



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑪ **CH 656 390 A5**

⑤① Int. Cl.⁴: **C 07 J** 13/00
C 12 P 33/16

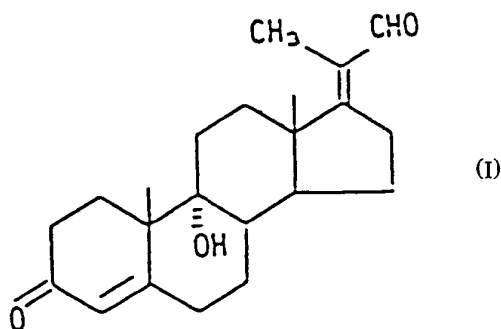
// (C 12 P 33/16, C 12 R 1:33)

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

②① Gesuchsnummer:	4241/82	⑦③ Inhaber:	The Upjohn Company, Kalamazoo/MI (US)
②② Anmeldungsdatum:	12.07.1982		
③③ Priorität(en):	24.07.1981 US 286308	⑦② Erfinder:	Knight, John Costain, Kalamazoo/MI (US) Wovcha, Merle Gene, Kalamazoo/MI (US)
②④ Patent erteilt:	30.06.1986		
④⑤ Patentschrift veröffentlicht:	30.06.1986	⑦④ Vertreter:	E. Blum & Co., Zürich

⑤④ **9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindung.**

⑤⑦ 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd der Formel



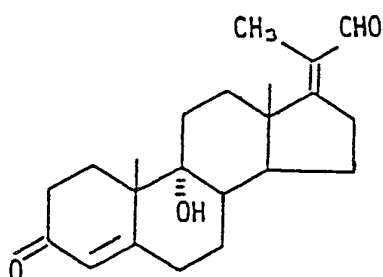
carboxaldehyd als Hauptprodukt in der Fermentationsbrühe auszeichnet, züchtet. Man arbeitet unter aeroben Bedingungen in Gegenwart eines Steroids mit einer C-17-Seitenkette in einem wässrigen Nährmedium. Bevorzugt setzt man Mycobacterium fortuitum NRRL B-12433 ein.

Die Verbindung der Formel I kann zur Herstellung wertvoller Corticoide verwendet werden.

Diese Verbindung wird erhalten, indem man eine Mutante der Mikroorganismen Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Nocardia, Protaminobacter, Serratia, Mycobacterium und/oder Streptomyces die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit einer C-17-Seitenkette und zur Anhäufung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-

PATENTANSPRÜCHE

1. Verbindung der Formel



2. Fermentationsverfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mutante der Mikroorganismen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia*, *Mycobacterium* und/oder *Streptomyces*, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit einer C-17-Seitenkette und zur Anhäufung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd als Hauptprodukt in der Fermentationsbrühe auszeichnet, unter aeroben Bedingungen in Gegenwart eines Steroids mit einer C-17-Seitenkette in einem wässrigen Nährmedium züchtet und das gewünschte Produkt gewinnt.

3. Fermentationsverfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine *Mycobacterium*-Mutante, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit einer C-17-Seitenkette und zur Anhäufung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd als Hauptprodukt in der Fermentationsbrühe auszeichnet, unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit eines Steroids mit einer C-17-Seitenkette verwendet.

4. Fermentationsverfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass man *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-12433 unter aeroben Bedingungen in einem wässrigen Nährmedium in Gegenwart eines Steroids mit C-17-Seitenkette verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, dass man als Steroid Sitosterin, Cholesterin, Stigmasterin und/oder Campesterin verwendet.

Die Erfindung b trifft 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd sowie ein Fermentationsverfahren zur Herstellung dieser Verbindung.

