



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

57565

Patent dodatkowy
do patentu

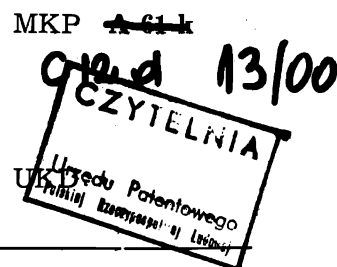
Kl. 30 h, 2/10

Zgłoszono: 25.VI.1966 (P 115 299)

Pierwszeństwo:

MKP ~~4-814~~

Opublikowano: 31.V.1969



Współtwórcy wynalazku: mgr Danuta Paprocka, mgr Barbara Kamerdyniak, mgr Karin Majdziak

Właściciel patentu: Pabianickie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa” Pabianice (Polska)

Sposób wytwarzania pochodnych 3-keto- $\Delta_{1,4}$ -pregnadienu

1

Przedmiotem wynalazku jest nowy sposób wytwarzania pochodnych 3-keto- $\Delta_{1,4}$ -pregnadienu przez dehydrogenację steroidów za pomocą mikroorganizmów albo ich enzymów. Metoda ta może być stosowana do produkcji półfabrykatów używanych do przygotowania związków terapeutycznych, albo do produkcji leków.

Odkrycie znacznie zwiększonej aktywności glukokortykoidów i ograniczenie ubocznych działań takich jak na przykład zatrzymywanie sodu przez kortykoidy dehydrogenowane w pozycji 1-steroidów wzbudziło szerokie zainteresowanie w znalezieniu prostszych i bardziej ekonomicznych metod otrzymywania tych związków.

Chociaż zagadnienie to nie jest nowe i znanych jest wiele metod, jednak nie są one zadawalające szczególnie z powodu degradacji produktu i tworzenia się ubocznych bezużytecznych związków. Poza tym w znanych procesach stosuje się niskie stężenia substratów, co pociąga za sobą zwiększenie pojemności aparatury i wysokie koszty produkcji.

Powyższe procesy opisane są na przykład w J. Amer. Chem. Soc. (1955) 77,4184 (stosuje się bakterie rodzaju *Corynebacterium*) i w Helv. Chem. Acta (1955) 38,1502 (zastosowanie grzybów rodzaju *Didymella*).

Przedmiotem wynalazku jest sposób prowadzenia dehydrogenacji w pozycji 1 kortykosterydów,

2

który jest pozbawiony wszystkich wyżej opisanych wad.

Sposobem według wynalazku dehydrogenację steroidu w pozycji 1 przeprowadza się za pomocą szczepów drobnoustrojów należących do rodzaju *Brevibacterium* najkorzystniej przez gatunki *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium protophormiae* i *Brevibacterium vitarum*. Zadawalające rezultaty uzyskuje się również przez działanie innymi gatunkami jak na przykład *Brevibacterium saepardae*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium imperiale*, *Brevibacterium stationis*, *Brevibacterium divaricatum* i inne.

Jedną z zalet zastosowania gatunków rodzaju *Brevibacterium* jest to, że steroid, który poddano dehydrogenacji nie rozkłada się w czasie trwania procesu, jak również nie powstają niepożądane produkty uboczne. Również nieprzereagowany substrat nie ulega rozkładowi, w związku z czym jest łatwo odzyskiwany i może być użyty do ponownej reakcji, co zapewnia dobrą wydajność produktu.

Ze względu na to, że w czasie dehydrogenacji steroid nie ulega rozkładowi można więc substrat stosować w wysokich stężeniach rzędu do 50 g/l hodowli bakterii, bez istotnego wpływu na czas i wydajność transformacji. Proces ten jest korzystny jeszcze z tego powodu, że istnieje możliwość wprowadzenia substratu albo do podłoża hodowlanego drobnoustrojów albo do zawiesiny komórek bakteryjnych. Zawiesinę taką przygoto-

wuje się w wodzie lub w roztworze buforowym cytrynianu, co ułatwia wydzielenie produktu końcowego.

W sposobie według wynalazku steryd z szeregu pregnenu poddaje się działaniu enzymów typu dehydrogenaz w hodowli bakterii rodzaju *Brevibacterium*. Hodowlę tę uzyskuje się hodując drobnoustroje 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.

Steryd poddawany procesowi dehydrogenacji powinien być w ścisłym kontakcie z komórkami bakterijnymi w podłożu hodowlanym albo w zawiesinie tych komórek w płynnej fazie jak na przykład w wodzie lub w roztworze buforowym. Komórki bakteryjne uprzednio homogenizuje się.

