

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

90658

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 30.03.74 (P.169967)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.10.75

Opis patentowy opublikowano: 15.08.1977

MKP
C07c 169/32

Int. Cl.²
C07J 3/00

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Leon Sedlaczek, Stefan Łabędzki, Zofia Trzcińska, Krystyna Łubisz, Stefan Włodarczyk, Józefa Korbel, Hanna Goźlińska, Eugeniusz Czerniawski, Halina Pajkowska

Uprawniony z patentu: Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne „Polfarm”, Pabianice (Polska)

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksysteroidów

1

Przedmiotem wynalazku jest nowy sposób wytwarzania 11 α -hydroksysteroidów szeregu pregnanu o ogólnym wzorze 1 w którym:

X – oznacza atom wodoru lub chlorowca np. fluoru, chloru

R – oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową lub acyloksylową

R₁R₂ – oznaczają grupę hydroksylową lub razem wzięte ugrupowanie (wzór 3), w którym R₃ i R₄ oznaczają atomy wodoru lub grupy alkilowe.

Sposobem według wynalazku związki szeregu pregnanu o ogólnym wzorze 2 w którym:

X – oznacza atom wodoru lub chlorowca np. fluoru, chloru

R – oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową lub acyloksylową

R₁R₂ – oznaczają grupę hydroksylową lub razem wzięte ugrupowanie (wzór 3), w którym R₃ i R₄ oznaczają atomy wodoru lub grupy alkilowe hydroksyluje się w pozycji 11 α za pomocą mikroorganizmów należących do rodzaju Hyphoderma, najkorzystniej przez gatunek Hyphoderma roseum, jego grzybnięć wegetatywną lub zarodniki.

Zadowalające rezultaty 11 α -hydroksylacji uzyskuje się również przez działanie innymi gatunkami jak np. Hyphoderma argillaceum, Hyphoderma clavigerum, Hyphoderma polonense, Hyphoderma roseocreum, Hyphoderma tenue, Hyphoderma stetigerum.

Sposób ten może być stosowany do produkcji terapeutycznych lub półfabrykatów stosowanych dalej do wytwarzania związków terapeutycznie czynnych.

2

Selektywna 11 α -hydroksylacja wymienionych na wstępie steroidów jest kluczowym zagadnieniem w funkcjonalizacji tej pozycji. W tym względzie sposoby chemiczne zawodzą. Niewiele drobnoustrojów posiada tę, przemysłowo opłacalną, zdolność i dlatego niewiele jest opatentowanych sposobów. Wobec tego stwierdzenie zdolności mikroorganizmu do selektywnej 11 α -hydroksylacji związków podanych na wstępie tego opisu jest zagadnieniem bardzo ważnym w produkcji leków steroidowych pochodnych pregnanu.

Znane są sposoby 11 α -hydroksylacji steroidów, szeregu pregnanu podane w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki Nr 3 079 384, RFN Nr 1 168 901 i Wielkiej Brytanii Nr 1 043 349. Jako mikroorganizmy stosowane są rodzaje Colletotrichum, Tricothecium i Fusarium.

Według wynalazku steroid poddaje się działaniu mikroorganizmu Hyphoderma roseum w warunkach aerobowych sposobem konwencjonalnym, po czym surowy produkt zawierający w pozycji 11 α grupę hydroksylową wyodrębnia się w znany sposób np. przez ekstrakcję i ewentualnie oczyszcza. Steroid można dodawać:

- do pożywki bezpośrednio po wprowadzeniu inoculum i prowadzić jednocześnie wzrost mikroorganizmu i 11 α hydroksylację steroidu za pomocą rosnącego drobnoustroju,
- do odpowiednio namnożonej kultury w brzeczce wzrostowej,
- do uprzednio namnożonej kultury następnie odsączonej lub odwirowanej, przemytej wodą i zawieszanej w wodzie lub roztworze buforowym w fermentatorze.

Steroid dodaje się w postaci zawiesiny w wodzie, albo w postaci roztworu w rozpuszczalnikach takich jak: metanol, aceton, dwumetyloformamid, dioksan, octan metylu, w wodnych roztworach tych rozpuszczalników lub w postaci suchej, drobnosproszkowanej substancji.

