



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 277 697 A1

4(51) C 12 P 33/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 322 581 2

(22) 05.12.88

(44) 11.04.90

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, Patentabteilung, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
 (72) Böhme, Karl-Heinz, Dipl.-Chem.; Vorbrodt, Hans-Matthias, Dr. rer. nat.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. nat.;
 Adam, Günter, Prof. Dr. rer. nat. habil.; Dänhardt, Sabine; Porzel, Andrea, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on

(55) 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on, 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on, Steroide, mikrobieller
 Seitenkettenabbau, Fermentation, Steroidpharmaka, Steroidzwischenprodukte, Mikroorganismen, *Mycobacterium*
vaccae, *Mycobacterium fortuitum*

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on durch mikrobiellen Abbau von
 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on. Erfindungsgemäß wird das Substrat in feinverteilter Form einer Kultur eines zum
 Sterol-Seitenkettenabbau befähigten bakteriellen Mikroorganismus, vorzugsweise der Gattung *Mycobacterium*,
 zugesetzt und zu 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on fermentiert. Wie gefunden wurde, läuft das Verfahren bei
 Einsatz ausgewählter Stämme aus den Arten *Mycobacterium vaccae* sowie *Mycobacterium fortuitum* besonders
 effektiv ab. Die erfindungsgemäß hergestellte Verbindung dient als Zwischenprodukt für die Herstellung von
 Steroidpharmaka.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on, **gekennzeichnet dadurch**, daß
 - 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on in feinverteilter Form in Konzentrationen bis zu 10g/l einem mit einem zum Steroi-Seitenkettenabbau befähigten bakteriellen Mikroorganismus beimpften Fermentationsmedium, welches Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthält, zugesetzt,
 - dieser Ansatz bei Temperaturen von 20°C bis 37°C für die Dauer von 24 Stunden bis 72 Stunden bei pH6 bis pH8 unter aeroben Bedingungen fermentiert sowie
 - aus der Kulturbrühe die Titelverbindung auf extraktivem Wege gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Fermentation ein Mikroorganismus der Gattung **Mycobacterium** eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Fermentation ein Mikroorganismus der Art **Mycobacterium vaccae** eingesetzt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Fermentation ein Mikroorganismus der Art **Mycobacterium fortuitum** eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Fermentation der Stamm **Mycobacterium vaccae** L 12 eingesetzt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Fermentation der Stamm **Mycobacterium fortuitum** N3/138 eingesetzt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on
 - als Lösung in einem organischen Lösungsmittel,
 - als Ultraschallsuspension,
 - als mittels Naßvermahlung hergestellte Präparation,
 - als mittels Mikronisation hergestellte Präparation oder
 - als mittels Sprühtrocknung hergestellte Präparation zugesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on. 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on ist ein bisher nicht beschriebenes Steroid, welches auf Grund verschiedener reaktiver Zentren im Molekül als Zwischenprodukt zur Herstellung von Steroidpharmaka einsetzbar ist.
Das Anwendungsgebiet der Erfindung liegt in der pharmazeutisch-chemischen Forschung und Industrie.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Sterole, wie z. B. Cholesterol, Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Ergosterol, durch Mikroorganismen aus zahlreichen Gattungen, insbesondere mit Enzymdefektmutanten von Mykobakterien, zu C₁₉-Steroiden, wie z. B. 4-Androsten-3,17-dion und 1,4-Androstadien-3,17-dion, abgebaut werden können (siehe z. B. die Patentschrift JP 7973191 oder JP 80148083). Durch die mikrobielle Hydroxylierung von 4-Androsten-3,17-dion mit Penicillin sp. ATCC 12556 erhielt man in geringen Ausbeuten als Nebenprodukt die 2 β -Hydroxy-Verbindung von 4-Androsten-3,17-dion (siehe Patentschrift US 2805231).
Verfahren zur Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on sind bisher nicht bekannt.

