



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

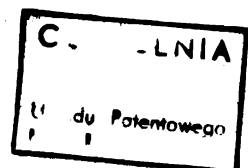
Zgłoszono: 11.11.79 (P. 219549)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 05.06.81

Opis patentowy opublikowano: 10.12.1984

Int. Cl.³ C07J 5/00



Twórcy wynalazku: Leon Sedlaczek, Danuta Wilmańska, Jerzy Długoński,
Teresa Uszycka-Horawa, Maria Danuta Budzyńska,
Maria Skibińska, Romana Jaworska, Zofia Trzcińska,
Jadwiga Szczepaniak, Hanna Goźlińska

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksysteroidów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 11 α -hydroksysteroidów serii pregnanu na drodze biokonwersji przy użyciu szczepu z rodzaju *Cylindroccladium*, gatunku *Cylindroccladium simplex-Meyer* (M. A. Litwinow — Opredielitel Mikroskopicheskikh Poczwiennych Gribow, Leningrad 1967; zdeponowany w Kolekcji Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Łódzkiego; Polska, nr 2358) o jednokierunkowej zdolności transformacji półproduktów w syntezie związków z grupy kortikosteroidów:

Sposobem według wynalazku otrzymuje się związek o wzorze ogólnym 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową ewentualnie zestryfikowaną resztą kwasu organicznego o 2 atomach węgla, R_2 oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową lub grupę α - lub β -metylową albo razem z R_1 grupę izopropylidenodwuoksyłową, X oznacza atom wodoru lub chlorowca lub grupę α - lub β -metylową, a Z jest wiązaniem pojedynczym lub podwójnym między węglami 1 i 2.

W celu otrzymania związku o wzorze 1, związki o wzorze ogólnym 2, w którym R_1 , R_2 , X i Z mają wyżej podane znaczenie, a R_3 oznacza wodór lub resztę kwasu organicznego jedno- lub dwukarboksylowego, poddaje się reakcji hydroksylacji w pozycji 11 α przy użyciu dobnoustroju *Cylindroccladium simplex-Meyer* nr 2358 w formie grzybni roślinnej lub też zarodników. W przypadku, gdy w substracie R_3 stanowi resztę kwasu karbo-

2

ksylowego, w czasie 11 α -hydroksylacji następuje równocześnie hydroliza na C-21 i otrzymuje się produkt o wzorze ogólnym 1.

Z patentów polskich nr 68275 i nr 114034 znany jest szczep *Metarrhizium velutinum* M-6, który wykazuje zdolność hydroksylacji 11 α -korteksolonu i 6 α -fluoro-16 α -metylokorteksolonu. Z opisu patentowego nr 114034 wynika, że szczep ten nie transformuje pochodnej korteksolonu, zawierającej grupę metylową w pozycji 16 β .

Z patentu polskiego nr 90658 znany jest także szczep *Hyphoderma roseum* zdolny do 11 α -hydroksylacji różnych pochodnych korteksolonu, lecz szczep ten nie ma właściwości transformowania niektórych związków steroidowych objętych wzorem ogólnym 2, na przykład takiego, w którym R_1 oznacza 16 β -metyl, R_2 oznacza atom wodoru lub resztę kwasu organicznego jednokarboksylowego lub dwukarboksylowego, X oznacza atom wodoru, a Z stanowi wiązanie pojedyncze lub podwójne. Ponadto szczep *Hyphoderma roseum* przekształca pochodne korteksolonu stosunkowo w niewielkim stężeniu około 0,4 g w 1 litrze, a wydajność otrzymanych 11 α -hydroksyzwiązków nie przekracza 50%.

Wprowadzenie podstawnika tlenowego w pozycji 11 steroidów stanowi istotne zagadnienie w produkcji leków kortykoidowych. Jak dotąd nie istnieją efektywne metody chemiczne umożliwiające przeprowadzenie tej reakcji. Znany jest szereg

drobnoustrojów zdolnych do 11 α -hydroksylacji. Niektóre z nich jednak dają również reakcję w pozycji 1 β lub 6 β , jak na przykład *Absidia orchidis* (Appl. Microbiol. 11 256 (1963)), czy należący do tej samej rodziny *Moniliaceae Botrytis reptonis* J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo) 7, 341 (1961)). W innych przypadkach natomiast przemiana nie jest stereoselektywna i w efekcie uzyskuje się mieszaninę 11 α i 11 β -hydroksypochodnych opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3 054 625).