Wskazane jest, aby steroid był silnie rozdrobniony dla umożliwienia maksymalnego kontaktu ze środowiskiem 11α – hydroksylującym.

Steroid dodaje się jednorazowo lub w kilku porcjach. Hodowlę mikroorganizmu *Hyphoderma roseum* uzyskuje się dodając drobnoustrojów w warunkach tlenowych w odpowiednim, płynnym podłożu zawierającym wymagane ilości właściwego źródła azotu i węgla. W celu uzyskania lepszego wzrostu hodowli dodaje się do niej czynniki wzrostowe jak: witaminy, aminokwasy i jony metali.

W czasie trwania procesu miesza się dokładnie hodowlę w celu zapewnienia odpowiedniego kontaktu między steroidem a fazą zawierającą mikroorganizm i enzymy 11α – hydroksylujące. Konieczne jest również doprowadzanie tlenu do hodowli w czasie całego przebiegu procesu oraz niedużych ilości środka przeciwpianego.

Optymalne napowietrzanie kultury sterylnym powietrzem wynosi ok. 0,5 do 1 l powietrza na 1 litr brzezki na 1 minutę przy naciśnięciu w tanku około 1 atn. 11α – hydroksylacja przebiega w optymalnym zakresie temperatur 26 – 30 i przy wartości pH 5 – 6,5.

Proces według wynalazku przebiega również z takim samym skutkiem, jeżeli steroid podda się działaniu samych zarodników wytworzonych przez wyżej wymienione drobnoustroje. Zarodniki te można otrzymać hodując drobnoustroj na pożywce o składzie:

glikoza	22 g
pepton	2 g
KH_2PO_4	1,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,75 g
woda destylowana	do 1000 ml,

a następnie oddzielając od grzybni wegetatywnej. Steroid dodaje się do zawiesiny zarodników w wodzie albo w roztworze buforowym.

Po skończonym procesie 11α – hydroksylacji produkt końcowy odzyskuje się przez ekstrakcję rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą, jak na przykład: chloroform, chlorek metylenu, butanol, octan etylu, metyloizobutyloketon, mieszaniną chloroformbutanol itp.

Ekstrakt zawierający steroid odparowuje się i następnie steroid oczyszcza przez krystalizację z rozpuszczalników lub ich wodnych roztworów jak: chlorowcopochodnych węglowodorów alifatycznych, octanu metylu, octanu etylu, metanolu, acetonu, dwumetyloformamidu, dioksanu itp. lub innymi metodami np. chromatografii kolumnowej.

Przykład I. Szczep *Hyphoderma roseum* hoduje się w ciągu 7 dni w temperaturze 28°C na podłożu stałym o składzie:

glikoza	– 2 g
pepton	– 2 g
KH_2PO_4	– 1,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,75 g
agar	– 15 g
woda destylowana	– 1 l

pH podłoża ~ 6 . Podłoże sterylizuje się 20 minut w temperaturze ok. 117° .

Po uzyskaniu dobrze zarodnikującej kultury skosy zmywa

się 3 ml serylnej wody destylowanej. Zawiesiną uzyskaną z 3 skosów szczepi się kolbę poj. 2 l z 200 ml pożywki o składzie:

ekstrakt drożdżowy	– 10 g
sacharoza	– 5 g
tween 80	– 0,5 g
olej sojowy	– 0,2 g
woda destylowana	– uzupełnia się do 1000 ml.

W ten sposób przygotowuje się 4 kolby. Kolby sterylizuje się 30 minut w temperaturze 120° . pH po sterylizacji 5,2 – 5,4. Kolby inkubuje się w ciągu 48 godzin w warunkach tlenowych w temperaturze 28° . Dobrze wyrośnięta kultura z 4 kolb stanowi inokulum do zaszczepienia fermentatora zawierającego 10 l wysterylizowanej pożywki o wyżej wymienionym składzie. Hodowlę w fermentatorze prowadzi się przy mieszaniu i napowietrzaniu 0,6–0,8 litra powietrza na minutę na 1 litr hodowli przy ciśnieniu 1 atn. Po 24 godzinach wzrostu zawartość fermentatora przeszczepla się do następnego fermentatora zawierającego 100 l wysterylizowanej pożywki o składzie:

pepton	– 7,5 g
ekstrakt drożdżowy	– 4,5 g
glikoza	– 30 g
KH_2PO_4	– 5 g
olej sojowy	– 0,2 g
woda destylowana	– uzupełnia się do 1000 ml.