Do hodowli bakteryjnej steryd dodaje się w postaci zawiesiny w wodzie albo w postaci roztworu w rozpuszczalnikach takich jak metanol, aceton, dwumetyloformamid, lub w postaci suchej, drobnosproszkowanej substancji. Wskazane jest, aby steryd był silnie rozdrobniony, co umożliwia maksymalny kontakt ze środowiskiem dehydrogenującym.

W czasie trwania procesu miesza się dokładnie hodowlę w celu zapewnienia odpowiedniego kontaktu między sterydem, a fazą zawierającą bakterie i enzymy dehydrogenujące lub tylko same enzymy.

Podczas procesu konieczne jest również doprowadzanie tlenu do hodowli w czasie całego przebiegu procesu oraz niedużych ilości środka przeciwpianowego.

Dehydrogenacja przebiega w szerokim zakresie temperatur od 15–40°C i przy wartości pH = 5–7,5.

Proces według wynalazku przebiega również z takim samym skutkiem jeżeli steryd podda się działaniu samych tylko enzymów wytworzonych przez wyżej wymienione drobnoustroje. Enzymy te można otrzymać albo z podłoża fermentacyjnego albo z komórek bakteryjnych, stosując w tym celu ogólnie znane metody. W tym przypadku steryd poddaje się działaniu wyizolowanych enzymów w odpowiedniej fazie płynnej jak na przykład w wodzie albo w roztworze buforowym cytrynianu.

Po skończonym procesie dehydrogenacji produkt końcowy odzyskuje się przez ekstrakcję rozpuszczalnikami nie mieszącymi się z wodą jak na przykład: chloroform, chlorek metylenu, butanol, octan etylu, metylo-izo-butyloketon itp. Ekstrakt zawierający steryd odparowuje się i następnie oczyszcza przez rekrystalizację z rozpuszczalników jak na przykład: metanolu, acetonu, dwumetyloformamidu lub innych, przyjętymi metodami na przykład chromatografii kolumnowej. Sterydy o małej rozpuszczalności użyte do dehydrogenacji można odzyskiwać przez sączenie lub wirowanie.

Procesowi dehydrogenacji w pozycji 1 poddaje się różnorodne sterydy serii pregnenu, szczególnie Δ_4 -ketopregneny takie, jak na przykład pregnen -4, 17 alfa-21-diol-3,20-dion, pregnen-4,11 beta, 17 alfa,

21-triol-3,20-dion, 21 octan pregnen-4,17 alfa-21-diol-3,11,20-trionu, pregnen-4-3,20-dionu ich analogi podstawione w różnych pozycjach grupami hydroksylowymi lub metylowymi, ich halogenopochodne oraz ich 21 estry.

Proces według wynalazku jest specjalnie korzystny dla 21 estrów sterydów, ponieważ estry te ulegają podczas procesu równocześnie dehydrogenacji i hydrolizie. Pozwala to ominąć ewentualną hydrolizę, którą trzeba by przeprowadzić metodami chemicznymi.

Niżej podane przykłady wyjaśniają dokładnie sposób według wynalazku.

Przykład I. Szczep *Brevibacterium fascum* na dobrze wyrośniętym skosie agarowym służy do zaszczerpienia zawartości pięciu kolb stożkowych o pojemności 500 ml, zawierających po 50 ml bulionu odżywczego. Po 24 godzinach inkubacji na wytrząsarce „alternatywnej” w temperaturze 28°C przeszczepia się kulturę do tanku zawierającego 100 l. podłoża o zawartości:

peptonu 50 g
ekstraktu drożdżowego 70 g
wody wodociągowej 100 l.

pH po sterylizacji 6,8 lub 7,0

Pożywkę sterylizuje się w tanku w 120°C w ciągu 20 minut pod ciśnieniem 1 atm. Wzrost bakterii prowadzi się przy stałym mieszaniu (250 do 300 obrotów na minutę) i napowietrzaniu (0,6 l/minutę/l hodowli). Po 24 godzinach wzrostu dodaje się do hodowli 1 kg pregnen-4, 11 beta, 17 alfa, 21-triol-3,20-dionu w postaci zawiesiny wodnej. Przebieg transformacji sprawdza się chromatograficznie metodą cienkowarstwową.

Po około 25 godzinach następuje całkowita przemiana pregnen-4,11 beta, 17 alfa, 21-triol-3,20-dionu do pregnadien-1,4-11 beta, 17 alfa, 21-triol-3,20-dionu.

