



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 287 055 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 / 326 492 3	(22)	13.03.89	(44)	14.02.91
(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat.; Groh, Helmut, Dr. rer. nat.; Undisz, Katrin, Dipl.-Biol.; Böhme, Karl-Heinz, Dipl.-Chem.; Stopsack, Heinz, Dr. rer. nat.; Röder, Bernd, Dr. rer. nat., DE				
(73)	Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena; VEB Jenapharm, O - 6900 Jena, DE				
(74)	Akademie der Wissenschaften der DDR, ZIMET, Beutenbergstraße 11, O - 6900 Jena, DE				
(54)	Verfahren zur induzierten Herstellung von 11 β -17 α ,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion-Verbindungen				

(55) 11 β -Hydroxylierung; mikrobielle Transformation; Mikroorganismengattungen *Curvularia*, *Cochliobolus*; aerobe Fermentation; Hydroxylierung von Pregnanderivaten; Kortikoide; Induktion; Abtrennung des Induktors

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur induzierten Herstellung von ungesättigten 11 β ,17 α ,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion-Verbindungen. Sie verfolgt das Ziel, diese Glukokortikoide in verbesserter Weise herzustellen. Die diesem Ziel zugeordnete Aufgabe wird durch mikrobielle Transformation der entsprechenden 11-Desoxy-Steroide (Substrate), d. h. der 17 α ,21-Dihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion-Verbindungen sowie der zugehörigen 1,4-Dien-Verbindungen, in der Weise gelöst, daß ein zur 11 β -Hydroxylierung befähigter Mikroorganismus in einem Medium, dem vor oder mit der Substratzugabe ein Induktor in Form einer in C₂₂-Stellung mit Dicarbonsäuren veresterten und im Ring A ungesättigten 22-Hydroxy-bisnorcholan-3-on-Verbindung oder in Form eines Oxims einer im Ring A ungesättigten und in C₂₂-Stellung eine freie, veretherte oder veresterte Hydroxy- oder eine freie bzw. veresterte Carboxygruppe-tragenden Bisnorcholan-3-on-Verbindung bzw. in Form eines Oxims des Progesterons beigefügt worden ist, fermentiert wird. Bei verfahrensgemäßigem Vorgehen kann eine hohe Glukokortikoid-Ausbeute erreicht werden, wobei die Induktoren sowie deren mikrobielle Abbauprodukte aus dem Produktgemisch wieder vollständig entfernt werden können.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur induzierten Herstellung von ungesättigten 11 β ,17-,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion-Verbindungen auf mikrobiologischem Wege aus 11-Desoxy-Steroiden (Substrate) unter Einsatz eines zur 11 β -Hydroxylierung befähigten Mikroorganismus aus einer der Mikroorganismengattungen *Curvularia*, *Cochliobolus*, *Absidia*, *Cunninghamella* oder *Tieghemella* sowie unter Einsatz von Induktoren, **gekennzeichnet** dadurch, daß man
 - vor oder mit der Substratzugabe einen Induktor
 - in Form einer in C₂₂-Stellung veresterten und im Ring A ungesättigten 22-Hydroxy-bisnorcholan-3-on-Verbindung oder
 - in Form eines Oxims einer im Ring A ungesättigten und in C₂₂-Stellung eine freie, veretherte oder veresterte Hydroxy- oder eine freie bzw. veresterte Carboxygruppe-tragende Bisnorcholan-3-on-Verbindung oder
 - in Form eines Oxims des Progesterons entsprechend der allgemeinen Formel I zusetzt und
 - nach Beendigung der Fermentation entweder aus der alkalisch eingestellten Kulturflüssigkeit das jeweilige ungesättigte 11 β ,17-,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion direkt isoliert oder bei der Gewinnung aus der sauren Kulturflüssigkeit den Induktor durch eine alkalische Behandlung entfernt.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet** dadurch, daß man als Induktor eine in C₂₂-Stellung mit einer Dicarbonsäure veresterte und im Ring A ungesättigte 22-Hydroxy-bisnorcholan-3-on-Verbindung zusetzt.
3. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet** dadurch, daß man als Induktor das Hemisuccinat des 22-Hydroxy-bisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Hydroxy-bisnorchola-1,4-dien-3-ons zusetzt.
4. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet** dadurch, daß man als Induktor ein 3-Carboxymethoxim einer im Ring A ungesättigten und in C₂₂-Stellung eine freie, veretherte oder veresterte Hydroxy- oder eine freie bzw. veresterte Carboxygruppe-tragende Bisnorcholan-3-on-Verbindung zusetzt.
5. Verfahren nach Punkt 4, **gekennzeichnet** dadurch, daß man als Induktor ein 3-Carboxymethoxim des 22-Hydroxybisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Hydroxybisnorchola-1,4-dien-3-ons bzw. des 22-Carboxybisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Carboxybisnorchola-1,4-dien-3-ons zusetzt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur induzierten Herstellung von ungesättigten 11 β ,17-,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion-Verbindungen. Diese 11-Desoxy-Verbindungen sind auf chemischem Wege aus Diosgenin und aus Produkten des mikrobiellen Seitenkettenabbaues von Sterolen zugänglich. Die mikrobiell gewonnenen Vorstufen besitzen häufig schon die für die pharmakologische Wirkung der Glukokortikoide wichtige 1(2)-Doppelbindung. Glukokortikoide sind als Wirkstoffe mit antiinflammatorischer, antirheumatischer und antiallergischer Wirkung in die Humantherapie eingeführt. Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in der pharmazeutischen Forschung und Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Glukokortikoide vom Typ der 11 β -Hydroxy-1,4-dien-3-oxo-Verbindungen allgemein durch mikrobielle Hydroxylierung aus den entsprechenden 4-En-3-oxo-Steroiden herstellbar sind. Wegen des geringeren Umsatzes bzw. der Ausbeuteverringering bei der mikrobiellen 11 β -Hydroxylierung in Gegenwart der 1,4-Dien-Struktur wird die 1(2)-Doppelbindung im Verlauf der Synthese in einer zweiten mikrobiellen Reaktion als letzter Schritt eingeführt (H.J. Rehm and G.D. Reed, *Biotechnology*, Vol. 6a; Verlag Chemie, Weinheim 1984, Chapter 2 „Steroids“; Ed.: L.L. Smith). In den Fällen, in denen bei der 11 β -Hydroxylierung von 1,4-Dien-Verbindungen ausgegangen wurde, konnte der Substratumsatz – wie in einer zwischenzeitlichen Verfahrenslösung bereits dargelegt – durch die Anwendung spezieller Induktoren von 0,5 g/l auf 2 g/l bei 79% Ausbeute gesteigert werden.

