



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 249 284 A1

4(51) C 12 P 33/18
C 07 J 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 290 529 8	(22)	23.05.86	(44)	02.09.87
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD				
(72)	Seidel, Lothar, Dipl.-Biol.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat.; Birke, Michael, Dipl.-Pharm.; Noack, Dieter, Dr. habil. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion				

(57) Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) aus Sterolen bzw. Sterolgemischen durch mikrobiellen Abbau. 9-OH-AD ist ein wichtiges Ausgangsprodukt für die Partialsynthese von Steroidpharmaka. Die Erfindung verfolgt das Ziel, die Substanz 9-OH-AD innerhalb wesentlich verkürzter Fermentationszeiten in guten Ausbeuten herzustellen. Die diesem Ziel zugrunde liegende Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß die Fermentation mit einem neuen, apathogenen Mikroorganismus der Art *Mycobacterium vaccae* (vorzugsweise Stamm ZIMET 11052 oder Stamm ZIMET 11053) sowie fakultativ unter Zusatz eines Adsorbers vom Typ eines organischen Polymeren mit einer spezifischen Oberfläche von mindestens 200 m²/g durchgeführt wird.

ISSN 0433-6461

5 Seiten



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **249 284 A1**4(51) C 12 P 33/18
C 07 J 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 P / 290 529 8	(22)	23.05.86	(44)	02.09.87
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD				
(72)	Seidel, Lothar, Dipl.-Biol.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat.; Birke, Michael, Dipl.-Pharm.; Noack, Dieter, Dr. habil. nat., DD				
(54)	Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion				

(57) Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) aus Sterolen bzw. Sterolgemischen durch mikrobiellen Abbau. 9-OH-AD ist ein wichtiges Ausgangsprodukt für die Partialsynthese von Steroidpharmaka. Die Erfindung verfolgt das Ziel, die Substanz 9-OH-AD innerhalb wesentlich verkürzter Fermentationszeiten in guten Ausbeuten herzustellen. Die diesem Ziel zugrunde liegende Aufgabe wird in der Weise gelöst, daß die Fermentation mit einem neuen, apathogenen Mikroorganismus der Art *Mycobacterium vaccae* (vorzugsweise Stamm ZIMET 11052 oder Stamm ZIMET 11053) sowie fakultativ unter Zusatz eines Adsorbers vom Typ eines organischen Polymeren mit einer spezifischen Oberfläche von mindestens 200 m²/g durchgeführt wird.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

Zur PS Nr. 249.284...

ist eine Zeitschrift erschienen.

(Teilweise bestätigt gem. § 18 Abs. 1 d. Änd.Ges.z.Pat.Ges.)