Pożywkę sterylizuje się 30 minut w temperaturze 120° . pH po sterylizacji 5,4 – 5,6.

Po 24 godzinach hodowli, prowadzonej w identyczny sposób jak w poprzednim fermentatorze, do rosnącej kultury dodaje się 40 g 6α – fluoro 16α , 17α – izopropylideno-dioxy Δ^4 – pregnen, 21-01, 3,20-dionu rozpuszczonego w acetonie.

Biokonwersję prowadzi się w takich samych warunkach jak wzrost kultury w fermentatorach. Przebieg biokonwersji sprawdza się metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po około 24 godzinach proces jest zakończony. Produkt odzyskuje się na drodze ekstrakcji chloroformem lub mieszaniną chloroform – butanol 4:1. Ekstrakt zateża się i otrzymany surowy produkt rekrytalizuje z acetonu lub chlorku metylenu. Otrzymuje się około 20 g prawie białego produktu o następujących danych:

temp. topn. $262\text{--}264^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +97,5^\circ/\text{c} = 1\%$, CHCl_3 ,

$\lambda_{\text{max}} \text{EtOH} = 236 \text{ nm}$, $E_{1\text{cm}}^{1\% \text{EtOH}} = 347$, $E = 15146$

IR – νKBr , max = 980,1030,1060,1655,1680,3400 cm^{-1}

Przykład II. Szczep *Hyphoderma roseum* hoduje się w ciągu 7 dni w temperaturze 28° na podłożu stałym o składzie:

pepton	– 2 g
glikoza	– 2 g
KH_2PO_4	– 1,25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	– 0,75 g
agar	– 15 g
woda destylowana	– 1 l

pH podłoża ~ 6 . Podłoże sterylizuje się 20 minut w temperaturze ok. 117° .

Po uzyskaniu dobrze zarodnikującej kultury skos zmywa się 3 ml wody destylowanej. Zawiesiną uzyskaną z trzech skosów szczepi się kolbę pojemności 2 l z 300 ml pożywki o składzie:

pepton – 7,5 g
 ekstrakt drożdżowy – 4,5 g
 glikoza – 30 g
 KH_2PO_4 – 5 g
 olej sojowy – 0,2 g
 woda destylowana uzupełnia się do 1000 ml

W ten sposób przygotowuje się 4 kolby. Kolby sterylizuje się 30 minut w temperaturze 120°. pH po sterylizacji 5,4–5,6. Kolby inkubuje się w ciągu 48 godzin w warunkach tlenowych na trzęsawce w temperaturze 28°.

Dobrze wyrośnięta kultura z czterech kolb stanowi inokulum do zaszczepienia fermentatora zawierającego 10 l wysterylizowanej pożywki o wyżej wymienionym składzie. Hodowlę w fermentatorze prowadzi się przy mieszaniu i napowietrzaniu 0,6–0,8 litra powietrza na minutę na 1 litr hodowli, przy ciśnieniu 1 atn. Po 24 godzinach wzrostu zawartość fermentatora przeszczepia się do następnego fermentatora zawierającego 100 l uprzednio wysterylizowanej pożywki o składzie:

pepton – 10 g
 ekstrakt drożdżowy – 6 g
 glikoza – 40 g
 KH_2PO_4 – 5 g
 olej sojowy – 0,2 g
 woda destylowana uzupełnia się do 1000 ml.

Pożywkę sterylizuje się 30 minut w temperaturze 120°. pH po sterylizacji 5,4–5,6.

Po 24 godzinach hodowli, prowadzonej w identyczny sposób jak w poprzednim fermentatorze, grzybnię odsąca się, zawiesza w 100 l wody i natychmiast dodaje się 40 g 6 α -fluoro-16 α , 17 α -izopropylidenodioxy – Δ^1 -pregnen, 21–01, 3,20-dionu rozpuszczonego w octanie metylu. Biokonwersję prowadzi się w takich samych warunkach jak wzrost kultury w fermentatorach.