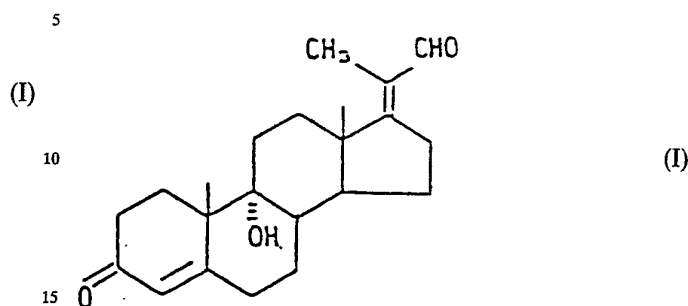
Aus der US-PS 4 029 549 ist die Verwendung von *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119 zur Herstellung von 9-Hydroxy-3-oxo-4-pregnen-20-carbonsäure [9-Hydroxybisonoracid] bekannt. Dieselbe Mutante dient gemäß der US-PS 4 035 236 zur Herstellung von 9-Hydroxy-4-androsten-3,17-dion [9-Hydroxyandrostendion] bzw. gemäß der US-PS 4 214 051 zur Herstellung von 9-Hydroxy-3-oxo-4-pregnen-20-carbonsäuremethylester [9-Hydroxybisonoracidmethylester].

Aus der EP-Patentanmeldung 79104372.2 ist ein zweistufiges Fermentationsverfahren zur Herstellung der als Zwischenprodukt bei der Synthese wertvoller Corticoide brauchbaren 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carbonsäure bekannt. Bei dem bekannten Verfahren erfolgt zunächst eine Umwandlung von Sterinen in 3-Oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carbonsäure durch Fermentation mit dem *Mycobacterium* Stamm NRRL B-8054. Danach wird diese Verbindung durch Inkubation in irgendeinem zur Einführung einer Hydroxylgruppe in 9 α -Stellung befähigten Mikroorganismus

2

in 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carbonsäure überführt.

Die erfindungsgemäße Verbindung weist die folgende Formel auf



Das Fermentationsverfahren zur Herstellung dieser Verbindung der Formel I ist dadurch gekennzeichnet, dass man eine Mutante der Mikroorganismen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia*, *Mycobacterium* und/oder *Streptomyces*, die sich durch die Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit einer C-17-Seitenkette und zur Anhäufung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd als Hauptprodukt in der Fermentationsbrühe auszeichnet, unter aeroben Bedingungen in Gegenwart eines Steroids mit einer C-17-Seitenkette in einem wässrigen Nährmedium züchtet und das gewünschte Produkt gewinnt.

Im erfindungsgemässen Verfahren wird bevorzugt eine Mutante von *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119 eingesetzt.

Andererseits lässt sich das erfindungsgemäße Verfahren auch mit Hilfe neuer Doppelmutanten der in der US-PS 4 029 549 genannten Mikroorganismen-Gattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* und *Streptomyces* durchführen. Von den Mikroorganismen dieser Gattungen ist bekannt, dass sie Sterine abbauen. Die wilden Stämme dieser Arten bauen Sterine nicht selektiv zu ein geringes Molekulargewicht aufweisenden Verbindungen, beispielsweise $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ ab. Diese wilden Stämme lassen sich gemäß Beispiel 1 der US-PS 4 029 549 in Mutanten, z.B. *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119, überführen.

Die gemäß Beispiel 1 der US-PS 4 029 549 hergestellten Mutanten der genannten Arten lassen sich dann in der im folgenden geschilderten Weise zu Doppelmutanten mutieren. Letztere Mutanten, beispielsweise *M. fortuitum* NRRL B-12433, eignen sich dann bevorzugt zur Durchführung des erfindungsgemässen Fermentationsverfahrens zur Herstellung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd der Formel I.

Mutanten, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit 17-Alkylseitenketten und zur Ansammlung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd der Formel I als Hauptprodukt in der Fermentationsbrühe auszeichnen, kann man durch Mutation von Mikroorganismen der Gattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* und *Streptomyces* erhalten.