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) durch mikrobielle Transformation von Sterolen mit Stämmen der Gattung **Mycobacterium** unter aeroben und sterilen Bedingungen in wäßrigen Nährmedien, die weiterhin eine Kohlenstoff- und eine Stickstoffquelle sowie Mineralsalze enthalten, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - zur Transformation des jeweiligen Sterols ein Mikroorganismus der Art **Mycobacterium vaccae** eingesetzt und
 - dem wäßrigen Medium gegebenenfalls ein Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren zugesetzt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Steroltransformation ein aus dem Elternstamm NRRL B-3805 gewonnener Mikroorganismus der Art **Mycobacterium vaccae** eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Steroltransformation Stamm **M. vaccae** ZIMET 11 052 eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Steroltransformation Stamm **M. vaccae** ZIMET 11 053 eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß das jeweilige Sterol als solches in das wäßrige Medium eingebracht wird.
6. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß das jeweilige Sterol in Form einer Sterol-Tensid-Präparation in das wäßrige Medium eingebracht wird.
7. Verfahren nach Punkt 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß in der Sterol-Tensid-Präparation ein Tensid aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Blockcopolymere mit einem Anteil von 30% bis 70% Polypropylenglycol eingesetzt wird.
8. Verfahren nach Punkt 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß in der Sterol-Tensid-Präparation ein Tensid aus der Gruppe der Polyethylenoxid-Polypropylenoxid-Addukte des N,N"-Tetra-(-oxypropylpropyl)-N'-(2-oxypropyl)-diethylentriamins eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Punkt 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß Sterol in das Nährmedium bis zu einer Einsatzkonzentration von 1 g/l bis 50 g/l eingebracht wird.
10. Verfahren nach Punkt 1 bis 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß, sofern im Verfahren ein Adsorber Verwendung findet, als solcher ein organisches Polymere, entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Punkt 10, **gekennzeichnet dadurch**, daß, sofern im Verfahren ein Adsorber Verwendung findet, als solcher ein organisches Polymere, entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, mit polaren Gruppen eingesetzt wird.
12. Verfahren nach Punkt 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß, sofern im Verfahren ein Adsorber Verwendung findet, als solcher ein organisches Polymere, entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, mit polaren Gruppen auf der Basis von Acrylsäureestern eingesetzt wird.
13. Verfahren nach Punkt 1 sowie 10 bis 12, **gekennzeichnet dadurch**, daß, sofern im Verfahren ein Adsorber Verwendung findet, dieser dem wäßrigen Medium in einer Konzentration von 10 g/l bis 160 g/l zugesetzt wird.
14. Verfahren nach Punkt 1 bis 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Fermentation bei Temperaturen von 25°C bis 35°C für die Dauer von 48 Stunden bis 96 Stunden unter pH-Werten von pH 6,0 bis pH 9,0 durchgeführt und das entstandene 9-OH-AD nach Abschluß der Fermentation aus der Kulturlösung isoliert wird.
15. Verfahren nach Punkt 10 bis 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß, sofern im Verfahren ein Adsorber Verwendung findet, das 9-OH-AD isoliert wird, indem
 - der Adsorber von der Kulturlösung abgetrennt sowie anschließend mit organischen Lösungsmitteln eluiert und
 - aus dem eingeeengten Eluat durch Umkristallisation das reine Produkt gewonnen wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) aus Sterolen durch mikrobiologische Umwandlung.

9-OH-AD ist ein Schlüsselprodukt für die Herstellung von Steroidwirkstoffen. Aus diesem Produkt können hochwirksame Steroide der Pregnanreihe mit einem großen Nutzungsbereich gewonnen werden.

Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in der pharmazeutischen Forschung und Industrie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannt ist aus der Literatur zunächst ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von 9-OH-AD aus Sterolen (vgl. die Patentschriften DE-AS 2647895 bzw. DD 127 455), bei dem ein unter den Registrier-Nrn. NRRL B-8119 sowie DSM 752 registrierter Mikroorganismus der Art *Mycobacterium fortuitum* für die Steroltransformation zu o. g. Zielprodukt eingesetzt wird.

Dieses Verfahren weist einige wesentliche Nachteile auf: So wird hier zum einen ein Mikroorganismus eingesetzt, der zu den fakultativ pathogenen Species der Gattung *Mycobacterium* zu rechnen ist (R. E. Buchanan u. a., *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 1975; D. P. Nicholson u. W. R. Servier, *Am. Rev. Resp. Dis.* **104** [1971] 747–750). Aus dem Einsatz dieses Mikroorganismus resultiert ein erheblicher zusätzlicher technischer Aufwand für den Gesundheits-, Arbeits- und Umweltschutz. Zum anderen haftet dieser technischen Lösung weiterhin der Nachteil an, daß selbst bei sehr langen Fermentationszeiten (14 bis 15 Tage) nur eine unbefriedigende Produktbildung erfolgt. Nachteilig schlägt bei dieser Lösung außerdem noch zu Buche, daß eine Abtrennung des Fermentationsprodukts 9-OH-AD von nicht umgesetztem Sterol erforderlich ist, da bei einer Extraktion der Fermentationsbrühe neben dem Zielprodukt auch Substrat im Extrakt enthalten ist. Über einen ersten Versuch zur Überwindung eines und zwar des letztgenannten Nachteils dieses Verfahrens berichteten M. Aoki u. a. (vgl. Patentschrift JP-Kokai 7757 161), die zur Aufarbeitung der Fermentationsbrühe unpolare Adsorber vom XAD-Typ einsetzen und auf diese Weise das gebildete Produkt selektiv weitgehend abtrennen konnten.

