



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

258482

(11) (52)

(22) Přihlášeno 10 06 86
(21) PV 4269-86.0
(32) (31) (33) Právo přednosti od 10 06 85
(P 35 21 111.3) Německá spolková republika

(51) Int. Cl.⁴
C 07 J 1/00
C 12 P 33/00

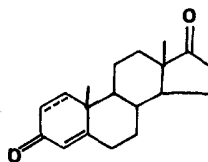
(40) Zveřejněno 17 12 87

(45) Vydáno 14 04 89

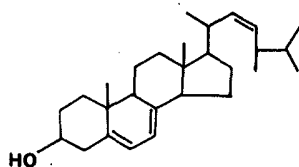
(72) Autor vynálezu WEBER ALFRED dr., KENNECKE MARIO dr., ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)
(73) Majitel patentu SCHERING AKTIENGESSELLSCHAFT, ZÁPADNÍ BERLÍN (Západní Berlín)

(54) Způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu

Způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu obecného vzorce I, ve kterém ----- znamená jedno-
duchou nebo dvojnou vazbu, vyznačující se tím, že se ergosterol vzorce II fermentuje kulturou kmene Mycobacterium spec. NRRL B-3805 nebo Mycobacterium spec. NRRL B-3683 schopného odbourávat postranní řetězce steroidů. Vyráběné sloučeniny obecného vzorce I jsou cennými meziprodukty, které se používají k syntéze farmakologicky účinných steroidů.



(I)



(II)

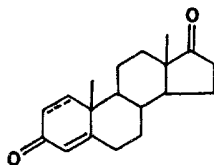
Vynález se týká způsobu výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu, které jsou cennými meziprodukty k výrobě farmakologicky účinných steroidů.

Je známo, že četné mikroorganismy (jako například mikroorganismy rodů *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces* a zejména *Mycobacterium*) mají přirozenou schopnost odbourávat v přírodě se vyskytující 3-beta-hydroxy- Δ^5 -steroly (jako cholesterol nebo sitosterol) na oxid uhličitý a vodu, a že se při tomto odbourávání intermediárně tvoří 5-androsten-3,17-dion a 1,4-androstadien-3,17-dion.

Dále je známo, že pomocí přísad inhibitorů nebo mutovaných mikroorganismů je možno regulovat odbourávání sterolů tak, že se zamezí odbourávání vznikajícího 4-androsten-3,17-dionu nebo 1,4-androstadien-3,17-dionu (srov. německé zveřejněné spisy 1 543 269 a 1 593 327, jakož i americký patentový spis 3 684 657).

Pro odborníka je překvapující skutečnost, že se za známých podmínek odbourává také postranní řetězec ergosterolu, protože je známo, že odbourávání postranních řetězců sterolů je způsobováno velmi komplexním systémem fermentů a nebylo možno očekávat, že všechny enzymy současně se podílející na odbourávání postranních řetězců přirozených steroidů, mohou také způsobit odbourání postranních řetězců této sloučeniny. Kromě toho nebylo možno předpokládat, že při tomto odbourávání se hydrogenuje Δ^7 -dvojná vazba ergosterolu.

Předmětem předloženého vynálezu je způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu obecného vzorce I

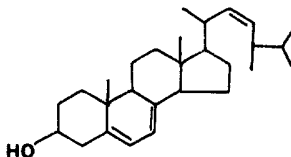


(I)

v němž <

znamená jednoduchou nebo dvojnou vazbu,

který spočívá v tom, že se fermentuje ergosterol vzorce II



pomocí kultury kmene *Mycobacterium spec. NRRL B-3 805* nebo *Mycobacterium spec. NRRL B-3 683*, který má schopnost odbourávat postranní řetězce sterolů.

Nehledě na použití jiných výchozích látek se postup podle vynálezu provádí za stejných fermentačních podmínek, které se používají také při známých mikrobiologických reakcích k odbourání postranních řetězců sterolů.

Za kultivačních podmínek, které se obvykle používají pro tyto mikroorganismy, se provádí kultivace ve vhodném živném prostředí za provzdušňování submersních kultur. Poté se ke kulturám přidá substrát (rozpuštěný ve vhodném rozpouštědle nebo výhodně v emulgované formě) a provádí se fermentace až do okamžiku, kdy je dosaženo maximální přeměny substrátu.

