

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 873489 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **873489**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
**C12P 33/00
C07J 1/00**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **09.12.1986**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.08.1987**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **11.08.1987**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **09.12.1986 PCT/DE1986/000508**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

13.12.1985 DE P_3544662.5

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Schering Aktiengesellschaft, Müllerstrasse 178, 13353 Berlin, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Weber, Alfred, BRD, SAKSA, (DE)

2 • Kennecke, Mario, 1000 Berlin 33, SAKSA, (DE)

3 • Kurzidim, Johannes, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä 4-androsteeni-3,17-dionin ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionin valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av 4-androsten-3,17-dion och 1,4-androsta dien-3,17-dion.

- Steroidien on spesifinen ja yhdisteen nimeltä dionin
- Steroidien on spesifinen ja yhdisteen nimeltä dionin
- Steroidien on spesifinen ja yhdisteen nimeltä dionin

Menetelmä 4-androsteeni-3,17-dionin ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionin valmistamiseksi

5 Keksintö koskee patenttivaatimuksissa määritellyjä menetelmiä.

Tiedetään, että lukuisilla mikro-organismeilla (esimerkiksi seuraaviin sukuihin kuuluvilla: Arthrobacter, Brevibacterium, Microbacterium, Protaminobacter, Bacillus, Norcardia, Streptomyces ja erityisesti Mycobacterium) on luonnollinen kyky hajottaa luonnossa esiintyvät 3β -hydroksi- Δ^5 -sterolit (kuten kolesteroli tai sitosteroli) hiilidioksidiksi ja vedeksi ja että tässä hajoamistapahtumassa muodostuu intermediäärisesti 4-androsteeni-3,17-dionia ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionia.

15 Edelleen tiedetään, että käyttäen apuna inhibiittorilisäyksiä tai mikro-organismeja, joissa on aikaansaatu mutaatio, on mahdollista ohjata sterolien hajoamista siten, että vältetään muodostuneen 4-androsteeni-3,17-dionin tai 1,4-androstadieeni-3,17-dionin hajoaminen (kts. DE-patenttijulkaisut 1 543 269 ja 1 593 327 sekä US-patenttijulkaisu 3 684 657).

25 Asiantuntijoiden mielestä on yllättävää, että tunnetuissa olosuhteissa myös α -sitosterolin sivuketju hajoaa, koska on tunnettua, että sterolien sivuketjujen hajoaminen saadaan aikaan hyvin monimutkaisella fermenttijärjestelmällä, eikä ollut odotettavissa, että kaikki, luonnossa esiintyvien steroidien sivuketjujen hajottamiseen osallistuvat entsyymit, kykenisivät vaikuttamaan myös tämän yhdisteen sivuketjujen hajottamiseen. Tämän lisäksi ei voitu olettaa, että tässä hajoamistapahtumassa α -sitosterolin Δ^7 -kaksoissidos hydrataan ja 4α -asemassa oleva metyyli-ryhmä lohkaistaan.

35 Muiden lähtöyhdisteiden käyttöä lukuunottamatta, keksinnön mukainen menetelmä suoritetaan samoissa fermentiolosuhteissa, jollaisia käytetään sterolien tunnetuissa mikrobiologisissa sivuketjujen hajottamis-reaktioissa.

Fermentointi suoritetaan keksinnön mukaisesti käyttäen sellaista mikro-organismiviljelmää, jollaista tavallisesti käytetään sterolien sivuketjujen hajottamiseen. Sopivia viljelmiä ovat esimerkiksi sterolien sivuketjujen hajottamiseen kykenevät bakteeriviljelmät, jotka kuuluvat seuraaviin sukuihin: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* tai erityisesti *Mycobacterium* -sukuun. Sopivina mikro-organismeina mainittakoon esimerkiksi: *Microbacterium lactum* IAM-1640, *Protaminobacter alboflavus* IAM-1040, *Bacillus roseus* IAM-1257, *Bacillus sphäricus* ATTC-7055, *Norcardia gardneri* IAM-105, *Norcardia minima* IAM-374, *Norcardia corallina* IFO-3338, *Streptomyces rubescens* IAM-74 tai erityisesti mikro-organismeita *Mycobacterium avium* IFO-3082, *Mycobacterium phlei* IFO-3158, *Mycobacterium phlei* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr. 29), *Mycobacterium phlei* ATCC-354, *Mycobacterium smegmatis* IFO-3084, *Mycobacterium smegmatis* ATCC-20, *Mycobacterium smegmatis* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest Nr 27), *Mycobacterium smegmatis* ATCC-19979 ja *Mycobacterium fortuitum* CBS-49566.

Erityisen edullisina mainittakoon mikro-organismeina: *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805, *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683, *Mycobacterium phlei* NRRL B-8154 ja *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8153, joiden avulla α -sitosterolin fermentointi voidaan suorittaa käyttämättä lisäksi 9α -hydroksilointia estäviä inhibiittoreita.