Im folgenden wird anhand eines Beispiels die Herstellung einer im Rahmen des erfindungsgemässen Fermentationsverfahrens einsetzbaren neuen Mutante näher erläutert. Bei dieser Mutante handelt es sich um *M. fortuitum* NRRL B-12433. Ähnliche Mutanten von anderen *Mycobacterium*-Arten und anderen Mikroorganismen-Gattungen (vgl. oben) kann man in analoger Weise erhalten.

Herstellung einer Mutante, die als Hauptprodukt eines

Sterinabbau 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carboxaldehyd bildet:

Mycobacterium fortuitum NRRL B-8119 wird in einem Medium aus (pro Liter) 8 g Nährbrühe, 1 g Hefeextrakt, 5 g Glycerin, 0,1% (w/v) Tween 80 und destilliertem Wasser bei einer Temperatur von 31 °C wachsen gelassen. Das Medium wird durch 20-minütiges Erhitzen in einem Autoklaven unter einem Druck von 103 kPa sterilisiert. Die Zellen werden bis zu einer Dichte von etwa 5×10^8 /ml wachsen gelassen und dann auf einem sterilen 0,2 µm-Filter gesammelt. Nachdem die Zellen mit einem gleichen Volumen eines sterilen 0,1 M Natriumcitrat-Puffers eines pH-Werts von 5,6 mit 0,1% Tween 80 gewaschen und dann in dem halben Volumen desselben Puffers resuspendiert wurden, wird N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt, worauf die Zellsuspension 1 h bei 31 °C inkubiert wird. Nun werden die Zellen mit 2 Volumina eines sterilen 0,1 M Kaliumphosphat-Puffers eines pH-Werts von 7 mit 0,1% Tween 80 gewaschen und dann in 1 Volumen desselben Puffers resuspendiert.

Ferner wird ein Medium aus (pro Liter) 8 g Nährbrühe, 5 g NaCl und 5 g Glycerin und destilliertem Wasser zubereitet. Nach Zugabe von Agar in einer Menge von 15 g/l wird das Medium 20 min lang unter einem Druck von 103 kPa einer Autoklavenbehandlung unterworfen und dann in sterile Petrischalen gegossen. Danach werden die mutierten Zellen auf dem geschilderten Medium gezüchtet. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien werden danach im Rahmen von Versuchsfermentationen auf ihre Fähigkeit zur Umwandlung von Sterinen in 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carboxaldehyd getestet. Der Nachweis der gewünschten Verbindung erfolgt durch Dünnschichtchromatographie von Methylenchloridextrakten der Versuchsfermentationen unter Verwendung von Silikagel und Methylenchlorid/Aceton/Essigsäure (212/38/1) als Lösungsmittelsystem. Auf diese Weise lässt sich die 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carboxaldehyd als Hauptprodukt der biologischen Umwandlung von Sterinen anhäufende Mutante NRRL B-12433 isolieren.

Der Schlüssel für die Isolierung einer Mutante entsprechend der beschriebenen Mutante ist, dass man mit einer Mutante, z.B. NRRL B-8119, die hinsichtlich des Steroidringabbaus bereits derart blockiert ist, dass sie 9α-Hydroxyandrostendion liefert, beginnt und diesen Mikroorganismus einer zweiten Mutation, die dann einen Einfluss auf den Sterinseitenkettenabbau besitzt, unterwirft.

Die die geschilderte biologische Umwandlung herbeiführende Mutante unterscheidet sich von ihrer Mutterkultur, beispielsweise *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119, lediglich in ihrer Wirkung auf Steroidmoleküle. In sämtlichen sonstigen Eigenschaften, z.B. der Morphologie und der Chemikalienempfindlichkeit, entspricht sie der Mutterkultur, wenn sie mit dieser nicht sogar identisch ist. Beide *M. fortuitum*-Kulturen sind säurefeste, nicht-bewegliche, nicht-sporenbildende Bazillen, die zur Familie *Mycobacteriaceae* der Ordnung *Actinomycetales* gehören. Nach der Klassifizierung von Runyon (vgl. R.H. Runyon in «Med. Clin. North America», Band 43, Seite 273 (1959)) handelt es sich um ein nicht-chromogenes *Mycobacterium* der Gruppe IV, d.h. um ein bei niedriger Temperatur unter Bildung nicht-pigmentierter Kolonien auf relativ einfachem Medium wachsendes *Mycobacterium*.