Nieoczekiwanie okazało się, że drobnoustroje z rodzaju *Cylindrocladium*, a zwłaszcza gatunek *simplex*-Meyer, dotychczas nie stosowane w biotransformacji steroidów, wykazują zdolność jednokierunkowej i stereospecyficznej hydroksylacji pochodnych korteksolonu z wysoką wydajnością do 70%. Ponadto drobnoustroje te odznaczają się stabilnością i zdolnością do szybkiego i obfitego wzrostu na odpowiednio dobranych i łatwo dostępnych podłożach, a także odpornością na zakażenia. Drobnoustroje *Cylindrocladium simplex*-Meyer prowadzą do pożądanej przemiany przy stężeniach umożliwiających ekonomicznie uzasadnione prowadzenie procesów w skali przemysłowej. Uzyskiwane produkty są jednorodne i wystarcza tylko standardowa krystalizacja bez kłopotliwego oczyszczania na kolumnie chromatograficznej.

Według wynalazku substrat steroidowy poddaje się działaniu grzyba *Cylindrocladium simplex* w hodowli tlenowej na pożywkach zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla. Substrat można dodawać do odpowiednio namnożonej kultury w brzeczce fermentacyjnej, można również dodawać do zawieszonej w wodzie lub roztworze buforowym grzybni uprzednio odsączonej lub odwirowanej. Substrat dodaje się w postaci zawiesiny w wodzie, lub roztworu w rozpuszczalnikach organicznych mieszających się z wodą, takich jak: metanol, etanol, aceton, dwumetyloformamid lub dwumetylosulfotlenek lub też w postaci suchej, dokładnie rozdrobionej substancji. W tym ostatnim przypadku korzystne jest dodawanie do roztworu środków powierzchniowoczących. Steroid dodaje się jednorazowo lub w kilku porcjach.

Hydroksylująca aktywność szczepu i otrzymywanie wysokich wydajności procesu transformacji zależą również od doboru i proporcji składników pożywki zapewniających właściwy wzrost drobnoustroju i równocześnie zdolności stymulowania jednokierunkowej biotransformacji. Jako źródło węgla stosuje się węglowodany, takie jak skrobia, glukoza lub sacharoza; jako źródło organicznego azotu stosuje się mąkę kukurydzianą, sojową, pepton, ekstrakt drożdżowy oraz aminokwasy. Poza tym w celu uzyskania właściwego wzrostu hodowli i prawidłowej przemiany dodaje się nieograniczone związki azotu i fosforu, a także witaminy i jony metali w postaci rozpuszczalnych w wodzie soli.

Proces 11 α -hydroksylacji przebiega w warunkach odpowiedniego mieszania i napowietrzania. W warunkach laboratoryjnych właściwe parametry uzyskuje się stosując trzaskawkę obrotową od 220 do 350 obr./minutę, korzystnie stosuje się 300 obr./minutę. Reakcja przebiega w temperaturze 28–30°C i przy wartości pH 6,0 do 6,5.

Ten sam efekt transformacji uzyskuje się poddając substrat działaniu samych zarodników zawieszonych w wodzie lub roztworze buforowym.

Po zakończonej reakcji 11 α -hydroksylacji produkt wyodrębnia się przez ekstrakcję rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą, takimi jak chloroform, chlorek metylenu, metyloizobutyloketon, n-butanol lub ich mieszaninami o odpowiednim składzie. Ekstrakt zawierający steroid odparowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany surowy produkt oczyszcza się przez prostą krystalizację.

Przykład I. Szczep *Cylindrocladium simplex* hodowano w ciągu 7 dni w temperaturze 28°C na podłożu stałym o składzie:

ekstrakt drożdżowy	4 g
brzeczka browarnicza 8°Blg	750 ml
glukoza	4 g
agar	20 g
woda destylowana do	1 litra

