

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 08.III.1965 (P 107 817)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 25.XI.1968

Kl. 12 o, 25/04

MKP C 07 c 164/14

UKD

Współtwórcy wynalazku: mgr Wiesława Kotula, mgr inż. Wiesław Le-
wenstein, mgr Jadwiga Golonka, mgr Irena
Eysymontt

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania związków $\Delta^{1,4}$ -3-ketosterydowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania związków $\Delta^{1,4}$ -3-ketosterydowych szeregu androstanu przez odwodornienie na drodze mikrobiologicznej odpowiednich substratów sterydowych. Są to związki o działaniu leczniczym, albo też produkty pośrednie do ich wytwarzania.

Znane sposoby otrzymywania tych związków metodą mikrobiologiczną polegają na zastosowaniu szczepów takich jak *Pseudomonas testosteroni*, *Didymella lycopersici*, niektórych szczepów *Nocardia* i innych. Odwodornienie przy użyciu tych szczepów przebiega dość wolno. Tak więc np. w przypadku szczepów z rodzaju *Nocardia*, np. *Nocardia opaca* lub *Nocardia globorula*, czas przygotowania hodowli i transformacji wynosi łącznie około 96 godzin i w niektórych tylko przypadkach może być skrócony do 72 godzin (opis patentowy brytyjski 789 363), a przy użyciu szczepu *Didymella lycopersici* samo tylko przygotowanie hodowli wymaga 6 dni, a transformacja 3—6 dni (opis patentowy USA 2 929 763).

Okazało się, że czas przygotowania hodowli i transformacji można jeszcze bardziej skrócić, jeżeli w znanym procesie dehydrogenacji mikrobiologicznej zamiast wymienionych szczepów zastosuje się nowe, nieznane dotąd i nie opisane szczepy z rodzaju *Cephalosporium*, a mianowicie *Cephalosporium* sp. C-5 i *Cephalosporium* sp. C-9, uzyskane na drodze selekcji z dwóch dzikich szczepów macierzystych wyizolowanych z ziemi kompostowej. Do

2

tej pory nie stwierdzono obecności dehydrogenaz Δ^1 -sterydowych w szczepach z rodzaju *Cephalosporium* i w związku z tym żaden ze znanych szczepów należących do tego rodzaju nie był stosowany do wytwarzania związków $\Delta^{1,4}$ -3-ketosterydowych.

Według wynalazku związek Δ^4 -3-ketosterydowy szeregu androstanu poddaje się działaniu hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. C-5 lub *Cephalosporium* sp. C-9, lub zawiesiny grzybni tych mikroorganizmów w wodzie z ewentualnym dodatkiem substancji buforowych, lub otrzymanych z tych mikroorganizmów preparatów enzymatycznych w obecności tlenu powietrza sposobem konwencjonalnym, po czym otrzymany związek $\Delta^{1,4}$ -3-ketosterydowy szeregu androstanu wyodrębnia się i oczyszcza w znany sposób.

Hodowlę szczepu *Cephalosporium* C-5 i *Cephalosporium* C-9 można przygotować np. w pożywce płynnej, przy czym już po upływie 18—24 godzin hodowlę można użyć do transformacji. Zamiast hodowli mikroorganizmów można użyć odsączonej grzybni zawieszonej w wodzie w ewentualnej obecności substancji buforowych, np. 0,03 molowym buforze fosforanowym, dzięki czemu eliminuje się barwniki i inne ciała balastowe powstałe podczas przygotowywania hodowli mikroorganizmu i uzyskuje się produkt mniej zanieczyszczony. Można również użyć preparatu enzymatycznego zawierającego dehydrogenazę Δ^1 -sterydową otrzymaną z grzybni w znany sposób. W procesie transforma-

cji czas 20—24 godziny przy zastosowaniu szczepu *Cephalosporium* C-5 lub *Cephalosporium* C-9 wystarcza najzupełniej dla przeprowadzenia reakcji do końca. Transformacja według wynalazku przebiega w jednym kierunku, bez tworzenia się produktów ubocznych, a wydajność procesu według analizy chromatograficznej wynosi blisko 100%.

