

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

49898

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 27.XII.1963 (P 103 313)

Pierwszeństwo: _____

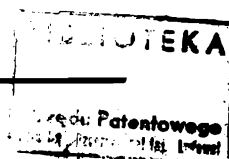
Opublikowano: 4.X.1965

Kl. 12 o, 25/02

MKP C 07 c

UKD

167/114



Współtwórcy wynalazku: mgr inż. Wiesław Lewenstein, mgr Sabina Raczkowska, mgr inż. Zdzisław Zakrzewski

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania $\Delta^{1,4}$ -sterydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania $\Delta^{1,4}$ -sterydów z Δ^4 -sterydów przez selektywne odwodornienie z udziałem mikroorganizmów.

Reakcje selektywnego odwodornienia różnych związków z grupy sterydów przy zastosowaniu procesów biologicznych są znane. Jeżeli posiada się szczep, który jest w stanie przeprowadzić wymaganą reakcję, poważna trudność w uzyskaniu czystego produktu polega na oddzieleniu produktu od substratu, które to związki są do siebie bardzo podobne pod względem właściwości. Najprostsze byłoby doprowadzenie reakcji do końca to jest do całkowitego zaniku substratu, jednakże w wielu przypadkach jest to nieosiągalne lub możliwe tylko przy niskich i ekonomicznie nieopłacalnych stężeniach surowca. Na ogół zbyt daleko idąca intensyfikacja parametrów technologicznych nie jest wskazana ze względu na destrukcję związków sterydowych, która w mniejszym lub większym stopniu towarzyszy reakcji pożądanej.

W znanych sposobach prowadzi się inkubację mikroorganizmu przez właściwy dla niego okres czasu, następnie dodaje się do kultury substrat, po czym prowadzi się reakcję do pewnego z góry przyjętego stopnia przereagowania substratu, po czym całość mieszaniny reakcyjnej poddaje się ekstrakcji organicznymi rozpuszczalnikami. Do ekstraktu przechodzi zarówno produkt jak i nieprzereagowany jeszcze substrat. Po oczyszczeniu ekstraktu i oddestylowaniu rozpuszczalników otrzy-

2

muje się w najlepszym razie mieszaninę dwóch związków, których rozdział wymaga uciążliwych zabiegów jak np. chromatografowania lub wielokrotnej krystalizacji danych związków bądź ich pochodnych itp.

Sposób według wynalazku opiera się na wykorzystaniu równowagi między substratem i produktem oraz na stwierdzeniu, że rozpuszczalność substratu w fazie ciekłej podłoża fermentacyjnego jest minimalna. W oparciu o to opracowano sposób według wynalazku pozwalający na dobre wykorzystanie aktywności enzymatycznej dehydrogenazy wytworzonej przez drobnoustroje. W sposobie według wynalazku usuwa się sukcesywnie ze środowiska reakcji produkt wolny od substratu oraz sukcesywnie dodaje się substrat. Postępując w ten sposób otrzymuje się czysty produkt z dużą wydajnością tak pod względem stopnia przemiany jak i wykorzystania mikroorganizmu i objętości fermentora, a dzięki temu uzyskuje się kilkakrotne zwiększenie wydajności całego procesu jak i skrócenie czasu trwania procesu. Skomplikowane zabiegi związane z rozdziałem produktu i substratu po ukończonym procesie biologicznym drogą chromatografii lub krystalizacji, stają się tu całkowicie zbędne, a pozostaje jedynie końcowe oczyszczenie produktu np. drogą chromatografii lub frakcjonowanej krystalizacji do osiągnięcia czystości wymaganej dla celów terapeutycznych.

Według wynalazku przygotowuje się pożywkę

zawierającą źródło azotu i węgla, dodaje doń związek sterydowy stanowiący substrat, który ma być odwodorniony i po wyjałowieniu wprowadza się przygotowaną poprzednio zawiesinę drobnoustrojów. Zawiesinę tę uzyskuje się drogą wielokrotnego przeszczepiania kultury mikroorganizmów wychodząc ze szczepu liofilizowanego poprzez skosy agarowe i dalszą hodowlę aerobową we wstrząsanych kolbach. Reakcję prowadzi się kontrolując metodą chromatografii bibułowej zawartość produktu w roztworze. Stężenie produktu wzrasta w ciągu reakcji, a następnie ustala się co dowodzi zakończenia reakcji. Wówczas grzybnie czy masę bakteriyną oddziela się od cieczy. Całość nieprzereagowanego substratu wraz ze stosunkowo nieznaczną ilością produktu znajduje się w odsączonej grzybni. Grzybnie wprowadza się do nowego środowiska, ewentualnie uzupełnia się przy tym ilość substratu i proces biologiczny prowadzi się dalej. Opisany cykl może być kilkakrotnie powtórzony przy zastosowaniu stale tej samej grzybni. Ze wszystkich przesączów otrzymanych w poszczególnych cyklach, ekstrahuje się organicznym rozpuszczalnikiem produkt reakcji. Po oczyszczeniu ekstraktu i oddestylowaniu rozpuszczalnika, uzyskuje się produkt wymagający jedynie końcowego ostatecznego oczyszczenia, gdyż z reguły jest on w stanie dość wysokiej czystości, a przede wszystkim nie zawiera on substratu, najtrudniejszego do oddzielenia. Dzięki stosowaniu tej samej grzybni w kolejnych cyklach, przenosi się wraz z nią bez straty zatrzymane przez nią sterydy. Jeżeli grzybnia ma być usunięta np. na skutek degeneracji, po daje się ją ekstrakcji w znany sposób i odzyskuje z niej związki sterydowe. Rozdzieleniu tych związków nie przeprowadza się, gdyż substancje sterydowe z ekstraktu nadają się do zastosowania jako surowiec w następnych szarżach produkcyjnych, prowadzonych z nową grzybnia.

