

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PATENTSCHRIFT



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 291 341 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1

Patentgesetz der DDR

vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 33/16

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 P / 336 701 3	(22)	29. 12. 89	(44)	27.06.91
(71)	VEB JENAPHARM, Otto-Schott-Straße 15, O - 6900 Jena, DE				
(72)	Birke, Michael, Dr. rer. nat.; Heller, Ingeborg, Dr. rer. nat. Dipl.-Biol.; Plonka, Gunter, Dr. Dipl.-Biol.; Reiche, Renate, Dipl.-Biol.; Röder, Bernd, Dr. Dipl.-Biol.; Meyer, Manfred; Siemann, Hans-Joachim, Dr. Dipl.-Chem.; Hörhold, Cläre, Prof. Dr. sc. Dipl.-Biol.; Wagner, Horst, Dr. Dipl.-Chem.; Gottschaldt, Birgit, Dipl.-Chem., DE				
(73)	VEB JENAPHARM, O - 6900 Jena; Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, O - 6900 Jena, DE				
(54)	Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion und 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion				

(55) 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion (9-OH-AD), Androst-4-en-3,17-dion (AD), Androsta-1,4-dien-3,17-dion (ADD), Gemische von vollständig und nicht vollständig gesättigten Sterolen, mikrobieller Seitenkettenabbau
(57) Die Erfindung betrifft ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion(AD), Androsta-1,4-dien-3,17-dion (ADD) und 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion, 9-OH-AD, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man Gemische von vollständig und nicht vollständig gesättigten Sterolen mit einer Kultur eines zum Seitenkettenabbau von 3 β -Hydroxy- Δ^5 -sterolen befähigten Mikroorganismus fermentiert.

ISSN 0433-6461

3 Seiten

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion und 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Gemische von vollständig und nicht vollständig gesättigten Sterolen mit einem zum Seitenkettenabbau von 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Sterolen befähigten Mikroorganismus fermentiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man mit *Mycobacterium spec. NRRL B-3805*, *Mycobacterium spec. NRRL B-3683*, *Mycobacterium vaccae ZIMET 11094*, *Mycobacterium vaccae ZIMET 11053* oder *Mycobacterium vaccae ZIMET 11052* fermentiert.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man vollständig gesättigte Sterole in einem beliebigen Mischungsverhältnis mit nicht vollständig gesättigten Sterolen einsetzt.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein mikrobielles Verfahren zur Herstellung von Androst-4-en-3,17-dion, Androsta-1,4-dien-3,17-dion und 9 α -Hydroxy-androst-4-en-3,17-dion. Diese Produkte sind wichtige Ausgangsstoffe für die Synthese von Androstan-Pregnanderivaten sowie Östratrienen, die als Wirkstoffe in der Arzneimittelherstellung Anwendung finden.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es ist bekannt, daß Mikroorganismen natürlich vorkommende 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Sterole (z. B. Cholesterol, Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol, Ergosterol) als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen und zu Kohlendioxid und Wasser abbauen. Bei diesem Abbau werden unter anderem intermediär AD, ADD und 9-OH-AD gebildet. Außerdem ist bekannt, daß mit Hilfe von modifizierten Substraten, Inhibitorzusätzen oder mutierten Mikroorganismen aus 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Sterolen AD, ADD oder 9-OH-AD angereichert werden (siehe Patentschriften: EP 274 147, US-PS 4 755 463, GB-PS 862 701, DE-OS 3 521 111, DD-WP 248 143). Ein wesentlicher enzymatischer Schritt ist hierbei die Dehydrierung der Hydroxylgruppe zur Ketogruppe am C-3 und die Isomerisierung der Doppelbindung von C-5 nach C-4 (Tallalay, P., und Wang, N. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 18, 300–301). Des weiteren wurde festgestellt, daß *Mycobacterium Spec. NRRL B-3683* die Fähigkeit besitzt, in 5 α -Cholestan-3 β -ol eine Δ^4 -Doppelbindung einzuführen (P. Hesselink, *Sterol side chain cleavage by Mycobacterium*, Groningen, 1988, 45–46). Der Mechanismus dieser enzymatischen 4-Dehydrierung wurde bisher nicht aufgeklärt.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in ökonomisch günstiger Weise durch mikrobiellen Seitenkettenabbau die Titelverbindung herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Überraschend wurde festgestellt, daß bei den für den mikrobiellen Seitenkettenabbau von 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Sterolen bekannten Verfahrensbedingungen auch Substratmischungen von vollständig und nicht vollständig gesättigten Sterolen bei einem beliebigen Mischungsverhältnis mit gleichbleibender Produktbildungsgeschwindigkeit zu AD, ADD und 9-OH-AD abgebaut werden. Dieser Befund ist insofern überraschend, da für beide Gruppen von Sterolen andere Enzyme bzw. Enzymsysteme notwendig sind, um die Titelverbindung herzustellen. Gleichfalls war nicht vorherzusehen, daß vollständig und nicht vollständig gesättigte Sterole gleichzeitig zu den Titelverbindungen umgesetzt werden.

Abgesehen von der Verwendung des Substratgemisches, wird das erfindungsgemäße Verfahren so aufgebaut, wie es für den mikrobiellen Seitenkettenabbau von 3 β -Hydroxy- Δ^5 -Sterolen üblich ist.

