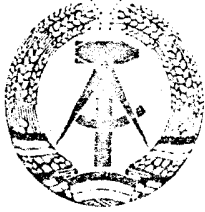


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

0152 580

Int.Cl.³

3(51) C 12 P 33/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P/ 210 886

(22) 08.02.79

(44) 02.12.81

- (71) AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN DER DDR, 1199 BERLIN; DD;
(72) ATRAT, PETER, DR. RER. NAT. DIPL.-CHEM.; DD; HOERHOLD, CLAERE, DR. RER. NAT. DIPL.-BIOL.; DD;
BUCHAR, MICHAEL, DR.; SU; KOSCHTSCHENKO, KIRA A., DR., SU
(73) siehe (72)
(74) ERICH HULTSCH, ADW DER DDR, INSTITUTE U. EINRICHTUNGEN IN JENA, PATENTBUERO, 6900
JENA, BEUTENBERGSTR. 11

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON ANDROST-4-EN-3, 17-DION AUS STERINEN.

(57) Das mikrobiologische Verfahren zur Herstellung von Androstendion dient dem Ziel, diese Verbindung in oekonomisch einfacher Weise herzustellen unter Beachtung der Forderung nach kontinuierlicher Betriebsweise, Wiederverwendbarkeit der Biomasse unter Vereinfachung der Sterilitätsbedingungen. Durch Abbau der C₁₇-Seitenkette von Sterinen und deren Derivaten mit immobilisierten Mikroorganismen wird Androst-4-en-3,17-dion als alleiniges Endprodukt erhalten. Derivate von Cholesterin, Ergosterin oder Sitosterin werden beispielsweise mit Kulturen von Mycobacterium spec., die durch Adsorption an feste Träger, durch Einpolymerisation in Polymergele und durch Vernetzung von Polyelektrolyten durch mehrwertige Kationen immobilisiert werden, nach einem kontinuierlichen bzw. diskontinuierlichen Batch-Verfahren fermentiert. Das Endprodukt kann sowohl in pharmazeutisch wertvolle Derivate der Androstanreihe als auch der Pregnanreihe mit einem grossen Anwendungsbereich überführt werden.

Dr. Peter Atrat
Dr. Cläre Hörhold
Dr. Michael Buchar
Dr. Kira A. Koschtschejenko

- 1 -

Titel der Erfindung

Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus Sterinen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus Sterinen durch mikrobiologische Umwandlung. Androst-4-en-3,17-dion ist ein Schlüsselprodukt für die Herstellung von Steroidwirkstoffen. Durch bekannte Synthesen kann das Produkt sowohl in die pharmazeutisch wertvollen Derivate der Androstanreihe als auch der Pregnanreihe mit einem großen Anwendungsbereich überführt werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösung

Es sind Verfahren bekannt zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus Sterinen wie z. B. Cholesterin, Sitosterin, Stigmasterin, Campesterin und Ergosterin durch Fermentation mit Mikroorganismen der Gattungen Arthrobacter, Brevibacterium, Nocardia, Microbacterium, Protaminobacter, Bacillus, Streptomyces, Corynebacterium, Mycobacterium u. a..

Hierbei besteht das Problem darin, die Verfahrensbedingungen so zu wählen, daß lediglich die Seitenkette der Sterine durch die Mikroorganismen abgebaut wird, der weiterführende Ringskelettabbau aber verhindert wird. Bei den bekannten Verfahren wird dieses Problem im wesentlichen durch drei Prinzipien gelöst. Erstens durch die Anwendung von Mutanten, die zum Ringskelettabbau nicht befähigt sind, zweitens durch Zusatz von geeigneten Enzymhemmern, wie z. B. Schwermetallverbindungen und Chelatbildnern, und drittens dadurch, daß entsprechend substituierte Sterine verwendet werden, die keine Substrate der Enzyme sind, die den Ringskelettabbau einleiten.

Allen Verfahren gemeinsam ist, daß die als Ausgangsmaterial dienenden Sterine einer wachsenden oder ruhenden diskontinuierlichen Kultur eines Mikroorganismus zugesetzt werden, dessen Zellen in nichtstabilisierter Form im Fermentationsmedium vorliegen.

