



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 247 465 A5

4(51) C 12 P 31/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 P / 290 625 8
(31) P3519548.7

(22) 27.05.86
(32) 29.05.85

(44) 08.07.87
(33) DE



(71) siehe (73)

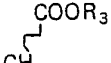
(72) Petzoldt, Karl, Dr.; Dahl, Helmut, Dr.; Skuballa, Werner, Dr., Personen mit ständigem Wohnsitz in Berlin (West), DE

(73) SCHERING AG, 1000 Berlin (West) 65, Müllerstraße 170–178, WB und Bergkamen, DE

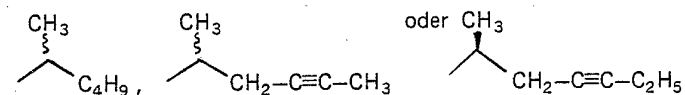
(54) Verfahren zur Herstellung von 15 α -Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukten

(57) Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur enantioselektiven Reduktion der 15-Ketogruppe in bicyclischen Prostaglandin-Zwischenproduktion zu 15 α -Hydroxyverbindungen der allgemeinen Formel, worin

X Sauerstoff oder eine CH₂-Gruppe,A eine trans -CH=CH- oder -C \equiv C-Gruppe,B Sauerstoff, die Reste  oder 

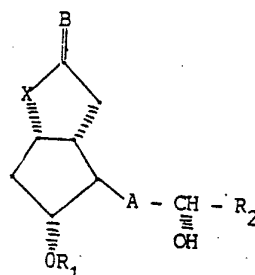
oder den  mit R₃ in der Bedeutung einer C₁-C₄-Alkylgruppe,

R₁ Wasserstoff, Tetrahydropyranyl, Benzoyl, tert.-Butyldimethylgilyl oder tert.-Butyldiphenylgilyl und

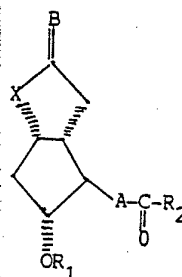
R₂ die Reste

bedeuten,

dadurch gekennzeichnet, daß man ein Keton der allgemeinen Formel II, worin A, B, X, R₁ und R₂ die oben angegebene Bedeutung haben, mit Candida- oder Pichia-Stämmen behandelt und das dabei entstehende 15-Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukt isoliert. Formel (I), (II)



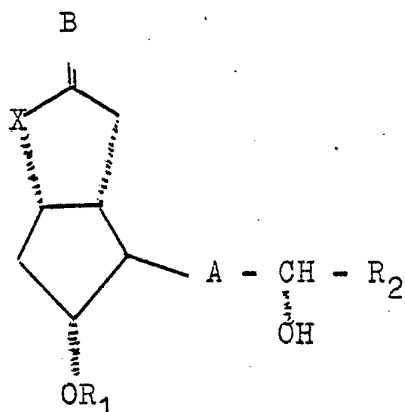
(I)



(II)

Erfindungsanspruch:



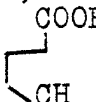
1. Verfahren zur Herstellung von 15 α -Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukten der allgemeinen Formel



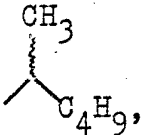
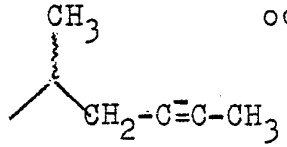
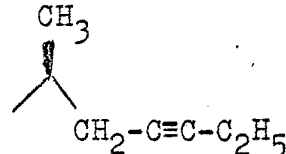
worin

X Sauerstoff oder eine CH₂-Gruppe,

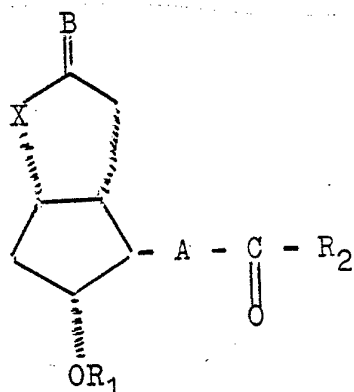
A eine trans-CH=CH- oder -C \equiv C-Gruppe,

B Sauerstoff, die Reste  oder 
oder den  mit R₃ in der Bedeutung einer C₁-C₄-Alkylgruppe,