Erfindungsgemäß wird das Verfahren in seinem Grundzug wie folgt durchgeführt:

Ein Mikroorganismus der zum mikrobiellen Seitenkettenabbau von Sterolen fähig ist, vorzugsweise ein Organismus aus der Gruppe der Bakteriengattungen *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Mikrobacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* und *Streptomyces*, insbesondere die Stämme *Mycobacterium spec. NRRL B-3805*, *Mycobacterium spec. NRRL B-3683*, *Mycobacterium vaccae ZIMET 11094*, *Mycobacterium vaccae ZIMET 11053* und *Mycobacterium vaccae ZIMET 11052*, wird einem Fermentationsansatz zugegeben.

Dieser Fermentationsansatz enthält die für das Wachstum der Mikroorganismen erforderlichen Nährstoffe, so Kohlenstoffquellen wie z. B. Glukose, Glycerin usw., Stickstoffquellen wie z. B. Hefeextrakt, Ammoniumsulfat usw., verschiedene Mineralsalze, gegebenenfalls polymere Adsorberharze und schließlich das Gemisch von gesättigten und nicht vollständig gesättigten Sterolen in einer bestimmten Präparationsform.

Die Herstellung der Substratpräparation erfolgt mit Hilfe bekannter Methoden z. B. Naßvermahlung, Sprühtrocknung, Gefriertrocknung usw. Gegebenenfalls werden für die Herstellung der Substratpräparationen Tenside verwendet.

Die Fermentation wird über 48 Stunden bis 120 Stunden bei 25°C bis 35°C sowie einer Acidität im Bereich von pH 5 bis pH 9 unter aeroben Bedingungen durchgeführt.

Die Fermentation wird erforderlichenfalls durch 30minütiges Erhitzen auf 90°C beendet.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Mycobacterium spec. NRRL B-3683 wird 5 d bei 31 °C auf Schrägagar folgender Zusammensetzung angezüchtet:

20 g Glukose, 5 g Bacto-Pepton, 5 g Fleischextrakt, 15 g Agar agar, Aqua dest. ad 1000 ml, pH = 7,0.

Diese Kultur dient zur Beimpfung einer 500-ml-Steilbrustflasche mit 50 ml Nährmedium folgender Zusammensetzung:

10 g Hefeextrakt, 10 g Glukose, 1,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,02 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Aqua ad 1000 ml pH = 7,0.

Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 28 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine werden jeweils 5 ml dieser Vorkultur zur Beimpfung des Transformationsmediums verwendet. Dafür werden zwanzig 500-ml-Steilbrustflaschen jeweils mit 4,0 g eines polymeren Adsorbierharzes (Wofatit EP 62), 500 mg Substratgemisch (250 mg β -Sitosterol und 250 mg β -Sitostanol) in lyophilisierter Form und mit 50 ml Fermentationsmedium beschickt.

Als Fermentationsmedium wird eine Lösung aus 5,0 g Glukose, 3,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,3 g Harnstoff, 2,0 g KH_2PO_4 , 8,0 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,002 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Aqua dest. ad 1000 ml pH = 7,0 eingesetzt. Anschließend wird eine 72stündige Fermentation auf einem Rundschwingtisch vorgenommen.

Danach wird die Fermentation durch Erhitzen auf 90 °C beendet. Das Harz wird von der Kulturlösung abgetrennt und mit Methanol eluiert. Die dünnschichtchromatographisch ermittelte durchschnittliche Ausbeute an ADD beträgt 4,3 g/l.

Beispiel 2

Bei sonst gleicher Verfahrensweise wie in Beispiel 1 wird der Stamm *Mycobacterium vaccae* ZIMET 11094 verwendet. Bei Einsatz von 10 g je Liter Sterolgemisch erhält man 4,0 g/l ADD.

Beispiel 3

Nach der Verfahrensweise im Beispiel 1 wird der Stamm *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805 eingesetzt. Die dünnschichtchromatographisch ermittelte durchschnittliche Gesamtausbeute an AD beträgt 3,5 g/l.

Beispiel 4

Gemäß den Bedingungen von Beispiel 1 wird der Stamm *Mycobacterium vaccae* ZIMET 11053 angezüchtet. Bei Einsatz von 10 g/l Sterolgemisch erhält man 4,4 g/l 9-OH-AD.

Beispiel 5

Bei sonst gleicher Verfahrensweise wie im Beispiel 2 wird als Substrat ein Gemisch aus 7 g/l β -Sitostanol und 3 g/l β -Sitosterol eingesetzt. Die dünnschichtchromatographisch ermittelte Menge an ADD beträgt 4,0 g/l ADD.

Beispiel 6

Bei sonst gleicher Verfahrensweise wie im Beispiel 2 wird als Substrat ein Gemisch von 3 g/l β -Sitostanol und 7 g/l β -Sitosterol eingesetzt. Man erhält 4,2 g/l ADD.

Beispiel 7

Bei sonst gleicher Verfahrensweise wie im Beispiel 2 wird als Substrat ein Gemisch von 1 g/l β -Sitostanol und 9 g/l β -Sitosterol eingesetzt. Die dünnschichtchromatographisch ermittelte Menge an ADD beträgt 4,1 g/l ADD.