Vhodnými rozpouštědly substrátu jsou například methanol, ethanol, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid. Emulgate substrátu může být dosaženo například tím,

že se substrát v mikronisované formě nebo rozpuštěn v rozpouštědle mísitelném s vodou (jako je methanol, ethanol, aceton, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid) nastříkuje pomocí trysky za silné turbulence do vody (výhodně demineralisované vody), která obsahuje obvyklé pomocné emulgátory. Vhodnými pomocnými emulgátory jsou neionogenní emulgátory, jako například adukty ethylenoxidu nebo estery mastných kyselin polyglykolů. Jako vhodné emulgátory lze uvést například na trhu obvyklá smáčedla Tegin^(R), Tween^(R) a Span^(R).

Optimální koncentrace substrátu, doba přidávání substrátu a trvání fermentace jsou závislé na struktuře používaného substrátu, jakož i na druhu použitého mikroorganismu. Tyto veličiny se musí, tak jak je při mikrobiologických přeměnách steroidů obecně potřebné, zjistit v jednotlivém případě předběžnými pokusy, které jsou pro odborníka běžné.

Deriváty 4-androsten-3,17-dionu obecného vzorce I, které lze vyrobit postupem podle vynálezu, jsou jak známo cennými meziprodukty, které se používají průmyslově k syntéze farmakologicky účinných steroidů.

Následující příklady slouží k objasnění postupu podle vynálezu, jeho rozsah však v žádném směru neomezuje.

P ř í k l a d 1

Erlenmeyrova baňka o obsahu 2 litrů, která obsahuje 500 ml sterilní živné půdy sestávající z

- 1 % kvasničného extraktu
- 0,45 % dinatriumhydrogenfosfátu
- 0,34 % kaliumdihydrogenfosfátu a
- 0,2 % Tween^(R) 80

a upravené na pH 6,7, se naočkuje suspenzí *Mycobacterium spec.* NRRL B-3 805 (suchá kultura) a protřepává se po dobu 3 dnů při teplotě 30 °C a při 190 otáčkách za minutu.

20 Erlenmeyerových baněk (o obsahu 500 ml) s obsahem vždy 100 ml sterilní živné půdy, která sestává z

- 2,5 % kukuřičného výluhu
- 0,3 % diamoniumhydrogenfosfátu
- 0,25 % sojové moučky a
- 0,25 % emulgátoru Tween^(R) 80

a která byla upravena na pH 7,0 se naočkuje vždy 5 ml vypěstované kultury *Mycobacterium spec.* a obsah se protřepává po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C a při 220 otáčkách za minutu. Potom se přidá ke každé živné půdě 30 mg ergosterolu rozpuštěného v 1,5 ml dimethylformamidu a pokračuje se ve fermentaci dalších 96 hodin při teplotě 30 °C.

Spojené kultury po kultivaci se extrahují ethylenchloridem, extrakt se zahustí ve vakuu, zbytek se čistí chromatografií přes sloupec silikagelu a po překrystalování z diisopropyl-etheru se získá 150 mg 4-androsten-3,17-dionu.

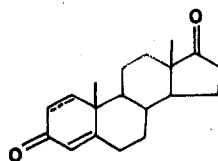
Kromě toho se získá nazpět 380 mg nezreagovaného ergosterolu.

P ř í k l a d 2

Za stejných podmínek jako jsou popsány v příkladu 1, avšak za použití kmene *Mycobacterium spec.* NRRL B-3 683 se nechá reagovat 600 mg ergosterolu a po analogickém zpracování jako v příkladu 1 se získá vedle 400 mg nezreagovaného ergosterolu 130 mg 1,4-androstadien-3,17-dionu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu obecného vzorce I

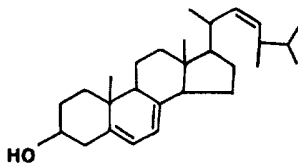


(I)

v němž

znamená jednoduchou nebo dvojnou vazbu,

vyznačující se tím, že se ergosterol vzorce II



(II)

fermentuje kulturou kmene Mycobacterium spec. NRRL B-3 805 nebo Mycobacterium spec. NRRL B-3 683 schopného odbourávat postranní řetězce sterolů.