Die Fermentationsführung unter diesen Bedingungen ist mit folgenden Nachteilen behaftet: Gefahr der Unsterilität im nährstoffreichen Fermentationsmedium, Schwankungen im Gehalt und in der Aktivität der induzierten Enzymsysteme in Abhängigkeit von Veränderungen im Fermentationsmedium, z. B. durch Abnahme der Konzentration des Induktors, durch Nährstoffverbrauch, Erhöhung der Ionenkonzentration bei der erforderlichen pH-Regulation, u. a. sowie durch altersbedingte Veränderungen im Zellstoffwechsel. Durch die angegebenen Mängel sind die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nach den bekannten Verfahren stark beeinträchtigt. Außerdem erschöpft sich in der Regel die Fähigkeit der Mikroorganismen, die Seitenkette von Sterinen abzubauen während der ersten Fermentation, so daß die angezüchtete Biomasse nur für eine oder höchstens für eine zweite Fermentation zu verwenden ist.

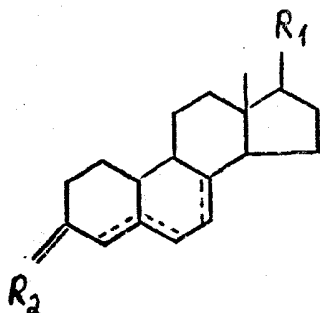
Ziel der Erfindung

Das Ziel der vorliegenden Erfindung ist die verbesserte Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus Sterinen, nach einem ökonomisch günstigen Verfahren.

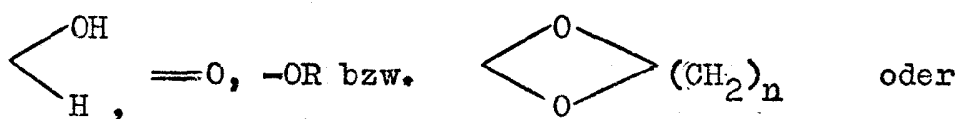
Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein technologisch einfaches mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus leicht zugänglichen Sterinen anzugeben, welches wesentliche Mängel der bekannten Verfahren, insbesondere die diskontinuierliche Betriebsweise, die stark eingeschränkte Wiederverwendbarkeit der Biomasse und Risikofaktoren wie Sterilitätsprobleme bei der Anzucht und Schwankungen in der Leistungsfähigkeit der zur Fermentation verwendeten Kultur einschränkt oder vermeidet.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß man zum Seitenkettenabbau befähigte Mikroorganismen, wie z. B. aus den Gattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* und vorzugsweise aus der Gattung *Mycobacterium* nach ansich bekannten Methoden immobilisiert, indem man die Zellen an feste Träger, wie z. B. Zellulose und Zellulosederivate adsorbiert, durch Polymerisation in vernetzte Gele, wie z. B. Polyacrylamid oder durch Vernetzung von Polyelektrolyten, wie z. B. Alginaten mit mehrwertigen Kationen, wie z. B. Al^{3+} , einschließt und damit kontinuierlich bzw. diskontinuierlich, bei mehrfach wiederholtem Einsatz der immobilisierten Biomasse, Sterine bzw. Derivate von Sterinen fermentiert, die die folgende allgemeine Formel besitzen::



worin R_1 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt und in 22-Stellung eine zusätzliche Doppelbindung besitzen kann, die Bindungen Einfach- oder Doppelbindungen sein können und R_2 Sauerstofffunktionen der allgemeinen Struktur



Stickstofffunktionen der allgemeinen Struktur = NX mit $X = -O-CH_2-COOH$, $-NH-CONH_2$ oder $-NHCOCH_2N(CH_3)_3$ darstellen kann.

Dieses Verfahren wird vorteilhaft wie folgt ausgeführt: Die für das Verfahren als Ausgangsstoffe dienenden Sterinderivate gehören zum Stand der Technik.

