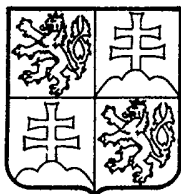


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

271 347

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 J 1/00

(21) PV 9282-86.F
(22) Přihlášeno 12 12 86
(30) Právo přednosti od 13 12 85
DE (P 35 44 662.5)

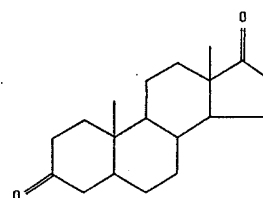
(40) Zveřejněno 12 02 90

(45) Vydáno 05 08 91

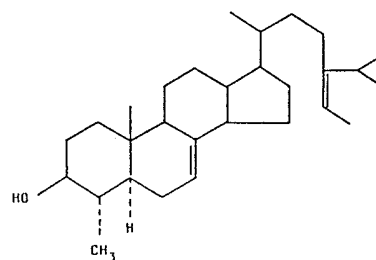
(72) Autor vynálezu WEBER ALFRED dr., KENNECKE MARIO dr.,
KURZIDIM JOHANNES dr.,
ZÁPADNÍ BERLÍN (WB)
(73) Majitel patentu SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT,
ZÁPADNÍ BERLÍN (WB)

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

(57) Způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu
a 1,4-androstadien-3,17-dionu obecného
vzorce I, ve kterém znamená jednodu-
chou vazbu nebo dvojnou vazbu, vyznačující
se tím, že se α -sitosterol vzorce II fer-
mentuje kulturou kmene mikroorganismů
schopných odbourávat postranní řetězce ste-
rolů. Vyráběné sloučeniny se používají ja-
ko meziprodukty k syntéze farmakologicky
účinných steroidů.



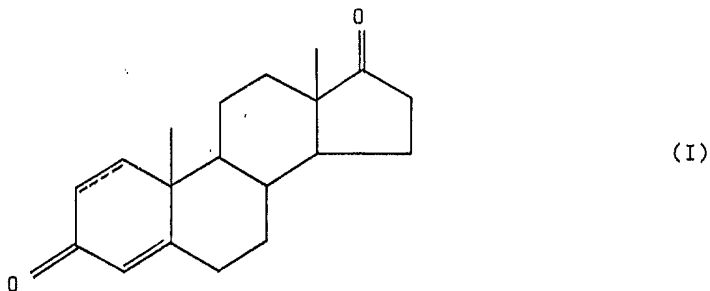
(I)



(II)

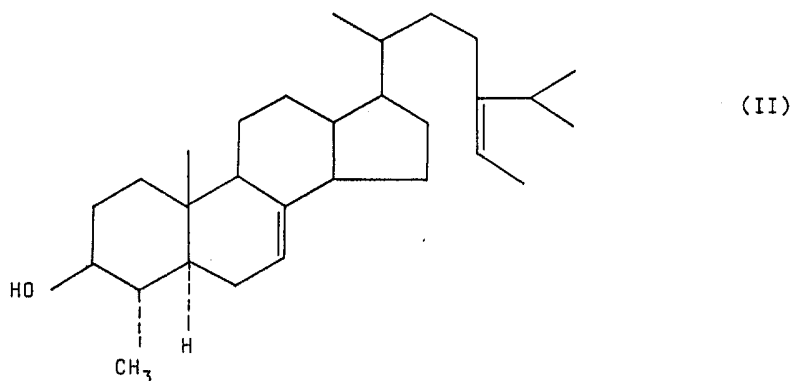
Vynález se týká způsobu výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu. Tyto sloučeniny se používají k syntéze farmakologicky účinných steroidů.

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



ve kterém

..... znamená jednoduchou nebo dvojnou vazbu, který spočívá v tom, že se Δ -sitosterol vzorce II



fermentuje kulturou kmene mikroorganismů, který je schopen odbourávat postranní řetězce sterolů.

Výhodně se postup podle vynálezu provádí tak, že se Δ -sitosterol vzorce II fermentuje kmenem mikroorganismu, které jsou schopny odbourávat postranní řetězce sterolů rodu *Mycobacterium* nebo *Nocardia*.

Výhodné provedení postupu podle vynálezu spočívá dále v tom, že se Δ -sitosterol vzorce II fermentuje pomocí mikroorganismu *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805, *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683, *Mycobacterium phlei* NRRL B-8154 nebo *Mycobacterium fortuitum* NRRL N-8153.