R₁ Wasserstoff, Tetrahydropyranyl, Benzoyl, tert.-Butyldimethylsilyl oder tert.-Butyl-diphenylsilyl und

R₂ die Reste ,  oder 

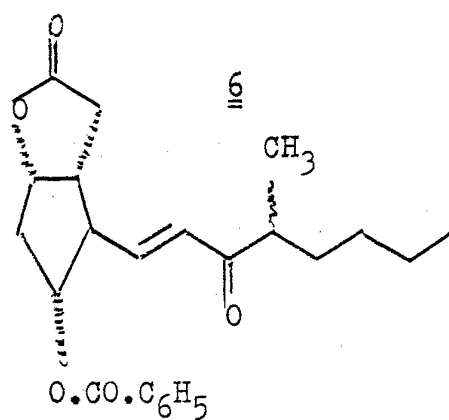
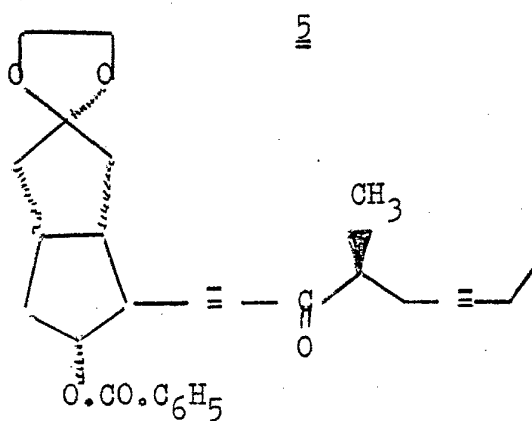
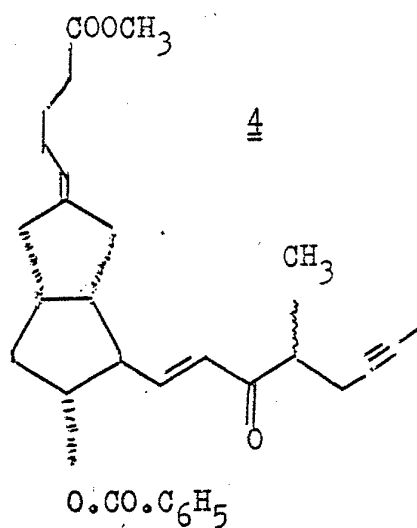
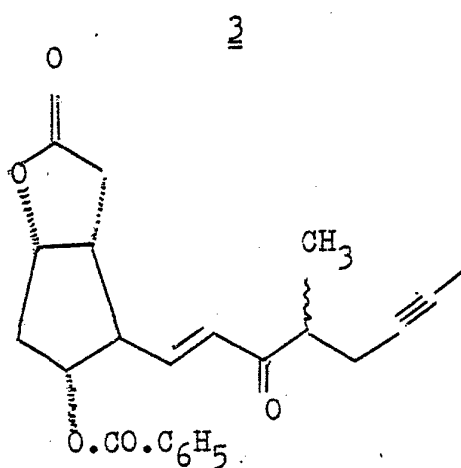
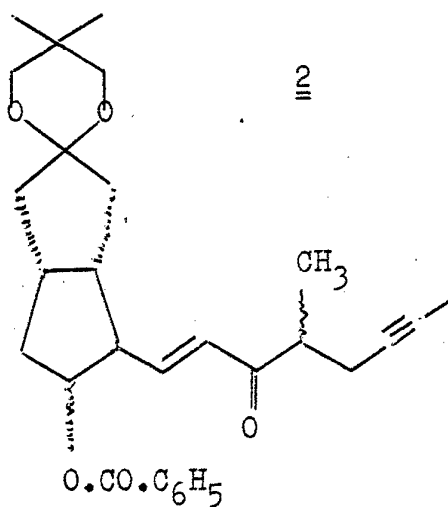
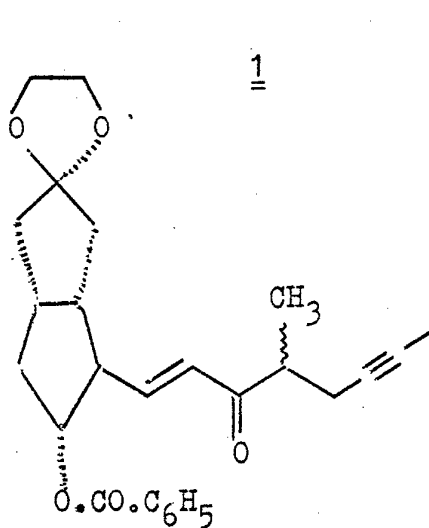
bedeuten, gekennzeichnet dadurch, daß man ein Keton der allgemeinen Formel II



