 29  $\pm$  1°C auf einem Fanal-Rundschtüttler bei 240 U/min<sup>-1</sup> geschüttelt.

Die Vorkulturstufe 2 wird durch Beimpfung des VK2-Mediums (1% Glucose, 2% Maisquellwasser flüssig, 0,5% Maiskeimöl, Aqua dest.; pH 6,5–6,7) mit 5% der Vorkulturstufe 1 erhalten. Sie wird 24 h geschüttelt (siehe VK1) und dient dann der Beimpfung der Transformationskultur (Hauptkultur).

Das Hauptkulturmedium hat folgende Zusammensetzung: 0,7% Glucose, 6% Maisquellwasser flüssig, 0,075% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15% MgSO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 0,012% MnSO<sub>4</sub>, 0,005% ZnSO<sub>4</sub>  $\times$  7H<sub>2</sub>O, 0,1% CaCl<sub>2</sub>, 0,2% Maiskeimöl, Aqua dest.; pH 4,5 durch Einstellung mit 1 n NaOH; Sterilisation 30 min bei 120°C. 2,7 l des Hauptkulturmediums werden im 5-l-Laborfermenter (LF2) mit 0,9 g Induktor: (20S)-20-Hydroxymethyl-pregn-4-en-3-on (C<sub>22</sub>-Alkohol), gelöst in 8 ml Methanol, versetzt. Zur Austreibung des Methanols wird ca. 1/2 h bei 500 U/min gerührt. Die Belüftung während dieser Zeit liegt bei 150 l Luft/h.

Danach erfolgt die Zugabe von 300 ml Inoculum (VK2), entsprechend 10% des Arbeitsvolumens des Fermentors.

Während der gesamten Fermentation werden folgende Parameter eingehalten:

Temperatur:	29 $\pm$ 1 °C
Belüftung:	0,33 vvm
Rührerdrehzahl:	Startdrehzahl 400 U/min Bei pO <sub>2</sub> < 30% stufenweise Erhöhung der Drehzahl bis max. 800 U/min. Danach kann der pO <sub>2</sub> auch Werte < 30% annehmen.
pH-Wert:	pH 4,5 (Regelung durch Dosierung von 1 N Schwefelsäure)

Zur 6., 9. und 12. Fermentationsstunde werden der Kulturlösung jeweils 3 g 1-Dehydro-RSS-17-acetat, gelöst in 10 ml Aceton, zugegeben.

Während der Fermentation wird der Glucosespiegel mit Glucose-Teststreifen gemessen. Zur 11. Stunde ist Glucose mit dieser Methode nicht mehr nachweisbar und gleichzeitig zeigt der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Abluft ein Minimum. Es wird mit der kontinuierlichen Dosierung von 25 ml 6,6%iger Glucose/h begonnen.

Die Kontrolle der Transformation erfolgt dünnschichtchromatographisch. Nach 30stündiger Fermentation ist die Transformation beendet – 1-Dehydro-RSS-17-acetat ist nicht mehr nachzuweisen.

Die Fermentation wird abgeschlossen, Fermentorablauf und Spülwasser werden der Aufarbeitung zugeführt.

Es werden 95% der Theorie an Prednisolon-17-acetat in der Kulturlösung erhalten. Die Konzentration des Ausgangssteroids ist <3%.

##### Beispiel 2

Die Untersuchung des zur Prozeßkontrolle als Indikator genutzten CN<sup>-</sup>-hemmbaren Atmungsweges wird in diesem Beispiel erläutert.

Die Kultivierung des Pilzes *Cochliobolus lunatus* 148 (ZIMET 43797) wird entsprechend Beispiel 1 ausgeführt. Zur Transformation werden 4 g/l Steroid eingesetzt, die Zugaben zum Hauptkulturmedium erfolgen zur 0., 6., 9. und 12. Stunde mit jeweils 3 g 1-Dehydro-RSS-17-acetat, gelöst in 10 ml Aceton.

Zur Bestimmung des Anteils der CN<sup>-</sup>-hemmbaren Atmung werden während der Fermentation Proben der Kulturlösung entnommen und die vom Kulturfiltrat abgetrennten und in Phosphat-Puffer (0,1 M/l, pH 7) resuspendierten Zellen (10–20 mg Trockengewicht/6 ml) in einer geschlossenen pO<sub>2</sub>-Meßzelle mit einer pO<sub>2</sub>-Elektrode nach Clark vermessen. Nach Einstellung einer konstanten Atmungsrate wird mit KCN gehemmt (Konzentration in der Meßzelle 2 mmol/l).

Die einzelnen Phasen des Biotransformationsprozesses sind durch unterschiedliche Atmungsraten gekennzeichnet.

Das erste Drittel der Fermentation wird durch einen Anstieg der respiratorischen Aktivitäten charakterisiert. Zur 12. Stunde erreicht die Atmungsrate einen Maximalwert von  $20 \text{ n mol O}_2/\text{mg TG} \times \text{min}$ . Dieser Wert bleibt über den durch hohe Transformationsleistungen gekennzeichneten Kultivierungszeitraum konstant, obwohl der  $\text{pO}_2$ -Gehalt der Kulturlösung auf etwa 5% absinkt!

### **Beispiel 3**

Die Anzucht des Pilzes *Cochliobolus lunatus* bis zur Vorkulturstufe 2 erfolgt entsprechend Beispiel 1.

Der mit 2,7l Hauptkulturmedien (siehe Beispiel 1) befüllte Fermentor LF2 wird 0,5h vor Fermentationsbeginn mit 1,5g Induktor, gelöst in 10ml Methanol und 3g 1-Dehydro-RSS-17-acetat, gelöst in 10ml Aceton, versetzt. Zur Austreibung der Lösungsmittel wird  $1/2\text{h}$  gerührt.

Zur Stunde 0 der Fermentation wird der Fermentor mit 300ml VK2 (siehe Beispiel 1) beimpft.

Die Fermentationsbedingungen sind analog Beispiel 1.

Die weitere Substratzugabe erfolgt zur 6., 8., 10. und 12. Fermentationsstunde. Es werden jeweils 3g 1-Dehydro-RSS-17-acetat/10ml Aceton dosiert.

Zur 12. h beginnt die kontinuierliche Glucosedosierung analog Beispiel 1. Die Fermentation ist nach 35h beendet, Fermentorablauf und Spülwasser werden der Aufarbeitung zugeführt.

Die Ausbeute an Prednisolon-17-acetat in der Kulturlösung beträgt 91% der Theorie.