Po uzyskaniu dobrze zarodnikującej kultury skos zmywano 3 ml wody destylowanej. Uzyskaną zawiesinę szczepiono 50 ml pożywki w kolbie pojemności 500 ml zawierającej

mąkę sojową	30 g
sacharozę	10 g
KH ₂ PO ₄	5 g
wodę destylowaną do	1 litra

Pożywkę uprzednio wysterylizowano w ciągu 40 minut w temperaturze 120°C. Wartość pH po sterylizacji wynosiła 6,8. Pożywkę w kolbie inkubowano w ciągu 24 godzin w warunkach tlenowych na trzaskawce obrotowej o 300 obr./minutę, w temperaturze 28°C. Biorąc po 10 ml dobrze wyrosniętej kultury szczepiono pożywkę w 5 kolbach zawierających po 100 ml wysterylizowanej pożywki o następującym składzie:

pepton	10 g
ekstrakt drożdżowy	6 g
KH ₂ PO ₄	5 g
glukoza	40 g
woda destylowana do	1 litra

Pożywka została uprzednio wysterylizowana w ciągu 30 minut w temperaturze 120°C. Wartość pH po sterylizacji wynosiła 6,5. Po 38 godzinach hodowli w warunkach napowietrzania i mieszania na trzaskawce obrotowej o 300 obr./minutę do rosnącej kultury w kolbach dodano po 50 mg 17 α -21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu rozpuszczonego w acetonie. Biokonwersję prowadzono w takich samych warunkach jak wzrost kultury. Przebieg biokonwersji kontrolowano metodą chromatografii cienkowsarstwowej. Po około 48 godzinach proces był zakończony. Produkt reakcji wydzielano na drodze ekstrakcji chloroformem. Ekstrakt przemawano, zateżano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość oczyszczono przez krystalizację z acetonu. Otrzymano 155 mg 11 α 17 α , 21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu o temperaturze topnienia 215–217°C,

[α]_D + 113° (1%, metanol), $\lambda_{\max}$ 242 nm, E_{1cm}^{1%} 400.

Przykład II. Proces prowadzono analogicznie jak w przykładzie I przy użyciu szczepu *Cylindrocladium simplex* z tym, że do inkubacji stosowano pożywkę płynną o następującym składzie:

ekstrakt drożdżowy	2,5 g
aminokwasy	4,0 g
KH ₂ PO ₄	4,0 g
brzeczka browarnicza 8° Blg	100 ml
woda destylowana	do 1 litra

Pożywkę sterylizowano w ciągu 30 minut w temperaturze 108°C. Wartość pH po sterylizacji wynosiła 6,5. Kolbę inkubowano 24 godziny na trzęsawce obrotowej przy 300 obr./minutę w temperaturze 28°C. Biorąc po 10 ml inokulum wyrosniętej kultury zaszczerpiono 5 kolb zawierających po 100 ml pożywki sterylizowanej w temperaturze 120°C w ciągu 40 minut o następującym składzie:

mąka sojowa	30 g
sacharoza	10 g
KH ₂ PO ₄	5 g
NaNO ₃	2 g
MgSO ₄	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
CaCl ₂	0,5 g
woda destylowana do	1 litra

Po 42 godzinach inkubacji do 5 kolb dodano po 200 mg 21-hemibursztynianu 16β-metylo-17α, 21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu. Zakończenie procesu następowało po 40 godzinach. Izolację i oczyszczanie produktu prowadzono jak w przykładzie I. Otrzymano 500 mg 16β-metylo-11α, 17α, 21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu o temperaturze topnienia 204—206°C: $\lambda_{\max}$ 242 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 400; $[\alpha]_D^{23} + 103^\circ$ (1% aceton).

Przykład III. Proces namnażania prowadzono analogicznie jak w przykładzie I z tym, że po 48 godzinach inkubacji hodowlę filtrowano przez watę szklaną. W czasie sączenia grzybni zatrzymuje się na wacie a do przesączu przechodzą zarodniki. Zarodniki odwirowano, przemyto wodą w celu eliminacji składników pożywki i zawieszono w buforze fosforanowym o wartości pH 7,0. Następnie dodano 6α-fluoro-16α-metylo-17α,21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dion w ilości po 40 mg na kolbę. Biokonwersja trwa około 60 godzin. Po izolacji jak w przykładach I i II otrzymano 6α-fluoro-16α-metylo-11α, 17α,21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion z wydajnością 70% teoretycznej. Produkt ma temperaturę topnienia 217—220°C; $\lambda_{\max}$ 238 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 390; $[\alpha]_D^{80} 80^\circ$ (1%, 96% metanol).