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

Dále je známo, že pomocí přísad inhibitorů nebo mutantů mikroorganismů je možno řídit odbourávání sterolu tak, že se zamezí odbourávání vzniklého 4-androsten-3,17-dionu nebo 1,4-androstadien-3,17-dionu (srov. německé zveřejněné spisy 15 43 269 a 15 93 327, jakož i americký patentový spis 3 684 657).

Pro odborníka je tudíž překvapující, že se za známých podmínek odbourává také postranní řetězec Δ^4 -sitosterolu, vzhledem k tomu, že je známo, že odbourávání postranních řetězců sterolů způsobuje velmi komplexní fermentační systém a nebylo tudíž možno očekávat, že všechny enzymy spolupůsobící při odbourávání postranních řetězců přírodních steroidů mají schopnost způsobit také odbourání postranních řetězců této sloučeniny. Kromě toho nebylo možno předpokládat, že se při tomto odbourávání hydrogenuje Δ^7 -dvojná vazba Δ^4 -sitosterolu a že se odštěpuje methylová skupina v poloze 4 Δ .

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

Podle tohoto vynálezu se fermentace provádí za použití kultury mikroorganismu, která se obvykle používá k odbourávání postranních řetězců sterolů. Vhodnými kulturami jsou například kultury bakterií rodů *Arthro bacter*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Protaminobacter*, *Streptomyces* nebo zejména rodů *Mycobacterium*, schopné odbourávání postranních řetězců sterolů. Jako vhodné mikroorganismy lze uvést například: *Mycobacterium lactum* IAM-1640, *Protaminobacter alboflavus* IAM-1040, *Bacillus roseus* IAM-1257, *Bacillus sphaericus* ATTC-7055, *Nocardia gardneri* IAM-105, *Nocardia minima* IAM-374, *Nocardia cirallina* IFO-3338, *Streptomyces rubescens* IAM-74 nebo zejména mikroorganismy *Mycobacterium avium* IFO-3082, *Mycobacterium phlei* IFO-3158, *Mycobacterium phlei* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest č. 29), *Mycobacterium phlei* ATCC-354, *Mycobacterium smegmatis* IFO-3084, *Mycobacterium smegmatis* ATTC-20, *Mycobacterium smegmatis* (Institut für Gesundheitswesen, Budapest č. 27), *Mycobacterium smegmatis* ATCC-19979 a *Mycobacterium fortuitum* CBS-49566.

Zvláště vhodné jsou mikroorganismy *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805, *Mycobacterium spec.* NRRL-3683, *Mycobacterium phlei* NRRL B-8154 a *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8153, pomocí kterých je možno provádět fermentaci Δ^4 -sitosterolu bez použití přídatných inhibitorů inhibujících 9Δ -hydroxylaci.

Kultivace se provádí za podmínek obvykle používaných pro kultivaci těchto mikroorganismů ve vhodných živných půdách za provzdušňování. Poté se ke kulturám přidá substrát (rozpuštěný nebo výhodně emulgovaný ve vhodném rozpouštědle) a provádí se fermentace až se dosáhne maximální přeměny substrátu.

Vhodnými rozpouštědly pro substrát jsou například methanol, ethanol, glykolmonomethylether, dimethylformamid nebo dimethylsulfoxid. Emulgace substrátu lze dosáhnout například tím, že se tento substrát v mikronisované formě nebo (rozpuštěn) v rozpouštědle mísitelném s vodou (jako v methanolu, ethanolu, acetonu, glykolmonomethyletheru, dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu) vstříkuje pomocí trysky za silné turbulence do vody (výhodně zbavené vápničky), která obsahuje obvyklé pomocné emulgátory. Vhodnými pomocnými emulgátory jsou neionogenní emulgátory, jako například adukty ethylenoxidu nebo esterů 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 doba trvání fermentace závisí na struktuře použitého substrátu a na druhu použitého mikroorganismu. Tyto veličiny se musí, jak je to u mikrobiologických přeměn steroidů obecně zapotřebí, zjistit v jednotlivém případě předběžnými pokusy, které jsou odborníkovi běžné.

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

Následující příklady slouží k bližšímu objasnění postupu podle vynálezu.