M. fortuitum NRRL B-8119 und NRRL B-12433 sind in der Dauersammlung von Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois,

USA, hinterlegt und auf Anfrage von dieser Hinterlegungsstelle erhältlich. Die Adresse dieser Hinterlegungsstelle ist wie folgt:

5 Northern Regional Research Laboratory
Northern Regional Research Center
1815 North University Street
Peoria, Illinois 61604 / USA

10 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carboxaldehyd der Formel I eignet sich als Zwischenprodukt bei der Herstellung wertvoller Corticoide. So kann er beispielsweise zu der entsprechenden Säure 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carbonsäure oxidiert und diese dann gemäss den Lehren der EP-Patentanmeldung 79104372.2 in Hydrocortisonacetat überführt werden.

Die folgenden Beispiele sollen das Fermentationsverfahren gemäss der Erfindung näher erläutern. Sofern nicht anders angegeben, bedeuten sämtliche Angaben «%» – 20 «Gew.-%». Sämtliche Verhältnisse bei Lösungsmittelgemischen stellen, soweit nicht anders angegeben, «Volumenverhältnisse» dar.

Beispiel 1

25 Fermentation von rohem Sitosterin.

Das biologische Umwandlungsmedium bzw. Biotransformationsmedium enthält (pro Liter) 8,0 g Ucon, 5,0 g Cere-lose, 3,0 g NH₄Cl, 3,0 g CaCO₃, 3,0 g Na₃(Citrat)·2H₂O, 2,0 g Tween 80, 1,0 g Sojamehl, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g Harnstoff und 30,0 g rohes Sitosterin in Leitungswasser. Der pH-Wert des Mediums ist auf 7,0 eingestellt. Mit jeweils 100 ml dieses Mediums gefüllte Kolben werden mit 10 ml Saatkulturen von bei 28 °C in einem Medium aus (pro Liter) 8,0 g Nährbrühe, 5,0 g Glycerin, 1,0 g Hefeextrakt und 1,0 g Tween 80 in destilliertem Wasser (pH-Wert: 7,0) gezüchtetem *M. fortuitum* NRRL B-12433 beimpft. Danach werden die Kulturen 336 h lang bei einer Temperatur von 28 °C auf einem Drehrüttler inkubiert. Nach der Inkubation wird entsprechend Beispiel 3 das Gemisch extrahiert und das Produkt 40 isoliert.

Beispiel 2

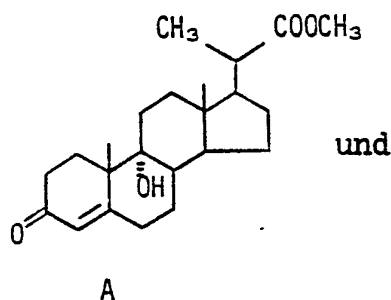
Entsprechend Beispiel 1 werden anstelle von Sitosterin andere Sterinsubstrate in roher oder reiner Form, z.B. Sitosterin und/oder Cholesterin und/oder Stigmasterin und/oder Campesterin verwendet.

Beispiel 3

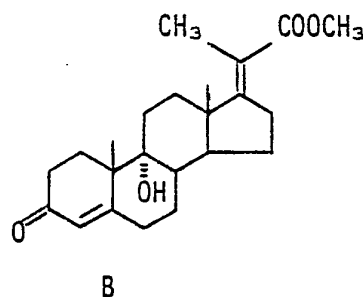
Isolierung von 9-Hydroxy-3-oxo -4,17(20)- pregnadien -20-carboxaldehyd aus der *M. fortuitum* NRRL B-12433-Fermentation.