Diese technische Lösung besitzt jedoch den Nachteil, daß der Induktor und/oder die mikrobiellen Umwandlungsprodukte des Induktors im Neutralteil der chemischen Aufarbeitung erscheinen und damit das Glukokortikoid-Endprodukt verunreinigen.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, in verbesserter Weise aus Sterolen Glukokortikoide der allgemeinen Formel II (s. Formelschema) herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes mikrobielles Verfahren zur Herstellung von ungesättigten 11 β ,17,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion-Verbindungen (wie z. B. die 1,4-Dehydro-Verbindung Prednisolon) zu beschreiben, das diese Produkte bei hohem Steroldurchsatz, effektiver Sterolverwertung und wesentlich kürzeren Fermentationszeiten in hohen Ausbeuten liefert.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren in seinem Grundzug wie folgt durchgeführt:

11-Desoxy-Steroide (Substrate), d. h. die 17 α ,21-Dihydroxy-pregna-4-en-3,20-dion-Verbindungen sowie die zugehörigen 1,4-Dien-Verbindungen werden unter Einsatz eines zur 11 β -Hydroxylierung befähigten Mikroorganismus aus einer der Mikroorganismengattungen *Curvularia*, *Cochliobolus*, *Absidia*, *Cunninghamella* oder *Tieghemella* und unter Verwendung eines Induktors fermentiert, wobei vor oder mit der Substratzugabe der Induktor in Form einer in C₂₂-Stellung mit einer Dicarbonsäure veresterten und im Ring A ungesättigten 22-Hydroxy-bisnorcholan-3-on-Verbindung oder in Form eines Oxims einer im Ring A ungesättigten und in C₂₂-Stellung eine freie, veretherte oder veresterte Hydroxy- oder eine freie bzw. veresterte Carboxygruppe-tragende Bisnorcholan-3-on-Verbindung bzw. in Form eines Oxims des Progesterons entsprechend der allgemeinen Formel I zugesetzt wird. Nach Beendigung der Fermentation wird entweder aus der alkalisch eingestellten Kulturflüssigkeit das jeweilige ungesättigte 11 β ,17,21-Trihydroxy-pregnan-3,20-dion direkt isoliert oder bei der Gewinnung aus der sauren Kulturflüssigkeit der Induktor durch eine alkalische Behandlung entfernt.

