



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231 651

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 16 08 60  
(21) PV 5072-60

(51) Int. Cl.<sup>1</sup>  
C 12 P 33/04

(40) Zveřejněno  
(45) Vydáno 01 05 86

(75)  
Autor vynálezu

HANČ OLDŘICH RNDr.ing.,  
ČAPEK ALOIS ing.,  
TADRA MILAN ing., PRAHA

(54)

Způsob výroby prednisonu

Vynález se týká způsobu výroby prednisonu mikrobiální dehydrogenací kortizonu enzymovým systémem mikroorganismu *Mycobacterium flavum* v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou.

Vynález se týká způsobu výroby prednisonu mikrobiální dehydrogenací kortisonu.

Vedle kortikoidních hormonů kortisonu a kortisolu uplatňují se v poslední době v terapeutické praxi některé deriváty těchto hormonů, připravené syntetickou cestou. Mezi nimi získal přednostní postavení zejména prednison, 1-dehydroderivát kortisonu. Zatímco se u kortisonu a kortisolu projevuje vedle protizánětlivého a glykotropního účinku ještě i jistá míra mineralotropní aktivity, nemá prednison tento vedlejší účinek. Jediným pozorovaným vedlejším účinkem prednisonu /a také kortisonu a kortisolu/ je stimulace žaludeční sekrece, takže je kontraindikován u případů se sklonem k žaludečním vředům.

Prednison lze připravit z různých pregnanových derivátů, buď čistě synteticky postupy, kterými se do molekuly vhodného výchozího steroidu zavádí bromací a dehydrobromací konjugovaný systém 3-keto-1,4-dienový, nebo se u výchozích 3-keto-4-pregnů zavede další konjugovaná vazba do polohy 1-2 dehydrogenací  $\text{SeO}_2$ .

Další skupinu metod, vhodných pro zavedení druhé dvojné vazby do molekuly steroidu v poloze 1-2, tvoří mikrobiální dehydrogenace.

K tomuto účelu bylo již použito enzymových systémů různých mikroorganismů, např. *Calonectria decora*, *Didymella lycopersici*, *Nocardia globerula* a *N. opaca*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium simplex*, *Mycobacterium phlei* apod.

Když jsme zkoušeli dehydrogenační účinnost uvedených kmenů na molekule kortisonu, zjistili jsme, že některé kmeny jednak provádějí četné vedlejší reakce včetně hydroxylací do ne-

žádoucích poloh, jednak transformují kortison v prednison jen při jeho velmi nízké koncentraci v mediu a za poměrně dlouhou dobu. U některých druhů dokonce dehydrogenace v žádaných polohách vůbec neprobíhala.

Z tohoto důvodu jsme se pokusili použít pro dehydrogenační transformace steroidů v poloze 1-2 vlastních izolátů, získaných ze zahradní půdy. Podařilo se nám nalézt nový kmen, který provádí uvedenou dehydrogenaci velmi rychle a s vysokým výtěžkem, při dosti vysoké koncentraci výchozího steroidu v mediu.

Kmen izolovaný ze zahradní půdy jsme identifikovali jako *Mycobacterium flavum*. Morfologicky jde o krátké tyčinky délky 3-7  $\mu$ , nepravidelně se větvící, které ve starších kulturách přecházejí do formy koků. Kultury nejsou acidoresistentní, barví se pozitivně podle Grama. Mikrob ztekucuje želatinu jen velmi nepatrně, mléko peptonizuje a nevytváří indol; zkvašuje glukosu a maltosu bez tvorby plynů, sacharosu invertuje velmi pomalu. Optimální pH pro jeho kultivaci je 6,7 až 8,2 při teplotě 25 až 30 °C. Mikrob velmi dobře roste na sladinném a masopeptonovém agaru.

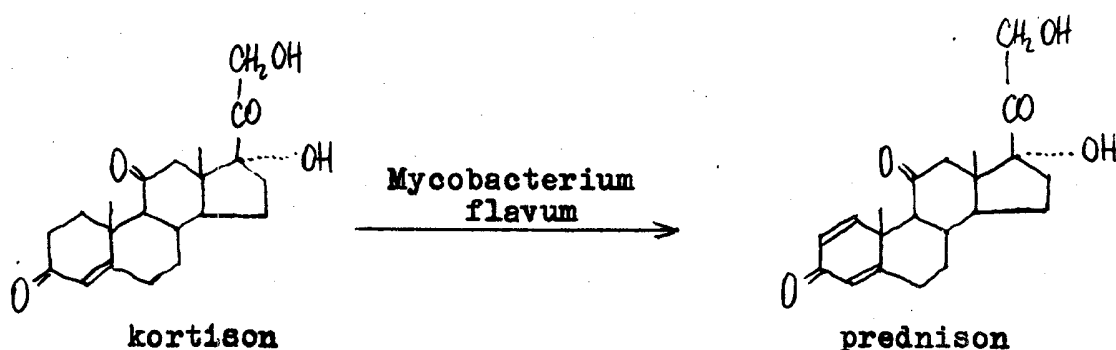
Předmětem vynálezu je způsob přípravy prednisonu mikrobiální dehydrogenací kortisonu v tekutém živném prostředí na bázi dusíkatých živin a minerálních živných solí, popř. ve vodě, za větrání a míchání, s následující extrakcí reakčního produktu organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, jehož podstata záleží v tom, že se kortison, rozpuštěný v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou, jako methanolu, podrobí mikrobiální dehydrogenaci enzymovým systémem mikroorganismu *Mycobacterium flavum*.