Viljely tapahtuu näille mikro-organismeille tavanomaisissa viljelyolosuhteissa sopivassa elatusaineessa ilmastaen ja vedenalaisissa olosuhteissa. Sitten viljelmiin lisätään substraattia (sopivaan liuottimeen liuotettuna tai edullisesti emulgoidussa muodossa) ja fermentoidaan, kunnes on saavutettu substraatin maksimaalinen muuttuminen.

Sopivia liuottimia substraatille ovat esimerkiksi metanoli, etanoli, glykolimonometyylietteri, dimetyyli-formamidi tai dimetyylisulfoksidi. Substraatin emulgoituminen

voidaan saada aikaan esimerkiksi siten, että sitä suihkute-
 taan hienonnetussa muodossa tai veteen sekoittuvaan liuot-
 timeen (kuten metanoliin, etanoliin, asetoniin, glykoli-
 monometyylieetteriin, dimetyyliformamidiin tai dimetyyli-
 5 sulfoksidiin) liuotettuna voimakkaassa pyörrevirtauksessa
 veteen (edullisesti veteen, josta kalkki on poistettu),
 joka sisältää tavanomaisia emulgointiapuaineita. Sopivia
 emulgointiapuaineita ovat ei-ioniset emulgaattorit, kuten
 esimerkiksi etyleenioksiadduktit tai polyglykoleenin rasva-
 10 happoesterit. Sopivina emulgaattoreina mainittakoon esimer-
 kiksi kaupalliset kostutusaineet Tegin^(R), Tween^(R) ja
 Span^(R).

Optimaalinen substraattikonsentraatio, substraatin
 lisäysaika ja fermentoinnin kesto ovat riippuvaisia käyte-
 15 tyn substraatin rakenteesta ja käytetyn mikro-organismin
 lajista. Nämä suureet täytyy yksittäisessä tapauksessa mää-
 rittää esikokein asiantuntijoille tunnettuja menetelmiä
 käyttäen, kuten yleensä on tapana steroidien mikrobiologi-
 sissa muutostapahtumissa.

20 Keksinnön mukaisen menetelmän mukaan valmistettavat,
 yleisen kaavan I mukaiset 4-androsteeni-3,17-dioni-johdan-
 naiset ovat tunnetusti arvokkaita välituotteita, joita käy-
 tetään nykyään teollisuudessa farmakologisesti vaikuttavien
 steroidien synteesiin.

25 Seuraavien esimerkkien on tarkoitettu selventää kek-
 sinnön mukaista menetelmää.

Esimerkki 1

2-litran Erlenmeyerkolviin, jossa on 500 ml sterii-
 30 liä elatusainetta, sisältäen

1 % hiivauutetta
 0,45 % dinatriumvetyfosfaattia
 0,34 % kaliumdivetyfosfaattia ja
 0,2 % Tween^(R) 80:tä
 pH säädetty arvoon 6,7 -

ympätään *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805-kuivaviljelmä-suspensiota ja ravistellaan 3 päivän ajan 30°C:ssa kierrosnopeuden ollessa 190 kierrosta minuutissa.

- Erlenmeyerkolviin (500 ml), jossa on kulloinkin
- 5 100 ml steriiliä elatusainetta, sisältäen
- 2,5 % maissinliuotusnestettä
- 0,3 % diammoniumvetyfosfaattia
- 0,25 % soijajauhoa ja
- 0,25 % Tween^(R) 80:tä
- 10 pH säädetty 7,0:ksi -
- ympätään kulloinkin 5 ml *Mycobacterium spec.* viljelmää ja ravistellaan 24 tunnin ajan 30°C:ssa kierrosnopeuden ollessa 220 kierrosta minuutissa. Sitten jokaiseen viljelmään lisätään 100 mg α -sitosterolia, 3,0 ml:aan dimetyyli-
- 15 formamidia liuotettuna ja fermentoidaan edelleen 96 tunnin ajan 30°C:ssa.

- Yhdistetyt viljelmät uutetaan etyleenikloridilla, uute haihdutetaan vakuumissa, jäännös puhdistetaan kromatografioimalla silikageelipylväällä ja di-isopropyyli-
- 20 eetteristä uudelleenkiteyttämisen jälkeen saadaan 160 mg 4-androsteeni-3,17-dionia.

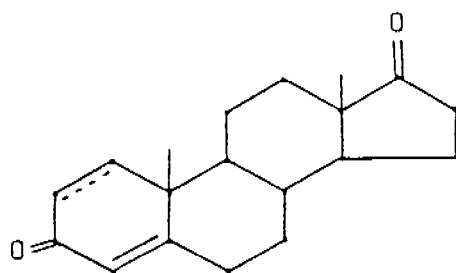
Tämän ohella saadaan takaisin 385 mg reagoimatonta α -sitosterolia.