Die immobilisierten Zellen eines Bakterienstammes wie z. B. *Mycobacterium phlei*, der in der Hinterlegungsstelle im Zentralinstitut

für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Akademie der Wissenschaften der DDR, 69 Jena, Beutenbergstr. 11 unter der Nummer IMET SG 1026 deponiert ist, oder Mycobakterium smegmatis, der in der gleichen Hinterlegungsstelle unter der Nummer IMET H 124 deponiert ist, werden im 500 ml Schüttelkolben in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 aufgenommen (Biomasse 3,5 g Feuchtwicht) mit 25 mg des Sterinderivates, gelöst in Dimethylformamid, versetzt. Die Fermentation wird 24 h bei 37 °C nach dem Prinzip eines Batch-Verfahrens unter Schütteln durchgeführt.

Die Aufarbeitung des Fermentationsansatzes geschieht in einfacher Weise wie folgt:

Die immobilisierten Zellen werden durch Filtrieren oder Dekantieren vom Fermentationsmedium abgetrennt, welches zur Gewinnung des Androst-4-en-3,17-dions in bekannter Weise vor oder nach der Hydrolyse des entstandenen Derivates mit Chloroform extrahiert wird.

Die erzielten Ausbeuten liegen im Durchschnitt bei 70 % d. Th.. Die abgetrennten immobilisierten Zellen lassen sich ohne merklichen Aktivitätsverlust mehr als 15 mal im diskontinuierlichen Batch-Verfahren einsetzen.

Kontinuierliche Fermentation:

In einem thermostatierten 750 ml Batch-Gefäß werden 150 ml Polyacrylamidgel, welches 13 g feuchte Biomasse einpolymerisiert enthält, mit 150 ml Puffer, der in einer Konzentration von 0,5 mg/ml mit einem geeigneten Sterinderivat versetzt ist, an der Luft gerührt. Zur kontinuierlichen Fermentation werden mit konstanter Geschwindigkeit z. B. 10 bis 15 ml/Stunde der das Sterinderivat enthaltende Puffer zugepumpt und das Androstendionderivat enthaltende Reaktionsmedium abgezogen.

Die beim Start der kontinuierlichen Fermentation zu erzielende Umsatzrate von 60 bis 70 % d. Th., kann auch noch nach mehr als 14 Tagen Betriebszeit festgestellt werden. Das Androstendion wird in bekannter Weise durch Extraktion und Hydrolyse des Derivates gewonnen.

Für den Fachmann ist es überraschend, daß ein derart extrem sauerstoffbedürftiger komplexer enzymatischer Prozeß, wie es der Abbau der Seitenkette von Sterinen darstellt, mit Mikroorganismen, die sich im immobilisierten Zustand befinden, durchführbar ist, besonders deshalb, da auf dem Steroidgebiet nur einfache Transformationen wie Reduktion, Dehydrierung oder Hydroxylierung mit immobilisierten Mikroorganismen bekannt geworden sind.

Die Mikroorganismen können zum Zeitpunkt eines günstigen physiologischen Zustandes immobilisiert und damit stabilisiert werden. Ebenso wird die Stabilisierung eines bestimmten physikalisch-chemischen Zustandes begünstigt. Damit wird der mikrobielle Seitenkettenabbau in einem kontinuierlich arbeitenden Reaktor möglich, wodurch die Biomasse ökonomisch vorteilhafter genutzt wird, Sterilitätsprobleme während der Fermentation gegenstandslos sind und die Reproduzierbarkeit des Verfahrens hinsichtlich Ausbeuten an Androst-4-en-3,17-dion über einen langen Zeitraum gewährleistet ist.