Przebieg biokonwersji sprawdza się chromatograficznie metodą cienkowarstwową. Po około 24 godzinach proces jest zakończony.

Produkt odzyskuje się na drodze ekstrakcji chloroformem lub mieszaniną chloroform-butanol 4:1. Ekstrakt zateża się i otrzymany surowy produkt rekrytalizuje z chlorku metylenu. Otrzymuje się około 20 g prawie białego produktu o danych jak w przykładzie I.

Przykład III. Proces prowadzi się identycznie jak w przykładzie I z następującymi wyjątkami:

Po przeszczepieniu kultury, z fermentatora zawierającego 10 l kultury do fermentatora ze 100 l pożywki, steroid dodaje się w pięciu porcjach. Pierwszą porcję od razu po przeszczepieniu kultury, a następne w odstępach 6-cio godzinnych. Proces trwa około 40–48 godzin.

Uzyskuje się podobną wydajność i jakość końcowego produktu.

Przykład IV. Proces prowadzi się identycznie jak w przykładzie I z następującymi wyjątkami:

Pożywka w ostatnim fermentatorze (100 l) posiada następujący skład:

5 glikoza – 22 g
 pepton – 2 g
 KH_2PO_4 – 1,25 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,75 g
 10 woda destylowana – uzupełnia się do 1000 ml.

Sterylicacja 20 minut w temperaturze ok. 117°.

Po 24 godzinach inkubacji otrzymuje się hodowlę rozdrobnionej grzybni o znacznej ilości zarodników.

15 Hodowlę filtruje się przez watę szklaną. Rozdrobniona grzybnia zatrzymuje się na wacie, a zarodniki przechodzą do filtratu. Zarodniki odwirowuje się na wirówce, przemywa wodą celem eliminacji składników pożywki i zawiesza w buforze fosforanowym o pH 7. Następnie dodaje się steroid. Biokonwersja trwa około 20 godzin.

20 Wydajność i jakość produktu jak w przykładzie I.

Przykład V. Sposobami podanymi w przykładach I, II, III, IV ulegają również hydroksylacji w pozycji 11 α następujące steroidy:

25 6 α -fluoro-16 α -hydroksykorteksolon,
 16 α , 17 α -dwuhydroksyprogesteron,
 6 α -fluoro-16 α -metylokorteksolon,
 16 α , 17 α -izopropylidenodioxyprogesteron,
 korteksolon,
 16 α -hydroksykorteksolon,
 30 16 α , 17 α -izopropylidenodioxykorteksolon.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksysteroidów szeregu pregnanu o ogólnym wzorze 1, w którym:

35 X – oznacza atom wodoru lub chlorowca np. fluoru, chloru,

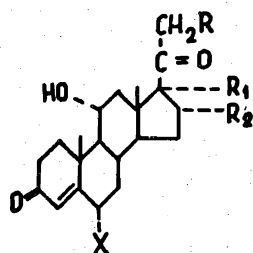
R – oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową lub acyloksylową

40 R₁ i R₂ – oznaczają grupę hydroksylową lub razem wzięte ugrupowanie (wzór 3), w którym R₁ i R₂ oznaczają atomy wodoru lub grupy alkilowe, **znamienny tym, że** związki szeregu pregnanu o ogólnym wzorze 2, w którym:

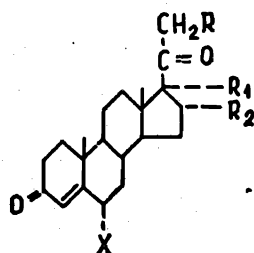
45 X – oznacza atom wodoru lub chlorowca np. fluoru, chloru,

R – oznacza atom wodoru, grupę hydroksylową lub acyloksylową,

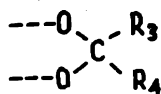
50 R₁ i R₂ – oznaczają grupę hydroksylową lub razem wzięte ugrupowanie (wzór 3), w którym R₁ i R₂ oznaczają atomy wodoru lub grupy alkilowe, hydroksyluje się w pozycji 11 α za pomocą mikroorganizmów należących do rodzaju Hypoderma, najkorzystniej przez gatunek Hypoderma roseum, jego grzybnię wegetatywną lub zarodniki.



Wzór 1



Wzór 2



Wzór 3