worin A, B, X, R₁ und R₂ die oben angegebene Bedeutung haben, mit Candida- oder Pichia-Stämmen behandelt und das dabei entstehende 15-Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukt isoliert.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 15 α -Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukten.
Die Erfindung eignet sich besonders zur mikrobiologischen Reduktion der nachstehend aufgeführten Prostacyclin-Zwischenstufen 1 bis 6.



Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Aus der EP-PS 12710 ist der nachfolgende Stand der Technik bekannt:

Während die chemische Reduktion der 15-Ketogruppen in Prostaglandinen und Prostaglandin-Zwischenprodukten zum Beispiel mit Natriumborhydrid nur über Gemische der entsprechenden 15 α - und 15 β -Hydroxyverbindungen und wegen der sich anschließenden Trennung nur unter Ausbeuteverlusten zu den gewünschten 15 α -Hydroxyprostaglandinen führt, sind durch die US-PS 3687811 eine Reihe von Mikroorganismen bekannt, die die 15-Ketogruppe in 11-Hydroxy-15-oxo-prostaglandinen je nach bereits vorhandener Konformation der 11-Hydroxygruppe in die entsprechende trans-15-Hydroxygruppe umwandeln. Mit dem Verfahren aus der DE-OS 2357815 verfügt der Stand der Technik über eine mikrobiologische Methode, die zum Beispiel ein 11-Hydroxy-15-oxo-prostaglandin in ein Gemisch aus 11 α , 15 α -, und 11 β , 15 β -Dihydroxy-prostaglandin umwandelt. Die cis-Anordnung der 11 α , 15 α -Hydroxygruppen entspricht derjenigen in biologisch aktiven Prostaglandinen.

Die in der DE-OS 2401761 beschriebene Methode versagt ebenso wie alle genannten Verfahren.

Die in der EP-PS 12710 genannten Stämme *Kloeckera*, *Saccharomyces* und *Hansenula* reduzieren die 15-Ketogruppe in Prostacyclin-Zwischenprodukten nur teilweise und die Ausbeuten an Prostacyclin-Zwischenprodukten mit 15 α -Hydroxygruppe sind sehr schlecht.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines verbesserten mikrobiologischen Verfahrens zur enantioselektiven Reduktion der 15-Ketofunktion in bicyclischen Prostacyclin-Zwischenprodukten zu den entsprechenden 15 α -Hydroxy-Verbindungen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

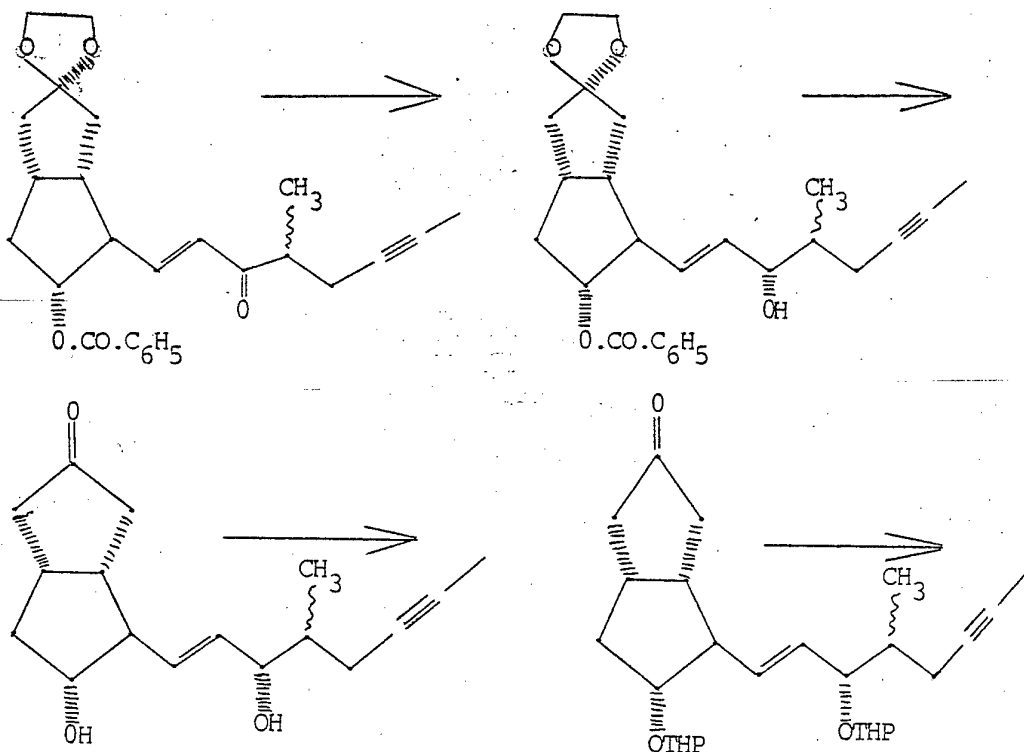
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Mikroorganismenstämme für eine mikrobiologische Reduktion aufzufinden.