Ziel der Erfindung

Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Herstellung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androstan-17-on aus 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on zu beschreiben.
Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß man 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on mit bakteriellen Mikroorganismen, die zum Seitenkettenabbau von Sterolen befähigt sind, beispielsweise aus der Gattung **Mycobacterium**, fermentiert. Es wird fermentiert in Medien, die Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Glukose, Saccharose, Glycerol, und Stickstoffquellen, wie beispielsweise Hefeextrakt, Harnstoff, Ammoniumsalze sowie Mineralsalze verschiedener Zusammensetzung enthalten. Die Fermentation erstreckt sich über 24 Stunden bis 72 Stunden und wird bei 20°C bis 37°C,

vorzugsweise bei 28°C bei pH-Werten im Bereich von pH 6 bis pH 8 unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Das Fermentationsmedium wird nach beendeter Fermentation mit einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Chloroform, extrahiert und der Rohextrakt durch Destillation zur Trockne gebracht. Anschließend wird das gewünschte 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androst-17-on aus dem Produktgemisch durch an sich bekannte Trennmethoden wie Säulenchromatographie und/oder präparative Dünnschichtchromatographie isoliert und weiter durch an sich bekannte Verfahrensschritte, beispielsweise Umkristallisation, gereinigt.

Im weiteren Ausbau des Verfahrens werden Mikroorganismen der Art *Mycobacterium vaccae* oder *Mycobacterium fortuitum* zur Fermentation eingesetzt.

Das Verfahren wird vorteilhaft wie folgt ausgeführt:

Die für das Verfahren dienende Ausgangssubstanz kann nach M. Kondo und K. Mori (siehe Agric. Biol. Chem. 47, 97 [1983]) hergestellt werden. Ein Bakterienstamm der Gattung *Mycobacterium*, vorzugsweise *Mycobacterium vaccae* LA 12 oder *Mycobacterium fortuitum* N3/138 wird auf Schrägagar (20 g Glycerol, 5 g Bacto-Pepton, 3 g Fleischextrakt, 15 g Agar-Agar ad 1000 ml Aqua dest.; pH 7) in Kulturröhrchen bei 28°C 48 Stunden bis 96 Stunden kultiviert.

Ein Röhrchen dieser Vorkultur wird als Impfmateriel für je einen Standkolben mit 50 ml einer Nährlösung folgender Zusammensetzung verwendet: 10 g Glucose, 10 g Hefeextrakt, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 1,5 g (NH₄)₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,01 g FeSO₄ · 7 H₂O, 0,002 g ZnSO₄ · 7 H₂O, Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7. Nach Schütteln bei 28°C $\pm$ 3°C werden nach 24 Stunden bis 36 Stunden mit 5% bis 10% der so erhaltenen Submerskultur weitere Standkolben, die das gleiche Nährmedium erhalten, beimpft. Zu diesen Standkolben wird nach 24stündigem Schütteln bei 28°C $\pm$ 3°C das Substrat (2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on) in einer Konzentration von 0,05 g/l bis 1 g/l, gelöst in wenig Methanol, Äthanol, Dimethylformamid u. a. zugesetzt und weiter fermentiert, bis eine maximale Substratumwandlung erreichbar ist. Nach Beendigung der Fermentation wird das Kulturmedium mit einem organischen Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform, Methylenchlorid, Äther, Äthylacetat, Butylacetat u. a. extrahiert und der Rohextrakt durch Destillation zur Trockne eingedampft und an Kieselgel unter Verwendung von Chloroform/Methanol oder Essigsäureethylester/Benzin als Elutionsmittel chromatographiert.

Im Zusammenhang mit Herstellungsverfahren von Androst-4-en-3,17-dion und 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion wurden in früheren Anmeldungen des Zentralinstitutes in der Hinterlegungsstelle für Mikroorganismen der DDR – ZIMET, Beutenbergstr. 11, Jena, DDR-6900 unter den Registriernummern die Mikroorganismen-Stämme *Mycobacterium vaccae* LA 12 ZIMET 11094 und *Mycobacterium fortuitum* N3/138 ZIMET 10850 hinterlegt.