Ein weiterer Versuch zur Überwindung der Nachteile des Basisverfahrens gemäß DE 2647895 bzw. DD 127 455 liegt außerdem mit der technischen Lösung aus der Patentschrift DD 232 167 vor, bei der unter Einsatz des Stammes *M. fortuitum* ZIMET 10849 und unter Beifügung eines feinverteilten festen, hydrophoben organischen Polymeren zur Fermentationsbrühe in Fermentationszeiten von 2 bis 6 Tagen nunmehr eine befriedigendere 9-OH-AD-Bildung erreicht wird, bei der aber nach wie vor ein Mikroorganismus aus einer Species eingesetzt wird, die ihrerseits eben auch fakultativ pathogene Stämme enthält.

Bekannt ist schließlich das mikrobielle Verfahren zur 9-OH-AD-Herstellung gemäß der Patentschrift JP-KTK 8085397, in welchem die selektive Steroltransformation mit Hilfe eines Stammes der Art *Mycobacterium vaccae* durchgeführt wird (Stamm *M. vaccae* MCI-1104). Zwar kommt in dieser technischen Lösung ein apathogener Stamm zum Einsatz, jedoch findet auch nach langen Fermentationszeiten wiederum nur eine wenig befriedigende Produktbildung statt (aus 20 g Cholesterol innerhalb von reichlich 8 Tagen beispielsweise nur 0,83 g 9-OH-AD).

Ziel der Erfindung

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, aus Sterolen in guten Ausbeuten 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD), ein Zwischenprodukt für die Erzeugung von Steroidpharmaka, herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes mikrobielles Verfahren zur Herstellung von 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD) zu beschreiben, das dieses Produkt bei hohem Steroldurchsatz und wesentlich verkürzten Fermentationszeiten in guten Ausbeuten liefert.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe nach dem Prinzip der mikrobiellen Steroltransformation unter Einsatz von Stämmen der Gattung *Mycobacterium* gelöst. Dabei besteht ein wesentliches Merkmal des vorgeschlagenen Verfahrens darin, zur Transformation eines Sterols zu 9-OH-AD neue Stämme der als apathogen eingeordneten Mikroorganismen-Art *Mycobacterium vaccae* einzusetzen, vorzugsweise solche, die im Ergebnis einer spezifischen Behandlung aus dem in der Literatur ausdrücklich als AD-Bildner (AD — Kurzbezeichnung für Androst-4-en-3,17-dion) ausgewiesenen apathogenen Stamm *M. vaccae* NRRL B-3805 erhalten worden sind. 2 Mikroorganismen aus dieser Gruppe neuer, gleichfalls apathogener *M. vaccae*-Stämme mit 9-OH-AD-Bildungsvermögen sind in der ZIMET-Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der AdW, DDR - 6900 Jena, Beutenbergstr. 11 unter den Registrier-Nrn. ZIMET 11 052 und ZIMET 11 053 hinterlegt worden.

Für den verfahrensgemäßen Zweck wird in den verschiedenen Varianten der Erfindung unter aeroben und sterilen Kulturbedingungen somit jeweils ein neuer Stamm obiger Kennzeichnung in einem wäßrigen Nährmedium fermentiert, welches neben Sterol eine Kohlenstoffquelle (wie beispielsweise Glycerol, Glucose, Saccharose, Stärke oder Lactose), eine Stickstoffquelle (wie beispielsweise Hefeextrakt, Harnstoff oder Caseinhydrolysat) sowie Mineralsalze enthält. Zu dieser Fermentation werden Sterole wie Sitosterol, Cholesterol, Campesterol, Stigmasterol bzw. Ergosterol oder Gemisch dieser Sterole herangezogen. Das Sterol wird entweder als solches oder in Form einer Sterol-Tensid-Präparation in das wäßrige Fermentationsmedium eingebracht, wobei die Sterol-Einsatzkonzentration im Bereich von 1,0 g/l bis 50 g/l Fermentationsmedium gewählt wird. Die gegebenenfalls zu verwendenden Sterol-Tensid-Präparationen werden bereitgestellt, indem das jeweilige Sterol mittels Naßvermahlung, Lyophilisierung oder Sprühtrocknung mit einem Tensid der nachstehend gekennzeichneten Gruppen A oder B vermischt wird, wobei das Tensid einen Anteil von 1,0 bis 20 Gew.-% an der fertigen Präparation ausmacht. Unter Tensiden der Gruppen A bzw. B werden wie in einer unserer früheren Patentanmeldungen

Polyethylenoxid(PEO)-Polypropylenoxid(PPO)-Blockcopolymere mit einem Anteil von 30% bis 70% Polypropylenglycol bzw. die PEO-PPO-Addukte des N,N"-Tetra(-oxypropylenpropyl)-N'-(2-oxypropyl)-diethylentriamins verstanden.