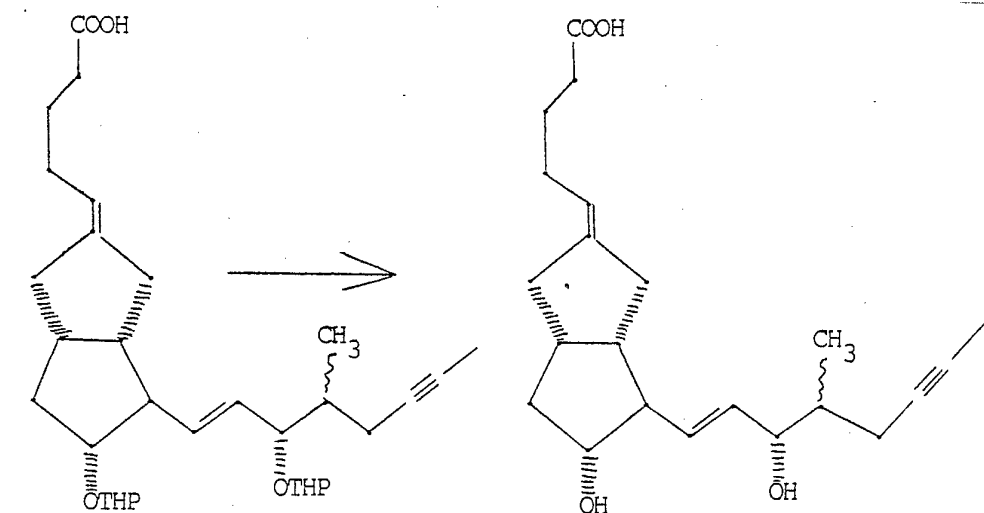
Erfindungsgemäß wird die mikrobiologische Reduktion an den vorstehend aufgeführten prostacyclin-Zwischenprodukten mit folgenden Mikroorganismen-Stämmen durchgeführt:

Candida solani (NCYC41), *Candida guilliermondii* (NRRL-y-118) und *Pichia farinosa* (CBS 185). Besonders bewährt hat sich von diesen Stämmen der Stamm *Candida solani*.

Bei Verwendung von *Candida*- oder *Pichia*-Stämmen lassen sich die oben genannten Prostacyclin-Zwischenstufen in sehr guten Ausbeuten enantioselektiv zu den entsprechenden 15 α -Hydroxy-Verbindungen reduzieren.