Příklad 1

Obsah Elenmeyerovy baňky o obsahu 2 litrů s 500 ml sterilní živné půdy obsahující

- 1 % extraktu z kvasnic
- 0,45 % dinatriumhydrogenfosfátu
- 0,34 % kaliumdihydrogenfosfátu a
- 0,20 % emulgátoru Tween^(R) 80
- a upravené na pH 6,7

se naočkuje suspenzí suché kultury *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805 a protřepává se po dobu 3 dnů při teplotě 30 °C a 190 otáčkách za minutu.

10 Erlenmeyerových baněk (500 ml) vždy se 100 ml sterilní živné půdy obsahující

- 2,5 % kukuřičného výluhu
- 0,3 % dinamoniumhydrogenfosfátu
- 0,25 % sojové moučky
- 0,25 % emulgátoru Tween^(R) 80
- a upravené na pH 7,0

se naočkuje vždy 5 ml kultury *Mycobacterium spec.* a obsah baněk se protřepává 24 hodin při teplotě 30 °C a 220 otáčkách za minutu. Potom se ke každé kultuře přidá roztok 100 mg Δ -sitosterolu v 3,0 ml dimethylformamidu a fermentace se provádí dalších 96 hodin při teplotě 30 °C.

Spojené kultury se extrahují ethylenchloridem, extrakt se zahustí ve vakuu, zbytek se čistí chromatografií na sloupci silikagelu a po překrystalování z diisopropyletheru se získá 160 mg 4-androsten-3,17-dionu.

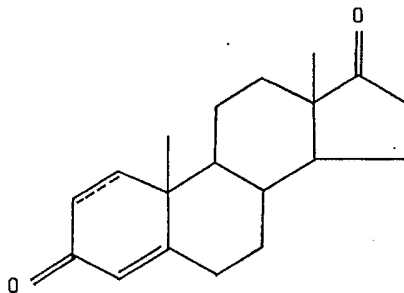
Kromě toho se získá zpět 385 mg nezreagovaného Δ -sitosterolu.

Příklad 2

Za podmínek popsaných v příkladu 1, avšak za použití *Mycobacterium spec.* NRRL B-3683 se nechá zreagovat celkem 1 000 mg Δ -sitosterolu. Po obvyklém zpracování se získá vedle 630 mg nezreagovaného Δ -sitosterolu 140 mg 1,4-androstadien-3,17-dionu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

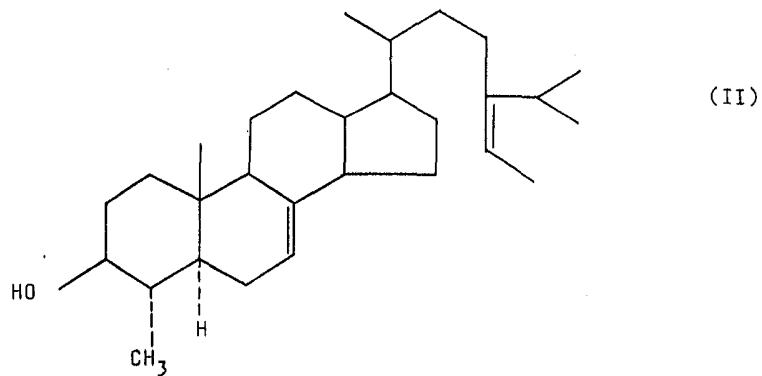
1. Způsob výroby 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu obecného vzorce I



(I)

ve kterém

..... znamená jednoduchou vazbu nebo dvojnou vazbu, vyznačující se tím, že se Δ -sitosterol vzorce II



fermentuje kulturou kmene mikroorganismů schopných odbourávat postranní řetězce steroidů.

2. Způsob podle bodu 1, k výrobě 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu, vyznačující se tím, že se Δ -sitosterol fermentuje kmenem mikroorganismu rodu *Mycobacterium* nebo *Norcardia*, který je schopen odbourávat postranní řetězce steroidů.

3. Způsob podle bodu 1 a 2, k výrobě 4-androsten-3,17-dionu a 1,4-androstadien-3,17-dionu, vyznačující se tím, že se Δ -sitosterol fermentuje mikroorganismem druhu *Mycobacterium spec.* NRRL B-3805, *Mycobacterium spec.* NRRL B-3603, *Mycobacterium phlei* NRRL B-8154 nebo *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8153.