Z wyjątkiem pierwszego cyklu, całość procesu prowadzi się bez zachowania warunków jałowości, co stanowi istotne uproszczenie technologiczne produkcji. Zawieszanie grzybni w drugim i następnych cyklach w wodzie utrudnia rozwój innych drobnoustrojów, które dostały się do środowiska reakcji i mogłyby niekorzystnie wpływać na zasadniczy proces.

Sposób według wynalazku ilustruje podany przykład dotyczący wytwarzania Δ^1 -17 α -metylotestosteronu przez odwodornienie 17 α -metylotestosteronu. Przykład. Przygotowano grzybnie wychodząc z liofilizowanego szczepu *Didymella lycopersici*. Hodowlę przeprowadzono aerobowo we wstrząsanych kolbach. Do tanku fermentacyjnego wprowadzono 2,25 litra pożywki zawierającej źródło azotu i węgla oraz dodano 1250 mg 17 α -metylotestosteronu. Tank wraz z zawartością wyjałowiono, po czym wprowadzono około 400 g świeżo oćwirowanej

grzybni z wyżej wymienionej hodowli. Proces biologiczny prowadzono przy temperaturze 28° w ciągu 16 godzin, po czym zawartość tanku przesączono. Przesącz pozostawiono do dalszej przeróbki, a grzybnie zawrócono do tanku, dopełniono roztworem buforowym względnie wodą do 2,5 litra. Do tej fazy transformacji i do następnej dodano porcję po 625 mg substratu. Do dwóch ostatnich faz substratu już nie dodawano. Łącznie wprowadzono zatem 2,5 g substratu, to jest 1000 mg/l brzeczki. Każdorazowe prowadzenie procesu biologicznego przerywano z chwilą kiedy ilościowa chromatograficzna kontrola prowadzona metodą bibułową nie wykazała dalszego wzrostu stężenia produktu w roztworze. Przesące z poszczególnych cykli poddano ekstrakcji chloroformem. Ekstrakt w organicznym rozpuszczalniku przemyto trzykrotnie 1%-owym roztworem kwaśnego węglanu sodowego i wodą aż do odczynu obojętnego, a następnie po wysuszeniu bezwodnym siarczanem sodowym oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt rozpuszczono w rozcieńczonym metanolu. Roztwór wodno-metanolowy poddano ekstrakcji eterem naftowym w celu usunięcia substancji niesterydowych, a następnie oddestylowano metanol i wodę a wytrącony produkt odsączono i przekrystalizowano z octanu etylu. Otrzymano 1,82 g Δ^1 -17 α -metylotestosteronu o czystości odpowiadającej wymaganiom brytyjskiej farmakopei „B.P.1963”. Stanowi to 72,9% wydajności teoretycznej. Po przeprowadzeniu ostatniego cyklu wyekstrahowano organicznym rozpuszczalnikiem z grzybni 225 mg substratu zmieszanego z produktem. Substancja sterydowa zawarta w ekstrakcie może służyć jako surowiec do następnej szarży produkcyjnej. Po wprowadzeniu poprawki rachunkowej uwzględniającej odzyskanie substancji sterydowej z grzybni, wyliczono wydajność praktyczną, która wynosi około 80%.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania Δ^1 -sterydów przez odwodornienie związków Δ^4 -sterydowych przy udziale drobnoustrojów aerobowych w płynnym środowisku, do którego wprowadza się substrat sterydowy, **znamienny tym**, że podczas prowadzenia procesu kontroluje się systematycznie stężenie produktu w roztworze i proces przerywa się gdy stężenie to praktycznie przestaje wzrastać, po czym grzybnie odsąca się i przenosi do nowego środowiska postępując jak wyżej parokrotnie, a produkt zawarty w przesączach ekstrahuje się organicznym rozpuszczalnikiem i poddaje ostatecznemu oczyszczeniu w znany sposób, przy czym w razie degeneracji grzybni ekstrahuje się z niej w znany sposób związki sterydowe, które odwodarnia się w następnym cyklu produkcji.