Die Fermentation erfolgt zweckmäßigerweise in den Stufen Vor- und Hauptkultivierung; sie wird bei Temperaturen von 25°C bis 35°C für die Dauer von 48 Stunden bis 96 Stunden durchgeführt, wobei der pH-Wert im Bereich von pH 6,0 bis pH 9,0 gewählt wird.

Weiterhin wird dem Fermentationsmedium gegebenenfalls entweder von Beginn an oder im Verlaufe der Kultivierung ein Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren in einer Einsatzkonzentration von 10 g/l bis 160 g/l zugesetzt. Vorzugsweise wird als Adsorber hierbei ein organisches Polymere, entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, verwendet, das eine spezifische Oberfläche von mindestens 200 m²/g aufweist. Speziell wird in den Verfahrensvarianten mit Adsorber-Einsatz ein organisches Polymere, entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, mit polaren Gruppen, insbesondere mit polaren Gruppen auf der Basis von Acrylsäureestern, herangezogen.

Die Fermentation kann in Rundkolben und Steilbrustflaschen verschiedenen Inhalts, in gerührten Glasfermentern sowie in V2A-Stahltanks durchgeführt werden.

Nach Beendigung der Fermentation erfolgt die Gewinnung des gebildeten 9-OH-AD in der Verfahrensvariante ohne Adsorber-Zusatz in an sich bekannter Weise durch Extraktion mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise mit Butylacetat, nebst anschließender Kristallisation.

In der Variante mit Adsorber-Einsatz wird die Aufarbeitung mit der Abtrennung des Adsorbers von der Kulturlösung, vorzugsweise mittels Filtration, eingeleitet, und durch Elution des Adsorbers mit organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Ethanol bzw. Aceton oder mit wäßrigen Lösungen solcher Mittel, durch Einengen des Eluats auf ca. 10% des Ausgangsvolumens mit erneuter Filtration sowie durch Umkristallisation wird schließlich das 9-OH-AD erhalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens, bei der Zellen vom Stamm ZIMET 11 053 in einem Medium mit Zusatz von 140 g/l Adsorber obiger Kennzeichnung für 96 Stunden bei 28°C fermentiert worden sind, ergaben sich in Abhängigkeit von der Sterol-Einsatzmenge im Rundkolben-Maßstab 9-OH-AD-Ausbeuten im Bereich von 35 Gew.-% bis 50 Gew.-% (analytische Werte), wobei ein Reststerolgehalt von weniger als 5 Gew.-% festgestellt wurde. Wie sich erwies, geht unter diesen Verfahrensbedingungen vom Einsatz eines Adsorbers o. g. Beschaffenheit nicht nur ein günstiger Effekt hinsichtlich der Aufarbeitung des gebildeten 9-OH-AD aus; vielmehr resultiert hierdurch darüber hinaus eine Steigerung der Produktbildung selbst und damit auch eine Steigerung in der Sterolverwertung.

Die Vorteile des Verfahrens bestehen zusammengefaßt darin, daß

- das Produkt 9-OH-AD nach kurzen Fermentationszeiten und in guten Ausbeuten unter Einsatz jeweils eines als apathogen klassifizierten Mikroorganismenstammes herstellbar ist und daß
- in der Verfahrensvariante mit Adsorber-Zufügung nicht nur das Produkt 9-OH-AD aus der Kulturlösung entfernt wird, sondern zusätzlich noch weiter gesteigerte Ausbeuten erreichbar sind.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1:

Mycobacterium vaccae ZIMET 11 053 wird auf Schrägagar folgender Zusammensetzung 7 Tage bei 28°C kultiviert: 20 g Glycerol; 5 g Bacto-Peptone; 5 g Fleischextrakt; 15 g Agar-Agar; Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,0 (Röhrchenkultur).

