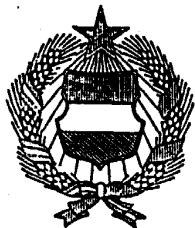


(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11) 186 868

A bejelentés napja: (22) 82. 07. 23.

(21) (2384/82)

A bejelentés elsőbbsége: (33) (32) (31)
US 81. 07. 24. (286 308)

A közzététel napja: (41) (42) 1984. 04. 30.

Megjelent: (45) 87. 12. 30.

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO,
C 12 P 33/1b

Feltaláló(k): (72)

KNIGHT John Costain, vegyész, WOYCHA Merle Gene, biokémikus,
Kalamazoo, Michigan, US

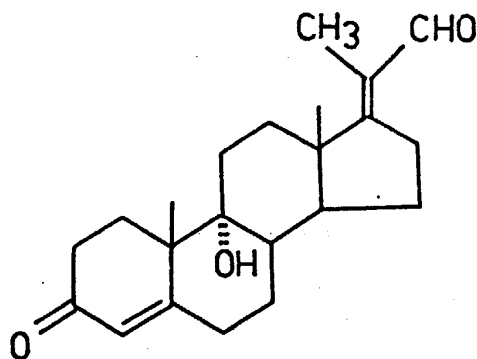
Szabadalmas: (73)

The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, US

FERMENTÁCIÓS ELJÁRÁS 9-HIDROXI-3-OXO-4,17(20) PREGNADIÉN-20-AL ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

Jelen találmány új fermentációs eljárást ismertet, mely az új hasznos szteroid közttermék, az (I) képletű 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-al előállítására alkalmas, aerob körülmények között, c 17 helyzetű oldalláncot tartalmazó szteroidokból. Ezt a vegyületet értékes kortikoidok szintézisében lehet alkalmazni.



(1)

A találmány tárgya fermentációs eljárás szteroidok, közelebbről a 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)pregnadién-20-karboxaldehid előállítására. [(I képletű vegyület)]

A 4029 549. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119 alkalmazását ismertetik 9-hidroxi-3-oxo-4-pregnén-20-karbonsav(9-hidroxi-bisz-norsav) előállítására. Azonos mikroorganizmus alkalmazását írják le a 4035 236. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban 9-hidroxi-4-androsztén-3,17-dion(9-hidroxi-androszténdion) előállítására és a 4214 051. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban 9-hidroxi-3-oxo-4-pregnén-20-karbonsav-metilészter(9-hidroxi-bisz-norsav-metilészter) előállítására.

A 79 104 372.2 számú európai szabadalmi bejelentésben kétlépcsős fermentációt ismertetnek a 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karbonsav előállítására, mely vegyület értékes kortikoidok előállítása során közttermékként alkalmazható. Az eljárás során első lépésként a szterineket fermentációs úton, *Mycobacterium* NRRL B-8054 törzs alkalmazásával 3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karbonsavvá alakítják, majd ezt a vegyületet a hidroxilcsoport 9- α helyzetbe vitelére képes mikroorganizmusok bármelyikével 9-hidroxi-vegyületté alakítják.

Kidolgoztunk egy olyan fermentációs eljárást, mely az új, hasznos közttermék, a 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karboxaldehid előállítására szolgál. Az eljárás végrehajtásához az M. fortuitum NRRL B-8119 egy mutánsát használhatjuk. Az eljárás során használjuk a 4029 549. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetett kettős mutánsokat, amelyek a *Mycobacterium* nemzetségből származnak. E nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok szterin-bontó képessége jól ismert. Ebbe a nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok vad törzsei a színeket nem szelektíven kis molekulású vegyületekre, például széndioxidra és vízre bontják. Az előzőekben leírt vad törzsekből a 4029 549. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 1. példájában közölt eljárás szerint mutánsok nyerhetők. Példánkban M. fortuitum NRRL B-8119 előállítását ismertetjük.

Az előzőekben ismertetett nemzetségekből, a 4029 549. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás 1. példájában közölt eljárással nyert mutánsokból az itt ismertetésre kerülő mutációs eljárással újabb mutánsok nyerhetők. Ezek az utóbbi mutánsok, mint az a M. fortuitum NRRL B-12433 példáján bemutatjuk, a következőkben ismertetésre kerülő fermentációs eljárásban (I) képletű vegyület előállítására alkalmasak.

A *Mycobacterium* nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok mutációjával olyan mutánsok nyerhetők, amelyekre a szterinek szelektív bontására való képesség és a fermentáléban főtermékként 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karboxaldehid felhalmozása jellemző.

