



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 266 592 A1

4(51) C 12 P 33/06

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 310 585 4

(22) 17.12.87

(44) 05.04.89

(71) VEB JENAPHARM, Otto-Schott-Straße 15, Jena, 6900, DD

(72) Stopsack, Heinz, Dr. Dipl.-Chem.; Auweiler, Jörg, Dipl.-Chem.; Röder, Bernd, Dr. Dipl.-Biol.; Meyer, Käte; Zepter, Rudolf, Dr. Dipl.-Chem.; Groh, Helmut, Dr. Dipl.-Chem.; Tresselt, Dieter, Dr. Dipl.-Phys., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-20-hydroxymethyl-1,4-pregnen-3-on

(55) Herstellungsverfahren, 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-20-hydroxymethyl-1,4-pregnen-3-on, enzymatisch, (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnen-3-on, sterile Luft, Mikroorganismen, Curvularia, Cochliobolus, Cunninghamella, Bacillus megatherium, wäßrige Suspension, Lösung, organisches Lösungsmittel, Methanol, Keton, Glykolmonoether, Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Substratkonzentration

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-20-hydroxymethyl-1,4-pregnen-3-on durch enzymatische Umwandlung von (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnen unter Zuleitung von steriler Luft. Als Mikroorganismen werden vorzugsweise solche der Gattung Curvularia, Cochliobolus, Cunninghamella oder Bacillus megatherium eingesetzt. Das Substrat wird in wäßriger Lösung oder in einem organischen Lösungsmittel gelöst zugegeben. Bei Anwendung einer wäßrigen Suspension wird die Substanz in mikronisierter Form und in Gegenwart von nichtionogenen Emulgatoren zugegeben. Wird das Substrat in einem organischen Lösungsmittel gelöst zugegeben, so wird die Substanz in einem niederen Alkohol Keton, Glykolmonoether, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid gelöst.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on, **dadurch gekennzeichnet**, daß (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on enzymatisch unter Zuleitung von steriler Luft in 11 β - und 15 β -Stellung hydroxyliert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Mikroorganismen vorzugsweise solche der Gattung *Curvularia*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella* oder *Bacillus megatherium* eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Substrat (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on in wäßriger Suspension oder in einem organischen Lösungsmittel gelöst zugegeben wird.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei Anwendung einer wäßrigen Suspension, die Substanz in mikronisierter Form und in Gegenwart von nichtionogenen Emulgatoren zugegeben wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß bei der Zugabe des Substrates in Form einer Lösung in einem organischen Lösungsmittel dieses in einem niederen Alkohol, vorzugsweise Methanol, in einem Keton, Glykolmonoether, Dimethylformamid oder Dimethylsulfoxid gelöst wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Fermentationstemperatur vorzugsweise 28 bis 30°C beträgt.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Substratkonzentration während der Fermentation bis zu 5% betragen kann.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von 11 β , 15 β -Dihydroxy-(20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on aus (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on durch mikrobiologische Hydroxylierung mit Hilfe von Pilzen der Gattung *Cochliobolus*. Derartige hydroxylierte Verbindungen sind als Zwischenprodukte für die Synthese pharmazeutisch wertvoller Wirkstoffe mit Steroidstruktur verwendbar.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Wie bekannt, ist (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on durch mikrobiellen Seitenkettenabbau von Sterolen gut zugänglich geworden. ([Appl. Microbiol. **23**, 72 [1972]; Bull. Chem. Soc. Jap. **58**, 1081 [1985]). Wie weiterhin bekannt, ist es möglich, mit Hilfe enzymischer Reaktionen Hydroxylgruppen in das Steroidgerüst einzuführen (vgl. K. Kieslich, „Steroid Conversions“ W. Charney, H. Herzog „Microbial Transformations of Steroids“, Acad. Press, New York-Zürich, 1967). Gemäß einem älteren Recht kann Prednisolon aus 1-Dehydro-11-desoxy-steroiden mit dem Pilz *Cochliobolus lunatus* 148 hergestellt werden. Weiterhin ist entsprechend einem älteren Recht bekannt, Prednisolon-17-acetat aus 11-Desoxy-1,4-3-oxo-steroiden mit dem Pilz *Cochliobolus lunatus* 148 herzustellen. Es ist weiterhin bekannt, 11 β -Hydroxylierungen mit Hilfe der Mikroorganismen *Cunninghamella* und *Bacillus megatherium* durchzuführen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein ökonomisch günstiges Verfahren zur Herstellung von 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on durch enzymatische Hydroxylierung darzulegen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die o. g. Zielverbindung in einem technologisch leicht durchführbaren Verfahren aus dem zugänglichen (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on herzustellen.

Erfindungsgemäß kann diese Aufgabe durch mikrobielle Hydroxylierung mit Hilfe Mikroorganismen, z. B. der Gattung *Curvularia*, *Cochliobolus*, *Cunninghamella*, *Bacillus megatherium*, insbesondere aber *Cochliobolus lunatus*, gelöst werden. Überraschend dabei ist, daß nach dem bekannten Stand der Technik Steroidkörper mit der 1,4-Dien-3-on Struktur nur schwer hydroxylierbar sind. In diesem Fall aber sogar Doppelhydroxylierung in Ausbeuten bis zu 80% erreicht wird. Die Fermentation wird in der Weise durchgeführt, daß der für die Reaktion eingesetzte Pilz unter üblichen Kulturbedingungen in einem Nährmedium angezüchtet und vermehrt wird. Das Substrat, (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on, wird dann in Form einer Suspension oder aber vorzugsweise, in Form einer Lösung in einem Lösungsmittel zugegeben und unter Eintrag von steriler Luft solange fermentiert, bis maximale Substratumwandlung erreicht worden ist.