2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androst-17-on besitzt eine Aromatase-Hemmer-Wirkung der menschlichen Placenta. Weiterhin ist es ein günstiges Ausgangsprodukt für Brassinosteroide und deren Analoga, die gegenwärtig als Antistressfaktoren in der Landwirtschaft getestet werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Mycobacterium vaccae LA 12 wird 48 Stunden bis 96 Stunden bei 28°C auf Schrägagar folgender Zusammensetzung kultiviert: 20 g Glycerol, 5 g Bacto-Pepton, 3 g Fleischextrakt, 15 g Agar-Agar ad 1000 ml Aqua dest.; pH 7,0. Mit den abgeschwemmten Zellen je eines Röhrchens werden 5 Stück 500-ml-Standkolben mit je 50 ml Nährlösung folgender Zusammensetzung beimpft: 10 g Glukose, 10 g Hefeextrakt, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 1,5 g (NH₄)₂HPO₄, 0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O, 0,01 g FeSO₄ · 7 H₂O, 0,002 g ZnSO₄ · 7 H₂O, Aqua dest. ad 1000 ml; pH 7,0. Nach 36stündigem Schütteln bei 28°C wird diese Submerskultur bei einem Impfverhältnis von 1:10 zur Beimpfung von weiteren 20 Standkolben mit je 100 ml Nährlösung verwendet. Zu diesen 20 Standkolben werden nach 24stündigem Schütteln bei 28°C 200 mg 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on, gelöst in 20 ml Methanol, gleichmäßig verteilt zugegeben. Nach weiterem 72stündigem Schütteln wird die vereinigte Kulturlösung 3mal mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel abdestilliert und der eingedampfte Rohextrakt im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wird an 25 g Kieselgel G 60 unter Verwendung von CHCl₃/CH₃OH (9:1) chromatographiert.

Elution mit Chloroform/Methanol (9:1) liefert 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-androst-17-on.

Ausbeute: 50 mg (40%), $\alpha_D^{25} + 44,6^\circ$ (CHCl₃, c = 1,5)

IR γ_{max} CDCl₃ cm⁻¹: 3350 (OH); 1740 (Fünfringketon);

ORD: $[\alpha]_{275}^{25} - 5098^\circ$, $[\alpha]_{300}^{25} 0^\circ$, $[\alpha]_{320}^{25} + 6708^\circ$, a = +161; ¹H-NMR (200 MHz, Py-d₅-TMS): δ 0,778 (s, H₃-18); 0,919 (s, H₃-19); 2,982 (ddd, J = 13,9; 3,4 und 2,6 Hz (H₁-4)); 3,715 (ddd, J = 10,7, 10,7 und 4,5 Hz H₁-6 β); 4,125 (ddd, J = 11,4, 5,2 und 5,5 Hz H₁-2 β); 4,476 (dd, J = 5,5 und 2,6 Hz H₁-3 β);

MS m/z (%): 322 (M⁺, 61), 304 (72), 286 (80), 260 (100), 229 (20), 216 (48), 197 (18);

HA-MS: 322,2150 (C₁₉H₃₀O₄); 304,2032 (C₁₉H₂₈O₃); 286,1924 (C₁₉H₂₆O₂); 260,1768 (C₁₇H₂₄O₂); 216,1514 (C₁₅H₂₀O).

Beispiel 2

Bei Einsatz von 1 mg 2 α ,3 α -Dihydroxy-5 α -cholestan-6-on in 10 ml Nährlösung in einer 100-ml-Steilbrustflasche, jedoch mit dem Stamm *Mycobacterium fortuitum* N3/138 konnte unter Beispiel 1 beschriebenen Fermentations- und Extraktionsbedingungen dünn-schichtchromatographisch die Bildung von 2 α ,3 α ,6 α -Trihydroxy-5 α -androst-17-on nachgewiesen werden.