Esimerkki 2

- 25 Esimerkin 1 olosuhteissa, mutta käyttäen *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683:a annetaan yhteensä 1000 mg:n α -sitosterolia reagoida, rikastetaan ja saadaan 630 mg:n reagoimatonta α -sitosterolia ohella 140 mg 1,4-androstadieeni-3,17-dionia.

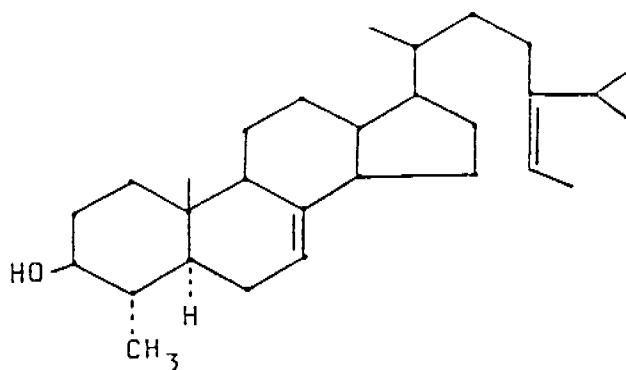
Patenttivaatimukset:

1. Tapa valmistaa 4-androsteeni-3,17-dionia ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionia, joilla on yleinen kaava



jossa

.... tarkoittaa yksinkertaista sidosta tai kaksoissidosta, ja menetelmä on t u n n e t t u siitä, että α -sitosterolia



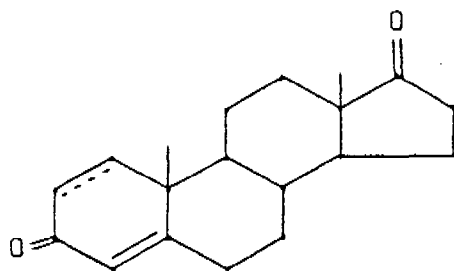
fermentoidaan sterolien sivuketjujen hajottamiseen kykenevän mikro-organismikannan viljelmän kanssa.

2. Menetelmä 4-androsteeni-3,17-dionin ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionin valmistamiseksi patenttivaatimuksen 1 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että α -sitosterolia fermentoidaan sterolien sivuketjujen hajottamiseen kykenevän, Mycobacterium- tai Nocardia -sukua olevan mikro-organismi -kannan kanssa.

3. Menetelmä 4-androsteeni-3,17-dionin ja 1,4-androstadieeni-3,17-dionin valmistamiseksi patenttivaatimuksen 1 ja 2 mukaisesti, t u n n e t t u siitä, että α -sitosterolia fermentoidaan käyttäen Mycobacterium spec. NRRL B-3805:ttä, Mycobacterium spec. NRRL B-3683:a, Mycobacterium phlei NRRL B-8154:ää tai Mycobacterium fortuitum NRRL B-8153:a.

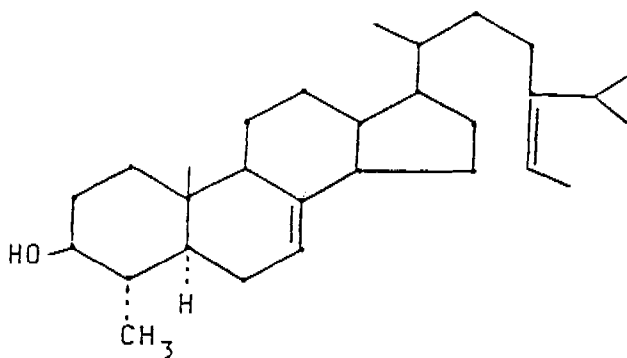
Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av 4-androsten-3,17-dion och 1,4-androstadien-3,17-dion med den allmänna
5 formeln



vari

.... är en enkelbindning eller en dubbelbindning,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man fermenterar
α -sitosterin



med en kultur av en mikroorganismstam, som förmår sönderdela
sidokedjan i steriner.

2. Förfarande för framställning av 4-androsten-3,17-
dion och 1,4-androstadien-3,17-dion enligt patentkravet 1,
k ä n n e t e c k n a t därav, att man fermenterar α-sito-
sterin med en mikroorganismstam ur släktet Mycobacterium
eller Nocardia och som förmår sönderdela sidokedjan i
steriner.

3. Förfarande för framställning av 4-androsten-3,17-dion och 1,4-androstadien-3,17-dion enligt patentkravet 1 och 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att man fermenterar α -sitosterin under användande av Mycobacterium
spec. NRRL B-3805, Mycobacterium spec. NRRL B-3683, Mycobacterium phlei NRRL B-8154 eller Mycobacterium fortuitum NRRL B-8153.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

intunostuk. ei suoritettu

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökninga

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

10.7.91

Spiraviminen

Allekirjoitus