Nejvýhodněji se postupuje tak, že se použije enzymového systému mikroorganismu *Mycobacterium flavum*, izolovaného z povrchové kultury, přičemž se dehydrogenace provádí při teplotě 25 až 30 °C a při pH 6,2 až 7,0 v prostředí tlumivého roztoku, s výhodou fosfátového.

Při zpracování této metody byla po kultivaci mikroba na půdách obsahujících kukuřičnou máčecí vodu nebo na bujono získána mikrobiální hmota, která prováděla transformace ať již v původním mediu, nebo po oddělení mikrobiálních buněk v tlumivém roztoku, nebo ve vodě při pH 6,5 až 7,0, po přidání alkoholického roztoku kortisonu. V těchto případech byla však pozorována též tvorba redukčního produktu, svědčící o současné redukci vzniklého prednisonu v poloze 20 v příslušný 20  $\beta$ -hydroxyderivát.

Provedli jsme řadu pokusů k zamezení nebo potlačení této vedlejší reakce. Byly zkoušeny různé inhibitory redukčních procesů, soutěživé akceptory vodíku apod., avšak nepodařilo se dosáhnout podstatného snížení tvorby redukčního produktu. V případech, kdy bylo pozorováno snížení vzniku vedlejšího produktu, nastávalo také zpomalení průběhu dehydrogenace v poloze 1-2 steroidního skeletu.

Velmi podstatné potlačení redukce prednisonu v poloze 20 se podařilo teprve tehdy, když byla k dehydrogenaci použita kultura mikroba, vypěstovaná na agarové půdě za klidových podmínek a smytá vodou nebo tlumivým roztokem. Takto získané mikrobiální suspenze bylo použito k transformaci kortisonu za submersních nesterilních podmínek. Při koncentracích kortisonu 0,2 až 0,6 % v mediu probíhala jeho přeměna v prednison ve výťažku 80 až 90 %.



#### Příklad 1

Do 20 l fermentoru se připraví 10 litrů živné půdy, obsahující 1 % corn-steepu, 0,1 %  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,1 %  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  /pH 6,8

až 7,0/, která se po vysterilování zaočkuje kulturou kmene *Mycobacterium flavum*. Submerzní kultivace probíhá při 30 °C a trvá 17 až 20 h. Pak se ke kultuře přidají 4 g kortisonu ve 200 ml methanolu a dále se fermentuje za stejných podmínek po dobu 5 h. Průběh transformace se při fermentaci sleduje polarograficky, pokud jde o obsah kortisonu a kolorimetricky, pokud jde o prednison a jeho 20 $\beta$ -hydroxyderivát. Po skončené fermentaci se obsah fermentoru okyselí koncentrovanou HCl na pH 3,0 až 3,5 a po filtraci extrahuje ethylendichloridem. Extrakt po odstranění rozpouštědla se zpracuje o sobě známým způsobem krystalizací a získá se 2,75 g prednisonu.

#### Příklad 2

Kultura *Mycobacterium flavum* na sladinném agaru ze 3 Houleových nádob se smyje 1 litrem vody se skleněnými kuličkami a suspenze se vlije do 9 litrů fosfátového tlumivého roztoku /pH 6,8/ v laboratorním fermentoru obsahu 20 litrů. Za míchání a větrání se k tomuto roztoku přidají 4 g kortisonu ve 200 ml methanolu, teplota se udržuje na 30 °C po dobu 12 h. Fermentace steroidu se kontroluje stejně jako v příkladu 1. Po skončené fermentaci se provede extrakce po předchozím okyselení a filtrací do ethylendichloridu a po odpaření rozpouštědla se krystalizací získá 3,28 g predisonu t.t. 230 °C,  $[\alpha]_D^{20} = + 170^\circ$  /dioxan/.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

231 851

1. Způsob výroby prednisonu mikrobiální dehydrogenací kortisonu v tekutém živném prostředí na bázi dusíkatých živin a minerálních živných solí, popř. ve vodě, za větrání a míchání, s následující extrakcí reakčního produktu organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou, vyznačující se tím, že se kortison, rozpuštěný v organickém rozpouštědle mísitelném s vodou, jako methanolu, podrobí mikrobiální dehydrogenaci enzymovým systémem mikroorganismu *Mycobacterium flavum*.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se použije systému mikroorganismu *Mycobacterium flavum*, izolovaného z povrchové kultury.
3. Způsob podle bodu 2 vyznačující se tím, že se dehydrogenace provádí při teplotě 25 až 30 °C a při pH 6,2 až 7,0 v prostředí tlumivého roztoku, s výhodou fosfátového.