Mit den abgeschwemmten Zellen je eines Röhrchens werden 500 ml-Stehrundkolben beimpft, die je 50 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung enthalten: 10 g Glycerol; 10 g Hefeextrakt; 0,5 g KH₂PO₄; 1,5 g (NH₄)₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄ · 7H₂O; 0,01 g FeSO₄ · 7H₂O; 0,002 g ZnSO₄ · 7H₂O; Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,0.

Nach 72 Stunden Schütteln auf einem Rundschwingtisch bei 200 U/min und 28°C werden jeweils 5 ml dieser Vorkultur zur Beimpfung der Fermentationskultur verwendet.

Zehn 500 ml-Stehrundkolben werden jeweils mit 7 g feuchtem Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren (entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, mit polaren Gruppen auf der Basis von Acrylsäureestern), mit 100 ml Sitosterol-Tensid-Präparation (100 g Sitosterol, 10 g Tensid der Gruppe B, Aqua dest. ad 1000 ml, naßvermahlen) und mit 50 ml

Fermentationsmedium beschickt. Als Fermentationsmedium wird eine Lösung aus 5 g Glukose; 10 g Hefeextrakt; 1,3 g K₂HPO₄ · 3H₂O; 1,5 g (NH₄)₂HPO₄; 0,2 g MgSO₄ · 7H₂O; 0,01 g FeSO₄ · 7H₂O; 0,002 g ZnSO₄ · 7H₂O; Aqua dest. ad 1000 ml; pH 8,0 eingesetzt.

Die so vorbereiteten Kolben werden 20 Minuten bei 120°C sterilisiert sowie nach Abkühlung beimpft, anschließend wird eine 96stündige Fermentation auf dem Rundschwingtisch bei 200 U/min und 28°C vorgenommen.

Die dünnstichtchromatographisch ermittelte durchschnittliche Gesamtausbeute an 9-OH-AD je Rundkolben betrug 330 mg.

Beispiel 2:

Gemäß den Bedingungen von Beispiel 1 für die Röhrchen- und Vorkultur wird Stamm **Mycobacterium vaccae** ZIMET 11 052 angezüchtet.

Zehn 500 ml-Stehrundkolben werden mit jeweils 4 g feuchtem Adsorber obiger Kennzeichnung, mit 500 mg Sitosterol-Tensid-Präparation (500 mg Sitosterol, 50 mg Tensid der Gruppe B, in Benzen gelöst und lyophilisiert) und mit 50 ml Fermentationsmedium der Zusammensetzung von Beispiel 1 beschickt.

Die Ausbeute an 9-OH-AD betrug durchschnittlich 90,6 mg je Rundkolben nach 96stündiger Fermentation auf dem Rundschwingtisch bei 28°C.

Beispiel 3:

Stamm **Mycobacterium vaccae** ZIMET 11 053 wird gemäß den Bedingungen aus Beispiel 1 in Röhrchen- und Flüssigvorkultur angezüchtet.

Die Bedingungen für die Fermentationskultur werden analog Beispiel 1 gewählt, jedoch entfällt der Adsorberzusatz.

Nach 96 Stunden Fermentation auf dem Rundschwingtisch bei 200 U/min und 28°C wurden durchschnittlich 120 mg 9-OH-AD je Rundkolben gebildet.

Beispiel 4:

Die Anzucht in Röhren- und Flüssigvorkulturen des Stamms *Mycobacterium vaccae* ZIMET 11053 erfolgt nach dem in Beispiel 1 genannten Standard.

In zehn 500-ml-Stehrundkolben werden jeweils 5 g Adsorber vom Typ eines organischen Polymeren (entstanden aus Ethylvinyl- und Divinylbenzen, ohne polare Gruppen), 5 ml Sitosterol-Tensid-Präparation obiger Zusammensetzung und 50 ml Fermentationsmedium (Zusammensetzung wie in Beispiel 1) gegeben.

Die Fermentation erfolgt für 72 Stunden bei 28°C auf dem Rundschwingtisch, nachdem die Kolben bei 120°C 20 Minuten sterilisiert und anschließend beimpft worden sind.

Aus der Kulturlösung und dem Adsorber wurden je Rundkolben durchschnittlich 208 mg 9-OH-AD erhalten.