Szczepy *Cephalosporium* C-5 i *Cephalosporium* C-9, podobnie jak znane szczepy z rodzaju *Cephalosporium*, charakteryzują się brakiem organów rozmnażania płciowego, występowaniem grzybni podstawowej i powietrznej. Grzybnia podzielona i rozgałęziona, hialinowa, tworzy sploty synnema-

ta. Pojedyncze strzępki lub synnemata mogą tworzyć pętle. Zarodniki tworzące się na końcach konidioforów stopniowo przemieszczają się tworząc główki. Główki konidialne są osadzone na nierozdętych szczytach konidioforów, zawierają po kilka zarodników zlepionych substancją kleistą — mucus — łatwo rozpadają się. Konidiofory są proste, niepodzielone lub z jednym podziałem poprzecznym. Wyrastają pod kątem prostym wokół strzępki i na całej jej długości. Konidia hialinowe jednokomórkowe mogą być owalne, elipsoidalne, o wymiarach 9—10 μ na 3,5—4,0 μ i 3,4—10,0 μ na 2,4—6,0 μ . Zdarzają się zarodniki o kształtach fusariopodobnych.

Nazwa podłoża	Szczep C-9	Szczep C-5
Agar Czapek Dox z sacharozą	Kolonie okrągłe, lekko wypukłe, średnica około 5 mm, białe zabarwiające się na kolor różowołososiowy. Grzybnia powietrzna biaława, krótka, w postaci wzniesionych prostych ostro zakończonych igiełek, często sklejonych z wielu pojedynczych strzępek synnemata o długości 780—830 μ i średnicy podstawy 18—37 μ lub strzępek pojedynczych i ich splotów (ropes). Konidiofory w kształcie butelki o średnicy podstawy 3—5 μ i 2,5—3,5 μ . Na szczycie konidioforów zlepione zarodniki tworzą główki. Konidia hialinowe, jednokomórkowe, owalne, elipsoidalne lub łódkowato wygięte o wymiarach 3—4 $\mu \times$ 7—10 μ .	Kolonie kremowe o średnicy 2—4 mm, grzybnia podstawowa wrastająca w podłoże. Grzybnia powietrzna biała krótka, splątana, wełnista, silnie rozgałęziona, wyższa na środku kolonii, występuje w postaci pojedynczych strzępek i grubszych splotów. Konidiofory o długości 10—60 μ , średnicy podstawy 1,5—2,5 μ . Bez podziału lub z jednym podziałem poprzecznym. Główki konidialne kuliste, spotyka się zlepione w kształcie tulipana. Konidia owalne, elipsoidalne o wymiarach 4—10 μ na 2,3—4 μ zawierają drobne granulki o charakterze lipoidalnym.
Agar ziemniaczany według Waksmana	Kolonie okrągłe o średnicy 8,5—10 mm, różowo-łososiowe, wypukłe. Grzybnia podstawowa wrastająca w podłoże. Grzybnia powietrzna łososiowa, gęsta krótka w postaci igiełek synnemata — o średnicy podstawy około 45 μ lub skręconych wełniste pojedynczych strzępek i ich splotów. Konidiofory o długości 4—24 μ i średnicy podstawy 2,5—3 μ bez lub z jednym podziałem poprzecznym, spotyka się niekiedy dwa podziały. Występują na grzybni powietrznej wzdłuż synnemata oraz pionowo na grzybni podstawowej. Główki konidialne o średnicy 7,5—25 μ w kształcie tulipana z wysuniętym jednym konidium. Konidia elipsoidalne lub łódkowate jednokomórkowe, w starszych kulturach stają się wrzecionowate lub fusariopodobne, często z jednym podziałem poprzecznym. Cytoplazma konidii drobno granulowana. Konidia oblepiają nici grzybni powietrznej lub leżą na podłożu. Grzybnia podstawowa tworzy pętle.	Kolonie białe, okrągłe, wypukłe, o średnicy 8—9 mm. Grzybnia podstawowa bezbarwna tworzy obrzeżenie kolonii, strzępki zagięte w kierunku przeciwnym do ruchu wskazówek zegara. Grzybnia powietrzna biała w kształcie rzadkich, długich prostych, wniesionych igiełek — synnemata — składających się z wielu pojedynczych strzępek, długości 1010—1380 μ i średnicy podstawy 11—83 μ . Konidiofory o długości 5—25 μ i o średnicy podstawy 2,5—3 μ bez lub z jednym podziałem poprzecznym wyrastają wokół i na całej długości synnemata oraz pionowo z grzybni podstawowej. Główki konidialne kuliste, konidia owalne, i elipsoidalne o wymiarach 2—3 μ na 4—11 μ . Zawierają po kilka drobnych lipoidalnych granulek.