1200 ml Fermentationsbrühe aus der mit Hilfe von *M. fortuitum* NRRL B-12433 durchgeführten biologischen Sitosterinumwandlung werden angesäuert und zweimal mit gleichen Volumina Methylenchlorid extrahiert, wobei 29,2 g bzw. 8,9 g Rohextrakt erhalten werden.

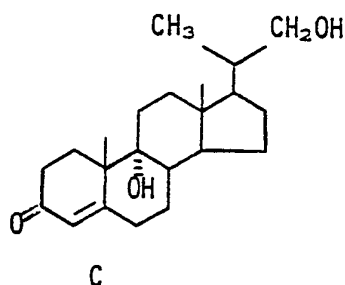
Der erste Extrakt wird erneut in Methylenchlorid gelöst, worauf die Lösung zur Entfernung saurer Bestandteile mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung gewaschen wird. Bei Entfernung des Lösungsmittels fallen die restlichen neutralen Komponenten in Form eines braunen Öls (18,6 g) an. Bei dünnschichtchromatographischen und flüssigkeitschromatographischen Untersuchungen erscheinen drei Haupt-UV-Absorptionszonen. Die am wenigsten polare Zone enthält ein Gemisch aus den Methylestern der Formeln



und



wobei der Ester der Formel B überwiegt. Die am stärksten polare Zone entspricht der 9,22-Dihydroxyverbindung der Formel



Die Verbindung mittlerer Polarität wird gemäss folgendem Verfahren als 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd der Formel I identifiziert: Aus einem Vorchromatogramm auf einer kurzen Silikasäule erhält man bei Verwendung von 30% Ethylacetat enthaltendem Methylenchlorid (als Eluiermittel) eine Fraktion, in der der Aldehyd der Formel I angereichert ist. 3,3 g dieser Fraktion werden sorgfältig auf drei in Reihe angeordneten, vorgepackten Lobar-Silikagelsäulen (Grösse B, E. Merck & Co.) rechromatographiert, wobei als Eluiermittel Methylenchlorid mit 20% Ethylacetat verwendet wird. Aus Ethylacetat/Methylenchlorid erhält man schliesslich 1,05 g Aldehyd der Formel I in Form eines farblosen und nadelförmig kristallisierenden Feststoffs eines Fp von 194–212 °C und einer optischen Drehung $[\alpha]_D$ von +96° [c, 1,024; CHCl₃].

Eine Elementaranalyse der Verbindung C₂₂H₃₀O₃ ergibt folgende Werte:

	C	H
Berechnet:	77,16%	8,83%
15 Gefunden:	77,53%	8,71%

Das Massenspektrum zeigt ein Molekülion bei m/e 342 (Grundpeak) und Hauptfragmentationen bei 324, 309, 295, 191, 136 und 124.

H-Kernresonanz-	1,02 (18-CH ₃); 1,36 (19-CH ₃);
20 Spektrum:	1,82 (21-CH ₃); 5,88 (4-H);
	10,04 (CHO) ppm.

IR-Spektrum: 3497, 3440 cm⁻¹ (–OH);
1663 cm⁻¹ (α,β-ungesättigter Carbonylrest);
25 1622, 1617 cm⁻¹ (C = C).
UV-Spektrum: λ_{max}: 250 nm; (ε = 27 900 in Methanol).

Beispiel 4

30 Beim Ersatz von *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119 im Rahmen des beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von *M. fortuitum* NRRL B-12433 durch einen sterinabbauenden Mikroorganismus der Gattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* oder *Streptomyces* erhält man Mikroorganismus-Mutanten, die sich durch ihre Fähigkeit zum selektiven Abbau von Steroiden mit C-17-Seitenkette und zur Ansammlung von 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd als Hauptprodukt (der Fermentation) aus-
40 zeichnen.

Beispiel 5

Ersetzt man in Beispiel 1 *M. fortuitum* NRRL B-12433 durch gemäss Beispiel 4 hergestellte Mutanten, erhält man ebenfalls den 9-Hydroxy-3-oxo-4,17(20)-pregnadien-20-carboxaldehyd der Formel I.
45