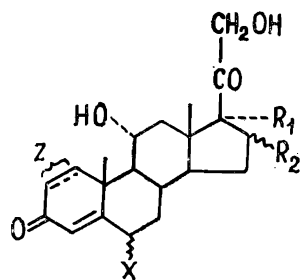
Przykład IV. Proces prowadzono jak w przykładzie I z tym, że namnożoną grzybnę sączone na lejku Büchnera, grzybnę przemyto wodą i zawieszono w wodzie. Do zawiesiny dodano roztwór steroidu i po 45 godzinach proces zakończono. Sposób izolacji oraz wydajność i jakość produktu jak w przykładzie I.

Przykład V. Sposobami podanymi w przykładach I, II, III i IV otrzymano także następujące związki: 6α-fluoro-11α, 17α, 21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion o temperaturze topnienia 194—8°C,

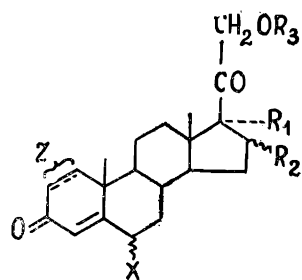
- 5 $[\alpha]_D^{22} + 103^\circ$ (1%, 96% metanol) $\lambda_{\max}$ 238 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 380, z 6α-fluoro-17α, 21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu; 16α-metylo-11α, 17α,21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion o temperaturze topnienia 226—8°C, $\lambda_{\max}$ 242 nm, ϵ 16100, $[\alpha]_D^{25} + 59^\circ$ (1% metanol) z 16α-metylo-17α,21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu; 6α-metylo-11α,17α,21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion o temperaturze topnienia 196—8°C, $[\alpha]_D^{20} + 68^\circ$ (1%, dioksan), $\lambda_{\max}$ 242 nm, ϵ 14500, z 6α-metylo-21-acetoksy-17α-hydroksy-4-pregnen-3,20-dionu; 6α-fluoro-16α,17α-izopropylidenodwuoksy-11α,21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dion o temperaturze topnienia 262—4°C, $\lambda_{\max}$ 236 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 347, KBr $\lambda_{\max}$ 980, 1010, 1060, 1655, 1680, 20 3400 cm^{-1} , z 6α-fluoro-16α,17α-izopropylidenodwuoksy-21-hydroksy-4-pregnen-3,20-dionu; 16β-metylo-11α,17α,21-trihydroksy-4-pregnen-3,20-dion o temperaturze topnienia 204—206°C, $\lambda_{\max}$ 242 nm, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 400, $[\alpha]_D^{23} + 103^\circ$ (12% aceton), z 16β-metylo-17α,21-dihydroksy-4-pregnen-3,20-dionu; 6α-fluoro-16α,17α-izopropylidenodwuoksy-11α, 21-dihydroksy-1,4-pregnadien-20-dion o temperaturze topnienia 227—9°C, $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 415, $\lambda_{\max}$ 244 nm, $[\alpha]_D^{23} + 65^\circ$ (1%, chloroform), z 6α-fluoro-16α,17α-izopropylidenodwuoksy-21-hydroksy-1,4-pregnadien-3,20-dionu.

Zastrzeżenie patentowe

- Sposób wytwarzania 11α-hydroksysteroidów serii pregnanu o wzorze ogólnym 1, w którym R₁ oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową, ewentualnie zesterylizowaną resztę kwasu organicznego o 2—5 atomach węgla, R₂ oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową albo grupę α- lub β-metylową lub razem z R₁ — grupę izopropylidenodwuoksyową, X oznacza atom wodoru albo chlorowca lub grupę α- lub β-metylową, a Z jest pojedynczym lub podwójnym wiązaniem między węglami 1 i 2, na drodze mikrobiologicznej hydroksylacji, 35 **znamienny tym**, że związki o wzorze ogólnym 2, w których R₁, R₂, X i Z mają wyżej podane znaczenie, R₃ oznacza wodór lub resztę kwasu organicznego jedno- lub dwukarboksylowego, poddaje się 11α-hydroksylacji przy użyciu drobnoustroju 40 *Cylindroccladium simplex*-Meyer nr 2358 w postaci jego grzybni-vegetatywnej, lub zarodników w hodowli tlenowej na pożywkach zawierających przyswajalne źródła węgla, azotu, fosforu, a także czynniki wzrostowe, takie jak witaminy i jony metali 45 w postaci odpowiednich soli.



Wzór 1



Wzór 2