Im weiteren Ausbau des Verfahrens wird zur 11 β -Hydroxylierung der im Zusammenhang mit früheren Anmeldungen des Zentralinstituts bereits hinterlegte Stamm *Cochliobolus lunatus* m 118, der in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR, ZIMET der AdW, Beutenbergstr. 11, Jena, DDR - 6900, unter der Hinterlegungsnummer ZIMET 43797 deponiert ist, eingesetzt. Als Induktor wird entweder eine in C₂₂-Stellung mit einer Dicarbonsäure veresterte und im Ring A ungesättigte 22-Hydroxy-bisnorcholan-3-on-Verbindung oder ein 3-Carboxymethoxim einer im Ring A ungesättigten und in C₂₂-Stellung eine freie, veretherte oder veresterte Hydroxy- oder eine freie bzw. veresterte Carboxygruppe-tragende Bisnorcholan-3-on-Verbindung zugesetzt.

Besonders vorteilhaft wird als Induktor das Hemisuccinat des 22-Hydroxy-bisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Hydroxy-bisnorchol-1-4-dien-3-ons oder ein 3-Carboxymethoxim des 22-Hydroxybisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Hydroxybisnorchol-1,4-dien-3-ons bzw. des 22-Carboxybisnorchol-4-en-3-ons oder des 22-Carboxybisnorchol-1,4-dien-3-ons zugesetzt.

Bei verfahrensgemäßem Vorgehen wird eine hohe Glukokortikoid-Ausbeute (vgl. Ausführungsbeispiele) durch den Einsatz der gewählten Induktorderivate erreicht, wobei die Induktoren sowie deren mikrobielle Abbauprodukte aus dem Produktgemisch wieder vollständig entfernt werden können.

Ausführungsbeispiele

Die nachfolgenden Beispiele sollen das erfindungsgemäße Verfahren erläutern, ohne es in irgendeiner Weise einzuschränken.

Beispiel 1

Herstellung von Prednisolon aus 17 α -Acetoxy-21-hydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion in Schüttelkulturen

Mit einer Lyophilkonserve des Stammes *Cochliobolus lunatus* m 118, gelöst in 1,5 ml Aqua dest., werden Hafermehl-Agar-Eprouvetten beimpft (Hafermehl 2,0%, Agar 2,0%, pH natursauer) und 11 Tage bis 14 Tage bei 29°C inkubiert. Mit 5 ml Aqua dest. wird das versportete Mycel einer Eprouvette abgeschwemmt und zur Beimpfung von 500-ml-Rundkolben a 50 ml Vorkulturmedium I: 30 g Glucose, 5 g Malsquellwasser lyophilisiert, 2 g NaNO₃, 1 g KH₂PO₄, 2 g K₂HPO₄, 0,5 g MgSO₄ × 7 H₂O, 0,02 g FeSO₄ × 7 H₂O und 0,5 g ZnCl₂ je 1000 ml Aqua dest. (pH 6,7). Nach einer Inkubation von 70 Stunden bei 28°C auf einer Rotationsschüttelmaschine (180 U/min) werden mit dieser Submerskultur im Verhältnis 1:10 500-ml-Rundkolben a 50 ml bzw. 2-l-Steilbrustflaschen mit Impfstutzen a 200 ml Vorkulturmedium II (VK II: Glucose 2%, Malsquellwasser lyophilisiert 2%, FeSO₄ × 7 H₂O 0,002%, pH 6,0) mit dieser zweiten submersen Vorzuchtstufe im Verhältnis 1:10. Mit je 5 ml der zweiten submersen Vorzuchtstufe werden 40 500-ml-Rundkolben beimpft. Sofort danach werden 50 mg 20S-Hydroxy-bisnorchol-1,4-dien-3-carboxymethoxim, gelöst in 0,2 ml Methanol, je Rundkolben zugegeben. Nach 6 Stunden Schütteln auf einer Rotationsschüttelmaschine (240 U/min) bei 28°C erfolgt je Rundkolben die Zugabe von 100 mg 17 α -Acetoxy-21-hydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion, gelöst in 0,75 ml Methanol/Aceton im Volumenverhältnis 1:1 (v:v). Nach 48stündiger Fermentation wird der pH-Wert der Kulturlösung mit in-Natronlauge auf pH 8,5 eingestellt, 3mal mit Chloroform extrahiert, die Extrakte mit Wasser neutral gewaschen und bis zur Kristallisation eingeeengt, wobei 3,28 g Prednisolon erhalten werden (88% d. Th.).