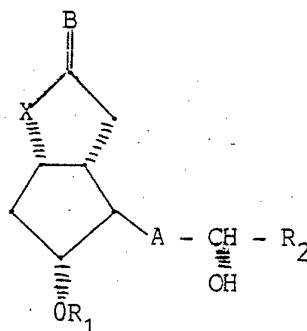
Aus den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten 15 α -Hydroxyverbindungen lassen sich unter Erhaltung des Asymmetriezentrums in 15-Position pharmakologisch wirksame Prostacycline herstellen. Beispielsweise gelangt man von (1S, 2S, 4R, 5R)-7,7-Ethylendioxy-3-benzoyloxy-2-[(1E), (4RS)-4-methyl-3-oxo-oct-1-en-6-in-yl]-bicyclo[3.3.0]octan (1) ausgehend in einer mehrstufigen Synthese zum Wirkstoff Iloprost (beschrieben in EP 11591)





Unter den verschiedenen Arten der angegebenen Klassen von Mikroorganismen treten naturgemäß Unterschiede der Wirksamkeit in der erfindungsgemäßen Reduktion auf. *Candida solani* (NCYC41), *Candida guilliermondii* (NRRL-y-118) und *Pichia farinosa* (CBS 185), liegen gute Ergebnisse vor, wobei Reduktionen mit dem Stamm *Candida solani* (NCYC41) besonders gute Ausbeuten ergeben.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur enantioselektiven Reduktion der 15-Ketogruppe in bicyclischen Prostaglandin-Zwischenprodukten zu 15 α -Hydroxyverbindungen der allgemeinen Formel



worin X Sauerstoff oder eine CH₂-Gruppe,

A eine trans -CH=CH- oder -C \equiv C-Gruppe,

B Sauerstoff, die Reste oder

oder den mit R₃ in der Bedeutung einer C₁-C₄-Alkylgruppe,

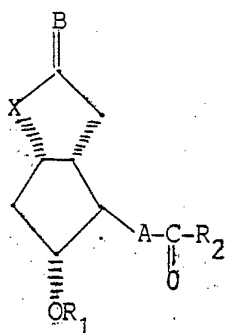
R₁ Wasserstoff, Tetrahydropyranyl, Benzoyl, tert.-Butyldimethylgilyl

oder tert.-Butyldiphenylgilyl und

R₂ die Reste , oder

bedeuten,

dadurch gekennzeichnet, daß man ein Keton der allgemeinen Formel II



(II),

worin A, B, X, R₁ und R₂ die oben angegebene Bedeutung haben, mit *Candida*- oder *Pichia*-Stämmen behandelt und das dabei entstehende 15-Hydroxy-Prostaglandin-Zwischenprodukt isoliert.

Unter C₁-C₄-Alkyl werden Methyl, Ethyl, Propyl, Isopropyl, Butyl, Isobutyl, sec.-Butyl und tert.-Butyl verstanden.

Besonders vorteilhaft arbeitet das Verfahren, wenn R₁ in Verbindungen der Formel II Benzoyl bedeutet.

Je nach der letztlich gewünschten Bedeutung von R₁ können die Schutzgruppen nach an sich bekannten Methoden abgespalten werden.

Zunächst werden unter den für die genannten Mikroorganismen üblicherweise verwendeten Kulturbedingungen in einem geeigneten Nährmedium und unter Belüften Submerskulturen angezüchtet. Dann setzt man den Kulturen das Substrat (in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst oder vorzugsweise in emulgierter Form) zu und fermentiert, bis eine maximale Substratumwandlung erreicht ist.

Geeignete Substratlösungsmittel sind beispielsweise Methanol, Äthanol, Glykolmonomethyläther, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxyd. Die Emulgierung des Substrats kann beispielsweise bewirkt werden, indem man dieses in mikronisierter Form oder in einem mit Wasser mischbaren Lösungsmittel (wie Methanol, Äthanol, Aceton, Glykolmonomethyläther, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd) gelöst unter starker Turbulenz in (vorzugsweise entkalktem) Wasser, welches die üblichen Emulgationshilfen enthält, eindüst. Geeignete Emulgationshilfen sind nichtionogene Emulgatoren, wie zum Beispiel Äthylenoxydaddukte oder Fettsäureester von Polyglykolen. Als geeignete Emulgatoren seien die handelsüblichen Netzmittel Tegin^(R), Tagat^(R) und Span^(R) beispielsweise genannt.

Oft ermöglicht die Emulgierung der Substrate einen erhöhten Substratdurchsatz und somit eine Steigerung der Substratkonzentration. Es ist aber selbstverständlich auch möglich, bei dem erfindungsgemäßen Verfahren andere Methoden zur Steigerung des Substratdurchsatzes, wie sie dem Fermentationsfachmann wohl bekannt sind, anzuwenden.