Als Lösungsmittel bei der Herstellung der Substratlösung sind niedere Alkohole und Ketone, Glykolmonoether, Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid geeignet. Bei Einsatz als wäßrige Suspension empfiehlt es sich die Substanz in sehr

fein verteilter Form (mikronisiert) anzubieten und in Gegenwart nichtionogenen Emulgatoren zu arbeiten. Abhängig von dem gewählten Gesamtsystem kann die Substratkonzentration während der Fermentation bis zu 5% betragen. Die erforderliche Fermentationszeit ist u. a. abhängig von der Substratkonzentration und muß von Fall zu Fall ermittelt werden. Sie beträgt erfahrungsgemäß 30 bis 50 Stunden, bei einer Fermentationstemperatur von 28 bis 30°C.

Die Umsetzung kann leicht mit Hilfe von DC verfolgt werden. Mit Vorteil werden dabei Methylenchloridextrakte eingesetzt, mit Kieselgelplatten gearbeitet und als Laufmittel Chloroform/Methanol (7:3) verwendet. Die Detektion kann durch Betrachten unter UV-Licht oder Besprühen mit methanolischer Schwefelsäure und anschließendem Erwärmen geschehen. Das Ausgangsmaterial hat unter diesen Bedingungen einen R_f -Wert um 0,8, die Zielsubstanz einen R_f -Wert um 0,6.

Zur Isolierung und Reindarstellung wird die Kulturlösung nach beendeter Fermentation mit einem mit Wasser nicht oder nur begrenzt mischbarem Lösungsmittel erschöpfend extrahiert, wobei zur Erleichterung der Phasentrennung ggf. in Gegenwart geringer Mengen eines Detergens zugegeben werden muß. Zur Extraktion geeignet sind halogenierte Kohlenwasserstoffe, niedere Ester und Alkohole mit mehr als 4-C-Atomen, niedere Ketone und aromatische Kohlenwasserstoffe. Mit Vorteil wird jedoch Methylenchlorid verwendet, da sich mit diesem Extraktionsmittel das Zielprodukt sehr selektiv abtrennen und sehr leicht in eine methanolische Lösung überführen läßt, aus der es dann bereits mit hoher Reinheit auskristallisiert. Durch nochmalige Umkristallisation aus Methanol kann 11 β ,15 β -Dihydroxy-(20S)-hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on in analysenreiner Form erhalten werden. Die Substanz ist durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

Aussehen: kleine weiße Nadeln

F: 241 bis 251°C

Löslichkeit: leicht löslich: DMSO, DMF; löslich: MeOH, EtOH; wenig löslich in Chloroform, Aceton

Analyse: $C_{22}H_{32}O_4$ (360,22) ber. C = 73,30; H = 8,95%

gef. C = 73,24; H = 8,75%

MG (M^+ ; m/e): 360,2276

IR-Maxima (cm^{-1}): 3475 (OH), 3335 (OH), 1660 (C = O), 1618 (C = C), 1605 (C = C)

1H -NMR(DMSO- d_6): 1,11 ppm (d, J = 6Hz, 3H) 21-CH₃

gegen HMDS als

ext. Standard)

1,30 ppm (s, 3H) 18-CH₃

1,60 ppm (s, 3H) 19-CH₃

6,09 ppm (d, J = 2Hz, 1H) 4-OH

6,32 ppm (dd, J = 10Hz u. 2Hz, 1H) 2-CH

7,52 ppm (d, J = 10Hz, 1H) 1-CH

$[\alpha]^{20}_D$:

+16° (MeOH, c = 1)

Ausführungsbeispiel

Eine sterile Nährlösung folgender Zusammensetzung

Malsquellwasser	180 g
Glukose	21 g
Kaliumhydrogenphosphat	2,25 g
Magnesiumsulfat $\times 7H_2O$	4,5 g
Eisen II sulfat $\times 7H_2O$	0,45 g
Manganchlorid $\times 4H_2O$	0,45 g
Zinksulfat $\times 7H_2O$	0,15 g
Kaliumchlorid	3,0 g
Aqua dest. ad	3 000 ml

wird mit einer 3 Tage alten Kultur (Agrarschrägröhrchen 28°C) von *Cochliobolus lunatus* 118 beimpft. Nach Beimpfen werden 3g (20S)-20-Hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on, gelöst in 40ml Methanol, zugegeben und unter Rühren bei 29°C und einem Sauerstoffeintrag von $\geq 40\%$ Sättigung 48 Stunden fermentiert. Während der Fermentation wird der pH-Wert durch Zugabe von 1n Schwefelsäure auf 4,5 gehalten.

Nach beendeter Fermentation wird die Kulturlösung mit 750ml und 4mal mit je 200ml Methylenchlorid extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt, mit wenig Wasser gewaschen, 20mg Aktivkohle zugegeben, 10 Minuten gekocht, filtriert und etwa 2400ml Methylenchlorid abdestilliert. Nun werden 750ml Methanol zugefügt und das Gemisch auf etwa 150ml eingedampft, wobei sich Kristalle abzuscheiden beginnen. Zur Vervollständigung der Kristallisation wird das Konzentrat noch 2 Tage bei etwa 6°C aufbewahrt, anschließend die Kristalle abgetrennt und mit wenig kaltem Methylenchlorid gewaschen und getrocknet. Es werden 2,1g 11 β ,25 β -Dihydroxy-(20S)-20-hydroxymethyl-1,4-pregnadien-3-on erhalten.

Nach Vereinigen der Mutterlauge und Waschlauge und nochmaligem Einengen können weitere 0,75g der o.g. Verbindung isoliert werden. Durch Umkristallisation aus Methanol kann eine weitere Reinigung erfolgen und ein analysenreines Produkt erhalten werden.