Szterineken 19 szénatomos szteroid vázzal rendelkező, a 3-as helyzetben β -konfigurációjú hidroxilcsoportot, az 5- és 6-szénatom között kettős kö-

tést és a 17-helyzetben 2-10 szénatomos oldalláncot tartalmazó vegyületet értünk.

A következőkben példát ismertetünk a találmány szerinti eljárásban használt mutáns előállítására. A példában M. fortuitum NRRL B-12433 mutáns nyerünk. Hasonló mutánsok nyerhetők a következő referenciapéldákban szereplő eljárás szerint más *Mycobacterium* fajokból is.

Referenciapélda

A szterin lebontás főtermékeként
9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karboxaldehidet termelő mutáns előállítása.

Mycobacterium fortuitum NRRL B-8119-et tenyésztünk 31 °C-on, literenként 8 g peptonos húslevest (3 g/l marhahúskivonat és 5 g/l pepton; Difco Company, Detroit, Michigan, USA), 1 g élesztő kivonatot, 5 g glicerint, 0,1 vegyes% Tween 80-at és desztillált vizet tartalmazó táptalajban. Ezt a táptalajt 20 percen át, $1,03 \cdot 10^5$ Pa nyomás alatt autoklávban sterilizzuk. A sejteket $5 \cdot 10^8$ ml sűrűség eléréséig szaporítjuk, majd 0,2 mikronos steril szűrőn összegyűjtjük. A sejteket azonos térfogatú steril, 0,1% Tween 80-at tartalmazó, pH 5,6-os 0,1 mól/l nátrium-citráttal mossuk, s ugyanebből a pufferből fél térfogatnyi mennyiségben felfuszpendáljuk. Annyi N-metil-N'-nitro-N-nitrozó-guandint adunk hozzá, hogy koncentrációja 100 μ g/ml legyen, és a sejtsuszpenziót 31 °C-on 1 óra hosszat inkubáljuk. Ezután a sejteket 2 térfogat steril, 0,1% Tween 80-at tartalmazó pH 7, 0,1 mól/l kálium-foszfát pufferrel mossuk, és 1 térfogat azonos pufferben felfuszpendáljuk. Literenként 8 g peptonos húslevest, 5 g nátrium-kloridot, 5 g glicerint és desztillált vizet tartalmazó táptalajt készítünk. 15 g/l agart adunk hozzá és a táptalajt 20 percig $1,03 \cdot 10^5$ Pa nyomás alatt autoklávban sterilizzuk, majd steril petri csészékbe öntjük. Ezután a mutagénnel kezelt sejteket ezen a táptalajon szélesztjük, majd a lemezekben kinőtt telepeket kis léptékű fermentációban vizsgáljuk meg, hogy mérjük szterineket (I) képletű vegyületté alakító képességüket. A kívánt vegyületet a kísérleti fermentáció során nyert fermentlé metilén-kloridos extraktumából mutatjuk ki vékonyréteg kromatográfiával. Ehhez szilikagél réteget és metilén-klorid, aceton és ecetsav 212 : 38 : 1 arányú elegyet mint futtatószeret alkalmazunk. Így módon izoláljuk az NRRL B-12 433 mutáns, mely a szterinek biológiai átalakításának fő termékeként 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karboxaldehidet halmoz fel.

Az itt leírthoz hasonló mutáns előállításának feltétele, hogy az NRRL B-8119-hez hasonlóan a szteroid gyűrű lebontásában gátolt, ennek következtében 9- α -hidrox-androszténdiont termelő törzsből kell kiindulni, s ebben kell létrehozni egy második mutációt, mely a szterin oldallánc lebontására van hatással.

A biológiai átalakítással létrehozott mutáns csak a szteroid molekulára kifejtett hatásában tér el az anyakultúrától, azaz a *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119-től. Minden más szempontból, mint például morfológiailag, gyógyszerérzékenység

szempontjából hasonló, vagy azonos azzal. Mindkét *M. fortuitum* tenyészet savtűrő, nem mozgékony, nem spórázó bacillus, az Actinomycetales rendjének Mycobacteriaceae családjába tartoznak. Runyon osztályozása szerint (Runyon, E. H.: Med. Clin. North America 43, 273, (1959) ez a IV. csoportba tartozó nem homogén mycobaktérium, azaz viszonylag egyszerű táptalajon, alacsony hőmérsékleten pigment nélküli telepeket fejlesztve gyorsan nő.