Ausführungsbeispiele

1. 3,5 g *Mycobacterium smegmatis* IMET H 124 (feuchte Biomasse) werden in 150 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 mit 5 g DEAE-Zellulose 1 h verrührt. Nach dem Absaugen und Waschen wird der gesamte feuchte Träger in 50 ml Phosphatpuffer suspendiert und in einen 500 ml Schüttelkolben überführt. Nach der Zugabe von 25 mg 3,3-Äthylendioxycholest-5-en in 1 ml Dimethylformamid wird 24 h bei 37 °C unter Schütteln fermentiert. Nach Filtration des gesamten Kolbeninhaltes wird das 3,3-Äthylendioxyandrost-5-en-17-on durch Ansäuern mit HCl im Filtrat hydrolysiert und das entstandene Androst-4-en-3,17-dion mit Chloroform extrahiert.
Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 50 % d. Th.. Die immobilisierten Zellen werden nach dem Waschen mit Puffer erneut zum Einsatz gebracht.
2. 5 g *Mycobacterium smegmatis* IMET H 124 (feuchte Biomasse) werden in 15 ml 2%igem NH_4 -Alginat aufgeschlemmt und unter kräftigem Rühren in 100 ml 0,1 M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ bei pH 5 bis 6 ausgefällt. Nach gründlichem Auswaschen der freien Zellen und

Abtrennen kleiner Partikel werden die immobilisierten Zellen, wie in Beispiel 1 beschrieben, mit 25 mg 3,3-Äthylendioxycholest-5-en zum Einsatz gebracht.

Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 55 % d. Th..

3. 3,5 g feuchte Biomasse von *Mycobacterium phlei* IMET SG 1026 werden, wie in Beispiel 1 beschrieben, an DEAE-Zellulose adsorbiert und mit 3,3-Äthylendioxycholest-5-en als Substrat zum Einsatz gebracht.

Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 50 % d. Th..

4. *Mycobacterium phlei* IMET SG 1026 wird entsprechend dem Beispiel 2 in Aluminiumalginat immobilisiert und mit 3,3-Äthylendioxycholest-5-en als Substrat zum Einsatz gebracht.

Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 60 % d. Th..

5. 3,5 g feuchte Biomasse von *Mycobacterium phlei* IMET SG 1026 werden nach Beispiel 1 an DEAE-Zellulose adsorbiert und nach dem Suspendieren des gesamten feuchten Trägers in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 mit 25 mg Cholest-4-en-3-(O-carboxymethyl)oxim in 1 ml Dimethylformamid als Substrat versetzt und 24 h bei 37 °C geschüttelt. Nach dem Abtrennen der immobilisierten Zellen wird das Fermentationsmedium mit 1 N Salzsäure auf pH 2 bis 3 angesäuert und mit Chloroform extrahiert. Die weitere Aufarbeitung des Extraktes geschieht wie folgt: Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wird der Rückstand in 25 ml Aceton gelöst, mit 2,5 ml 30%iger Schwefelsäure versetzt und 2 Stunden am Rückfluß gekocht. Nach Neutralisation des Reaktionsmediums mit ca. 2 ml 25%iger Ammoniaklösung und Vertreiben des Acetons im Vakuum wird mit 25 ml Wasser verdünnt und mit Chloroform extrahiert. Der Chloroformextrakt wird mit 1%iger Kaliumkarbonatlösung und Wasser nacheinander gewaschen und eingeengt. Der Rückstand wird in Äther gelöst und bis zur beginnenden Kristallisation eingeengt.

Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 95 % d. Th..

6. 5 g *Mycobacterium phlei* IMET SG 1026 (Feuchtmasse) werden wie in Beispiel 2 in Aluminiumalginat immobilisiert. Das gesamte Material wird in 50 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 suspendiert

und mit 25 mg Cholest-4-en-3-(O-carboxymethyl)oxim versetzt. Fermentation und Aufarbeitung erfolgen wie in Beispiel 5. Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 50 % d. Th..

7. 3,5 g Mycobacterium phlei IMET SG 1026 (Feuchtmasse) werden in 20 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 suspendiert, mit 20 ml einer Monomerenlösung, die 2,8 g Acrylamid und 28 mg N,N'-Methylenbisacrylamid enthält, versetzt und unter Stickstoff in Gegenwart von 100 mg N,N,N',N'-Tetramethyläthyldiamin und 50 mg Kaliumpersulfat (jeweils in 1 ml Puffer gelöst) polymerisiert. Die Reaktion ist bei 10 °C nach 5 bis 10 Minuten beendet.