Produkt odzyskuje się na drodze ekstrakcji ketonem metyloizobutylovym, zateża się i rekrystalizuje z metanolu. Otrzymuje się 895 g białego produktu, którego charakter fizyko-chemiczny odpowiada próbce standardu prednisolonu.

Przykład II. Kulturę szczepu *Brevibacterium vitarumen* otrzymaną podobnie jak w przykładzie I odwirowuje się. Następnie komórki bakterii zawiesza się w 50 l roztworu buforowego cytrynianu i wprowadza się 250 g 9-alfa-fluoro-16 alfa-hydroksy hydrocortizonu rozpuszczonego w dwumetylo-formamidzie. Po 12 godzinach procesu dehydrogenacji, który zachodzi przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu (jak w przykładzie I) stwierdza się chromatograficznie zanik substancji wyjściowej. Produkt ekstrahuje się ketonem metylo-izo-butylovym, ekstrakty zateża się do minimalnych objętości, oziębia się do temperatury 0°C, filtruje się i przemywa na zimno acetonem. Po wysuszeniu otrzymuje się 230 g produktu, którego widmo w podczerwieni jest zgodne z widmem wzorca pregnadien-1,4,9 alfa -fluoro, 11 beta, 16 alfa 17 alfa, 21-tetraol-3-onu.

Przykład III. Do 100 l kultury szczepu *Brevibacterium protophormiae* otrzymanej podobnie jak w przykładzie I dodaje się 2,5 kg octanu preg-

nen-4, 17 alfa-21-diol-3,11,20-trionu w zawiesinie wodnej. Po 20 godzinach procesu dehydrogenacji, który zachodzi przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu jak w przykładzie I, stwierdza się chromatograficznie zanik substancji wyjściowej i powstały pregnadien-1,4, 17 alfa-21-diol-3,11,20-trion. Produkt oddziela się od hodowli bakterii na drodze filtracji przez ziemię okrzemkową (Hyflo). Przesącz zawiera jeszcze steryd w ilości 250 mg/l.

Otrzymaną masę suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem i rozpuszcza w dwumetyloformamidzie w temperaturze 45°C. Produkt rozpuszczony w dwumetyloformamidzie odbarwiany jest węglem, a potem przy wolnym mieszaniu wprowadza się 6 objętości wody na 1 objętość rozpuszczalnika i całość oziębia się do temperatury 0°C w ciągu 8 godzin. Wykryształizuje biały produkt, który odsącza się i suszy. Po wysuszeniu produkt ten posiada charakterystykę fizyko-chemiczną pregnadien-1,4, 17 alfa-21-diol-3,11,20-trionu.

Przykład IV. Do 100 l kultury Brevibacterium fascum otrzymanej podobnie jak w przykładzie I dodaje się 1 kg pregnen-4-3,20-dionu (dokładnie rozrobnionego) w zawiesinie wodnej. Po 22 godzinach procesu dehydrogenacji, który zachodzi przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu jak w przykładzie I, chromatograficznie stwierdza się zanik substancji wyjściowej. Produkt wydziela się na drodze filtracji przez ziemię okrzemkową (Hyflo). Otrzymaną masę suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem, po czym rozpuszcza w

metanolu. Roztwór metanolowy odbarwia się węglem aktywnym. Po przesączeniu odbarwionego roztworu metanol odparowuje się, oziębia do +4°C w ciągu 10 godzin. Wykryształizowuje osad, który odsącza się i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. Po wysuszeniu produkt ten posiada cechy charakterystyczne dla pregnadienu-1,4-3,20-dionu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania pochodnych 3-keto- $\Delta_{1,4}$ -pregnadienu na drodze mikrobiologicznej dehydrogenacji sterydów **znamienny tym**, że pregnen-4,17 alfa-21-diol-3,11,20-trion, pregnen-4,11 beta, 17 alfa, 21-triol-3,20-dion, lub halogeno-pochodne tych związków, lub hydroksy-pochodne tych związków zawierające grupy hydroksylowe w innych pozycjach, albo estry 21 tych związków poddaje się dehydrogenacji w pozycji 1 za pomocą kultury mikroorganizmów rodzaju Brevibacterium lub enzymów produkowanych przez te drobne ustroje.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako mikroorganizm stosuje się Brevibacterium protophormiae.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako mikroorganizm stosuje się Brevibacterium fuscum.
4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako mikroorganizm stosuje się Brevibacterium vitarumen.