A *M. fortuitum* NRRL B-8119 és az NRRL B-12433 az Amerikai Egyesült Államok Mezőgazdasági Minisztériumának Északi Regionális Kutató Laboratóriumában (Peoria, Illinois állam) van deponálva. A *M. fortuitum* a nyilvánosság számára legalább a korábban említett, a mikroorganizmust ismertető amerikai egyesült államokbeli szabadalmak publikálása óta hozzáférhető. A *M. fortuitum* NRRL B-12433 deponálásának ideje. 1981. május 4. Ebből a mikroorganizmus törzsből származó mutántst bárki kaphat a törzsgyűjteményből.

Az (I) képletű vegyület értékes kortikoidok szintézisében használható köztitermék. Például a megfelelő savvá oxidálható, azaz 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karbonsav állítható elő belőle, mely a 79 104 372.2 számú európai szabadalmi bejelentésben részletesen ismertetett eljárás szerint hidrokortizon-acetáttá alakítható.

A következő kiviteli példákkal a találmány szerinti fermentációs eljárást kívánjuk megvilágítani. Ha más megjelölés nem szerepel, a százalékok minden esetben súlyszázalékot, az oldószeranyagok arányai térfogatarányokat jelentenek.

1. példa. Nyers szitoszterin fermentációja

A fermentációs táptalaj literenként 8,0 g Ucont (aktív anyagként polipropilén-glikolt tartalmazó szintetikus habzágató, a Union Carbide, New York, USA terméke), 5,0 g Cerelose (nyers glukóz, a Corn Products, USA terméke), 3,0 g ammónium-kloridot, 3,0 g kalcium-karbonátot, 3,0 g trinátrium-citrát-dihidrátot, 2,0 g Tween 80-at, 1,0 g szójalisztet, 0,5 g kálium-dihidrogén-foszfátot, 0,5 g karbamidot és 30 g nyers szitoszterint tartalmaz csapvizben, a pH-t 7,0-ra beállítva. E táptalaj 100 ml-es adagjait 10-10 ml, a következő módon készült tenyésztettel oltjuk be: literenként 8,0 g peptonos húslevest, 5,0 g glicerint, 1,0 g élesztőkivonatot, 1,0 g Tween 80-at tartalmazó, desztillált vízzel készült, pH 7,0-ra beállított táptalajt *M. fortuitum* NRRL B-12433-mal beoltunk és 28 °C-on tenyésztjük. Az előbbieken leírt, 110 ml tenyészetet tartalmazó lombikokat rázógépre helyezzük és 28 °C-on 336 órán át inkubáljuk. Az inkubációt követően az elegyet extraháljuk, és a terméket a következőkben leírásra kerülő 3. példa szerint izoláljuk.

2. példa

Megfelel az 1. példának, de a táptalajhoz szubsztrátként egyenként vagy együttesen tiszta

vagy nyers szterineket adunk. Ilyen szubsztrátok lehetnek a szitoszterin, koleszterin, sztigmaszterin és kampezszerin.

3. példa. (I) képletű vegyület kinyerése *M. fortuitum* NRRL B-12433 fermentációjából származó fermentleiből

A szitoszterinnek *M. fortuitum* NRRL B-12433-mal történő biológiai átalakításából származó fermentlevet megsavanyítjuk, majd azonos térfogatú metilén-kloriddal kétszer extraháljuk. 29,2 g és 8,9 g nyers kivonatot nyerünk.

Az első extraktumot metilén-kloridban újra oldjuk, és a savas komponensek eltávolítása érdekében telített nátrium-hidrogén-karbonát oldattal mosuk. A maradék semleges anyagot az oldószer eltávolítása után barna olajként nyerjük ki, súlya 18,6 g. Ez az anyag vékonyréteg- és folyadékkromatográfiás vizsgálatok tanúsága szerint három fő UV-elnyelő zónát tartalmaz. Ezek közül a legkevésbé poláros az (A) és (B) képletű metil-észterek keveréke, mely keverékben a (B) képletű metil-észter van túlsúlyban. A legpolárosabb a (C) képletű 9,22-dihidroxi vegyület, a közepes polaritású vegyületet 9-hidroxi-3-oxo-4,17(20)-pregnadién-20-karboxaldehidként azonosítottuk, (I) képlet, a következők szerint. Szilícium-oxid oszlopon végzett előkromatográfiával (I) képletű aldehidben dúsított frakciót nyerünk. Az oszlopot 30% etil-acetátot tartalmazó metilén-kloriddal eluáljuk. Az így nyert 3,3 g tömegű anyagot három előre töltött, sorba kötött Lobar szilikagél oszlopon (B méret, E. Merck Co.) gondosan újrakromatografáljuk, eluensként 20% etil-acetátot tartalmazó metilén-kloridot alkalmazunk. 1,05 g színtelen, etil-acetát, metilén-klorid elegyből tű alakú kristályok formájában kiváló (I) képletű aldehidet nyerünk, melynek olvadáspontja 194-212 °C, $(\alpha)_D^{20} + 96^\circ$ (c, 1,024; CHCl₃).