Das Gel wird bis zu einer Partikelgröße von 0,25 bis 0,5 mm zerkleinert und nach gründlichem Waschen in 50 ml Puffer suspendiert, mit 25 mg Cholest-4-en-3-(O-carboxymethyl)-oxim in 1 ml Dimethylformamid versetzt und 24 h bei 37 °C geschüttelt.

Die Aufarbeitung des Fermentationsmediums erfolgt wie in Beispiel 5 beschrieben.

Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 70 % d. Th..

8. Für die kontinuierliche Fermentation werden 13 g feuchte Biomasse Mycobacterium phlei IMET SG 1026 entsprechend dem Beispiel 7 in Polyacrylamid einpolymerisiert.

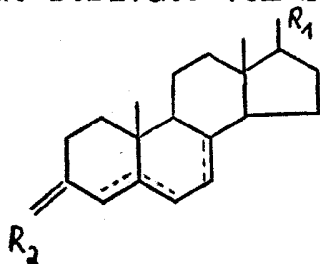
150 ml des zerkleinerten und gut gewaschenen Geles werden in thermostatierten 750 ml Batch-Gefäß mit 150 ml einer Stammlösung von 0,5 mg Cholest-4-en-3(O-carboxymethyl)-oxim/ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 8 (Lösungsvermittler: 2 % Dimethylformamid) bei 37 °C etwa 10 h bis zum Erreichen eines Substratumsatzes von 70 % gerührt. Danach wird mit dem kontinuierlichen Betrieb begonnen, indem mit einer konstanten Geschwindigkeit von 10 bis 15 ml/h Sterinderivat-Stammlösung zugepumpt und die Produktlösung abgezogen werden.

Nach dem Sammeln der abgezogenen Produktlösung erfolgt eine analoge Aufarbeitung, wie im Beispiel 5 beschrieben.

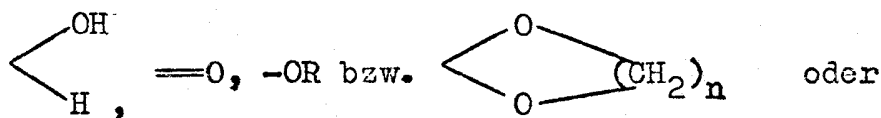
Ausbeute an Androst-4-en-3,17-dion: 60 bis 70 % d. Th., sowohl nach dem Start des kontinuierlichen Betriebes als auch nach mehr als 14 Tagen Fermentationszeit.

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion aus Sterinen durch mikrobiellen Seitenkettenabbau, dadurch gekennzeichnet, daß zum Seitenkettenabbau von Sterinen befähigte Mikroorganismen immobilisiert und damit Sterine bzw. Derivate von Sterinen kontinuierlich bzw. diskontinuierlich bei mehrfach wiederholtem Einsatz der immobilisierten Biomasse fermentiert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen aus den Gattungen Arthrobacter, Bacillus, Brevibacterium, Corynebacterium, Microbacterium, Nocardia, Protaminobacter, Streptomyces und Mycobacterium zum Einsatz bringt.
3. Verfahren nach Punkt 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen durch Adsorption an feste Träger, durch Einpolymerisation in Polymergele oder durch Vernetzung von Polyelektrolyten immobilisiert werden.
4. Verfahren nach Punkt 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man Sterine bzw. Derivate von Sterinen der allgemeinen Formel



worin R_1 den 8 bis 10 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffrest eines Sterins darstellt und in 22-Stellung eine zusätzliche Doppelbindung besitzen kann, die Bindungen Einfach- oder Doppelbindungen sein können und R_2 Sauerstofffunktionen der allgemeinen Struktur



Stickstofffunktionen der allgemeinen Struktur

=NX mit $\text{X} = \text{-O-CH}_2\text{-CQOH}$, -NH-CONH_2 oder

$\text{-NHCOCH}_2\text{N(CH}_3)_3$

darstellen kann, zur Fermentation bringt.