Beispiel 2

Herstellung von Prednisolon-17-Acetat aus 17 α -Acetoxy-21-hydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion im Laborfermentor

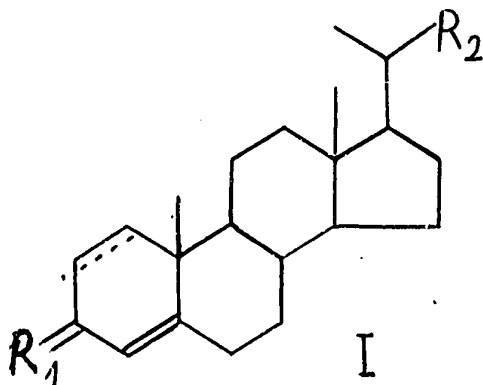
Eine Vorkultur von dem Mikroorganismus *C. lunatus* m 118 wird unter den Bedingungen des Beispiels 1 angezüchtet. Zur Fermentation wird ein Laborfermentor mit einer Füllung von 2 l Fermentationsmedium gemäß Beispiel 1 benutzt. Die Beimpfung geschieht mit 200 ml VK II aus einer 2-l-Steilbrustflasche, die Induktion mit 0,25 g 20S-Hydroxy-bisnorchol-1,4-dien-3-carboxymethoxim gelöst in 5 ml Methanol. Die Substratzugabe erfolgt gestaffelt:

2,5 g 17 α -Acetoxy-21-hydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion werden unmittelbar nach der Beimpfung und die gleiche Menge noch einmal nach 12 Stunden, gelöst in 12 ml Aceton, zu der Kulturlösung hinzugegeben. Der Fermentation wird bei 28°C, 620 U/min und einer Belüftung von 1 l Luft/l Kulturlösung insgesamt 30 Stunden bei pH 4,5 durchgeführt. Die Kulturlösung wird anschließend dreimal mit Chloroform extrahiert, die Extrakte eingeeengt und aus Ethylacetat kristallisiert. Man erhält 3,9 g Prednisolon-17-Acetat (75% d. Th.).

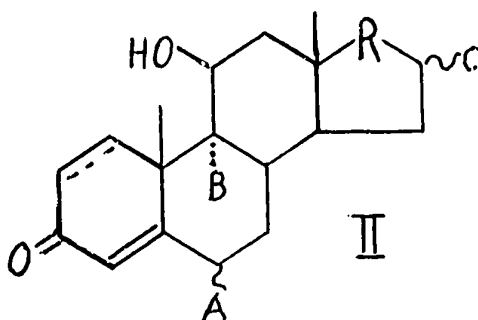
Beispiel 3

Herstellung von Prednisolon aus 17 -Acetoxy-21-hydroxy-pregna-1,4-dien-3,20-dion unter Verwendung eines C₂₂-Alkohol-Hemisuccinates als Induktor

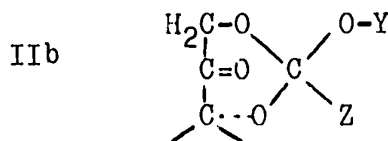
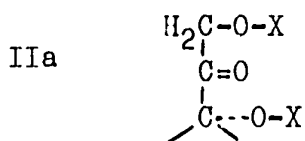
Unter den Bedingungen des Beispiels 1 wird die Hauptkultur 6 Stunden mit 0,1 g/l des 22-Hemisuccinats des 22-Hydroxy-bisnorchola-1,4-dien-3-ons induziert, in oben beschriebener Weise fermentiert, bei pH 10,5 extrahiert und das gebildete Prednisolon aufgearbeitet. Es werden 83,9% reines Prednisolon gewonnen.



- $R_1 = O; N-O-R_3$
 $R_2 = O; CH_2OR_4; COOR_5$
 $R_3 = H; C_nH_{2n}COOH, n = 1-8$
 $R_4 = H; CO(CH_2)_nCOOH, n = 0, 1, 2; \text{Alkyl oder eine andere Äthergruppierung}$
 $R_5 = H; \text{Alkyl}$
 $C \cdots C$ Einfach- oder Doppelbindung



- $C \cdots C$ Einfach- oder Doppelbindung
 $A, B \text{ und } C = H; OH; Cl; F; CH_3$
 $R = \text{Struktur IIa oder IIb}$



- $X = H; \text{Acyl}$
 $Y = \text{Alkyl}$
 $Z = H; \text{Alkyl}$