Elemzés a C₂₂H₃₀O₃ képlet alapján:

számított: C, 77,16%; H, 8,83%;

talált: C, 77,53%; H, 8,71%.

A tömegspektrumban szerepel egy molekulaion 342 m/e értéknél (alapcsúcs) és nagyobb iontöredékek 324, 309, 295, 191, 136 és 124 m/e értéknél.

H-NMR spektrum: 1,02 (18-CH₃); 1,36 (19-CH₃); 1,82 (21-CH₃); 5,88 (4-H); 10,04 (CHO) ppm.

IR-spektrum: 3497, 3440 cm⁻¹ (—OH); 1663 cm⁻¹ (α,β telítetlen karbonil); 1622, 1617 cm⁻¹ (C=C).

UV-spektrum: λ_{max} 250 nm; (ε, 27900; metanol)

Szabadalmi igénypontok

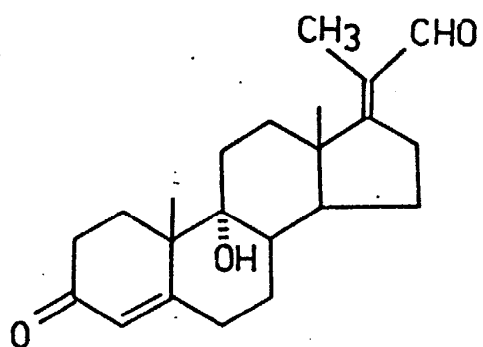
1. Fermentációs eljárás az (I) képletű vegyület előállítására, azzal jellemezve, hogy *Mycobacterium fortuitum* mutántst, előnyösen a *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8119 törzs egy mutántst, különösen előnyösen a *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-12433 törzset tenyésztjük vizes táptalajban, aerób körülmények között, szterin jelenlété-

ben, majd a keletkezett (I) képletű vegyületet a fermentléből kinyerjük.

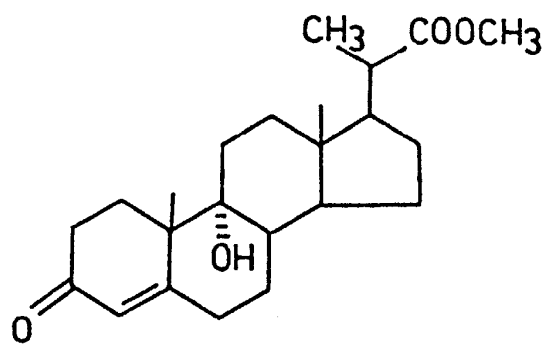
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemez-*

ve, hogy szterinként szitoszterint, koleszterint, sztigmaszterint vagy kampeszterint vagy ezek keverékét alkalmazzuk.

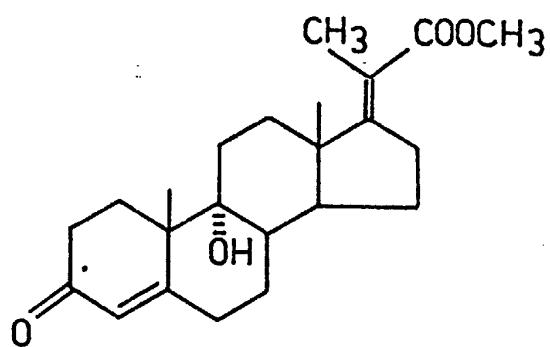
1 oldal rajz



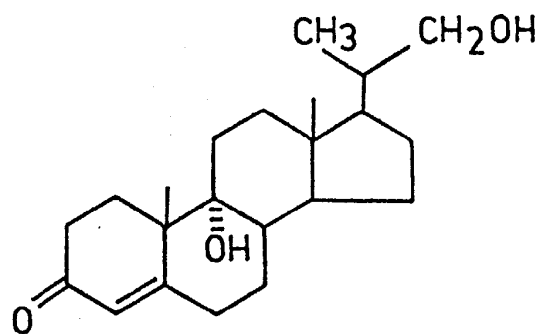
(I)



(A)



(B)



(C)