Nazwa podłoża	Szczep C-9	Szczep C-5
Agar owsiany	Kolonie okrągłe o średnicy 5 mm brudno-różowe, płaskie z wyraźnie zaznaczonym środkiem. Grzybnia podstawowa różowawa, nieregularnie rozgałęziona. Grzybnia powietrzna w postaci kilku strzępek tylko na środku kolonii. Konidiofory o długości 0,75—5,5 μ bez lub z jednym podziałem poprzecznym wyrastają pionowo z grzybni podstawowej. Główki konidialne nieregularne o średnicy 7,5—22,5 μ . Konidia owalne, elipsoidalne lub żółtkowate. W starszych hodowlach są wrzecionowate lub fusariopodobne. Często z jednym, niekiedy z dwoma podziałami poprzecznymi. Wymiary: 7—17 μ na 2,5—4 μ . Cytoplazma konidii drobno granulowana.	Kolonie okrągłe o średnicy 2—4 mm, bezbarwne, płaskie z wyraźnie zaznaczonym środkiem. Grzybnia podstawowa bezbarwna, nieregularnie rozgałęziona, o średnicy 1—2,5 μ . Grzybnia powietrzna jest słabo rozwinięta i występuje tylko na środku kolonii. Konidiofory wyrastają pionowo z grzybni podstawowej, posiadają jeden podział lub nie posiadają żadnego. Wymiary: długość 7,5—2,5 μ i średnica podstawy 1—1,2 μ . Główki konidialne kuliste o średnicy 5—15 μ , w starszych kulturach zlepiają się tworząc nieregularną głowę na kilku konidioforach. Konidia owalne, elipsoidalne o wymiarach 6—12 μ na 2—3 μ . Cytoplazma w równych granulach.

Przykład I. Zarodniki szczepu *Cephalosporium* sp. C-5 uzyskane z 10-dniowej hodowli na agarze skośnym Czapek Doxa zawieszono w 5 ml jałowej wody. Zawiesinę tą posiano kolbę o pojemności 1 l wypełnioną 100 ml pożywki o składzie: 5 g ekstraktu drożdżowego, 5 g hydrolizatu enzymatycznego krwi bydlęcej i 500 ml brzeczki browarnianej o gęstości 8,7° Blg. i wodą do 1000 ml. Kolbę umieszczono na trzęsawce wahadłowej (100 ud./min., długość wychylenia 8,5 cm) na 23 godziny w temperaturze 28°C do uzyskania obfitego wzrostu. Hodowli tej użyto do posiania 5 kolb jednolitrowych wypełnionych po 200 ml pożywki o składzie: 5 g ekstraktu drożdżowego, 5 g hydrolizatu enzymatycznego krwi bydlęcej, 250 ml brzeczki browarnianej o gęstości 8,7° Blg. i woda do 1000 ml. Kolby umieszczono na trzęsawce i inkubowano w tych samych warunkach co pierwsze stadium. Po 23 godzinach, gdy wzrost był obfity, dodano do każdej kolby po 60 mg 17 α -metylotestosteronu rozpuszczonego w 2,5 ml metalu. Zawartość kolb inkubowano w tych samych warunkach przez 23 godziny, to jest do chwili, gdy chromatografia bibułowa wykazała wyłącznie jedną plamę Δ 1-pochodnej 17 α -metylotestosterenu, po czym zawartość kolb ekstrahowano kilkakrotnie po 40 ml chloroformu. Ekstrakt osuszono bezwodnym siarczanem sodowym i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość po rozpuszczeniu w mieszaninie cykloheksan — benzen 1:1 oczyszczono na kolumnie chromatograficznej z tlenku glinowego o aktywności III stosując do elucji benzen z wzrastającym dodatkiem etanolu. Skład frakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Frakcje zawierające czystą Δ 1-pochodną odparowano do sucha, uzyskując 270 mg 1-dehydro-17 α -metylotestosteronu. Po krystalizacji z etanolu produkt wykazywał temperaturę topnienia 159—161°C, E = 15200 przy $\lambda_{\max} = 243$, $[\alpha]_D^{20} = +2,0^\circ$ (chloroform, c = 1).