Die optimale Substratkonzentration, Substratzugabezeit und Fermentationsdauer ist von der Struktur des verwendeten Substrates und der Art des verwendeten Mikroorganismus abhängig. Diese Größen müssen, wie dies bei mikrobiologischen Umwandlungen allgemein erforderlich ist, im Einzelfall durch Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, ermittelt werden.

Die Stämme *Candida solani* (NCYC41) und *Pichia farinosa* (CBS 185) wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen unter den Nummern DSM 3315 und DSM 3316 am 21.5.1985 hinterlegt.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Ausführungsbeispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Beispiel 1

Ein 2-l-Erlenmeyerkolben, der 500 ml einer 30 Min. bei 120°C im Autoklaven sterilisierten Nährlösung, bestehend aus 1,5% Glucose-Monohydrat, 0,5% Yeast-Extract (Difco), 0,5% Corn steep liquor und 0,5% Ammoniumsulfat, pH auf 6,3 eingestellt, enthält, wird mit einer Schrägarkultur des Stammes *Candida solani* (NCYC41) beimpft und 2 1/2 Tage auf einem Rotationsschüttler bei 30°C geschüttelt.

Mit 250 ml dieser Anzuchtskultur wird ein 20-l-Vorfermenter beimpft, der mit 15 l einer 30 Min. bei 121°C und 1,1 bar Überdruck sterilisierten Nährmediums der gleichen Zusammensetzung wie die Anzuchtskultur beschickt ist. Unter Zugabe von Silicon SH als Antischaummittel wird bei 25°C und 0,7 bar Überdruck unter Belüftung (15 l/Min.) und Rühren (220 U/Min.) 36 Stunden germiniert.

Danach werden 0,9 l dieser Vorfermenterkultur unter sterilen Bedingungen entnommen und damit ein 20-l-Hauptfermenter beimpft, der 10 l sterilisierte Nährlösung der gleichen Zusammensetzung wie die Vorfermenterkultur enthält. Nach einer Anwuchsphase von 6 Stunden unter Vorfermenterbedingungen wird eine sterilisierte Lösung von 4 g (1S, 2S, 3R, 5R)-7,7-Ethylendioxy-3-benzoyloxy-2-[(1E), (4RS)-4-methyl-3-oxo-oct-1-en-6-in-yl]-bicyclo[3.3.0]octan gelöst in 100 ml Dimethylformamid, zugegeben und weiter gerührt und belüftet.

Nach 90 Stunden Kontaktzeit ist die Umsetzung beendet. Die Kulturbrühe wird 3mal mit Methylisobutylketon extrahiert, die Extrakte vereinigt und i. V. zur Trockne eingeeengt. Der ölige Rückstand wird in Methanol aufgenommen, von Siliconöl abfiltriert und wieder zur Trockne eingedampft. Das hinterbliebene ölige Rohprodukt wird in Methylenchlorid gelöst und zur weiteren Reinigung über eine Kieselgelsäule mittels eines Lösungsmittelgradienten 5 l Hexan/4 l Hexan + 1 l Aceton chromatographiert. Man erhält hierbei 2,75 g reines (1S, 2S, 3R, 5R)-7,7-Ethylendioxy-3-benzoyloxy-2-[(1E), (3S, 4RS)-3-hydroxy-4-methyl-oct-1-en-6-in-yl]-bicyclo[3.3.0]octan in Form eines farblosen Öls.

Beispiel 2

Unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen wird zur gewünschten Ketoreduktion der Stamm *Candida guilliermondii* (NRRL-y-118) verwendet.

Beispiel 3

Unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen wird zur gewünschten Ketoreduktion der Stamm *Pichia farinosa* (CBS 185) verwendet.

Beispiel 4

Unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen wird die Verbindung 3 mit Hilfe des Stammes *Candida solani* (NCYC41) zur entsprechenden 15 α -Hydroxyverbindung reduziert.

Beispiel 5

Unter den in Beispiel 1 angegebenen Bedingungen wird die Verbindung 5 mit Hilfe des Stammes *Candida solani* (NCYC41) zur entsprechenden 15 α -Hydroxyverbindung reduziert.