Przykład II. Do hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. C-9, uzyskanej w sposób analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I dla *Cephalosporium* sp. C-5, dodano do każdej z 5 kolb po 60 mg 17 α -metylotestosteronu rozpuszczonego w 2 ml metanolu, po czym zawartość kolb inkubowano ponownie w ciągu 24 godzin w warunkach podanych w przykładzie I. Po kilkakrotnej ekstrakcji chloroformem połączone ekstrakty osuszono za pomocą bezwodnego siarczanu sodowego i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym pozostałość oczyszczono chromatograficznie w sposób opisany w przykładzie I, uzyskując 274 mg 1-dehydro-17 α -metylotestosteronu. Po krystalizacji z etanolu produkt wykazywał temperaturę topnienia 160—161°C, E = 15250 przy $\lambda_{\max} = 243$, $[\alpha]_D^{20} = +1,9^\circ$ (chloroform, C = 1).

Przykład III. Do hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. C-9, uzyskanej w sposób analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I dla *Cephalosporium* sp. C-5, dodano do każdej z 5 kolb po 40 mg androsten-4-dionu-3,17 rozpuszczonego w 2 ml metanolu, po czym zawartość kolb inkubowano ponownie w ciągu 24 godzin w warunkach podanych w przykładzie I. Po kilkakrotnej ekstrakcji chloroformem połączone ekstrakty osuszono za pomocą bezwodnego siarczanu sodowego i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym pozostałość oczyszczono chromatograficznie w sposób opisany w przykładzie I, uzyskując androstadien-1,4-dion-3,17 z wydajnością 78%. Po krystalizacji z metanolu produkt wykazywał temperaturę topnienia 137—139°C, E = 15200 przy $\lambda_{\max} = 243$, $[\alpha]_D^{20} = +116^\circ$ (chloroform, c = 1).

Przykład IV. Przygotowano hodowlę podpowierzchniową szczepu *Cephalosporium* sp. C-5 w sposób opisany w przykładzie I, po czym grzybnię oddzielono od brzeczki przez odwirowanie przy 3000 obr./min. w ciągu 20 minut i płyn znad grzybni zlało. Grzybnię z każdej kolby zawieszono w

100 ml 0,03 molarnego buforu fosforanowego o wartości $\text{pH} = 7$ i do zawiesiny dodano po 60 mg 17 α -metylotestosteronu w 2 ml metanolu. Zawartość kolb inkubowano na trzęsawce w temperaturze 28°C w ciągu 18 godzin, to jest do chwili, gdy chromatogram na bibule nie wykazał obecności substratu, lecz jedynie plamę produktu. Po ekstrakcji chloroformem, odparowaniu rozpuszczalnika i oczyszczeniu chromatograficznym w sposób opisany w przykładzie I otrzymano Δ^1 -pochodną 17 α -metylotestosteronu z wydajnością 92%. Po krystalizacji z etanolu produkt wykazywał temperaturę topnienia 160,5–162°C, $E = 15350$ przy $\lambda_{\text{max}} = 243$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 2,0^\circ$ (chloroform, $c = 1$).

Sposób wytwarzania związków $\Delta^{1,4}$ -3-ketosterydowych szeregu androstanu metodą mikrobiologiczną, **znamienny tym**, że związek Δ^4 -3-ketosterydowy szeregu androstanu poddaje się działaniu hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. C-5 lub *Cephalosporium* sp. C-9, lub zawiesiny grzybni tych mikroorganizmów w wodzie z ewentualnym dodatkiem substancji buforowych lub otrzymanych z niej preparatów enzymatycznych, w obecności tlenu powietrza w warunkach konwencjonalnych, po czym otrzymany produkt wyodrębnia się i oczyszcza w znany sposób.