



Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 21.V.1968 (P 127 074)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 20.VII.1972

Kl. 12 o, 25/04

MKP C 12 d 13/08

CZYTELNIA

UKD
Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórca wynalazku: Zdzisław Zakrzewski

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

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

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania związków $\Delta^{1,4}$ -3-ketosteroidowych szeregu androstanu przez uwodornienie na drodze enzymatycznej odpowiednich substratów. Związki te są cennymi środkami leczniczymi lub stanowią produkty pośrednie do ich wytwarzania.

Znany z opisu patentowego nr 56 331 sposób dehydrogenacji sterydów w pozycji 1 polega na zastosowaniu sp. C-9, zarówno w postaci rozwijającej się hodowli, w postaci zawiesiny odsączonych i przemytych komórek jak i preparatów enzymatycznych otrzymanych z tych mikroorganizmów. Jako „preparaty enzymatyczne” należy rozumieć opisane w literaturze produkty 1,2-dehydrogenujące steroidy uzyskane z innych mikroorganizmów, a mianowicie zliofilizowane komórki *Nocardia corallina*, wysuszone powietrznie komórki *Corynebacterium simplex*, zamrożone komórki *Septomyxa affinis*, zamrożone zarodniki *Septomyxa affinis*.

Zgodnie z istniejącym stanem techniki w celu sporządzenia tych preparatów we wszystkich tych przypadkach przeprowadza się hodowlę mikroorganizmu na stosownym podłożu wzrostowym, po czym oddziela się od niego materiał zawierający Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową przez odwirowanie komórek wegetatywnych lub obmycie zarodników wodą a następnie utrwalą się produkt przez odwodnienie, za pomocą liofilizacji lub wysuszenia na powietrzu, bądź też zamrożenie.

Produkty powyższe cechuje wybitnie krótki

2

okres trwałości. Otrzymanie trwałego preparatu enzymatycznego zawierającego Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową natrafia na podstawową trudność wynikającą z faktu szczególnej wrażliwości tego układu enzymatycznego na czynniki dezorganizujące czy denaturujące, takie jak wpływ podopływalnej temperatury lub pH, liza fizyczna, oddziaływanie mechaniczne czy dłuższy czas przechowywania. I tak komórki *Corynebacterium simplex* stosowane są bezpośrednio po przygotowaniu, komórki *Septomyxa affinis* utrzymują aktywność przez trzy tygodnie a zarodniki przez osiem tygodni. Dla zliofilizowanych komórek z *Nocardia corallina* okres trwałości nie jest znany, jednakże wysoki koszt produkcji w tym przypadku odbiera tej metodzie charakter przemysłowy.

Dotychczasowe niepowodzenia w uzyskiwaniu w sposób łatwy i tani metodą przemysłową trwałego produktu enzymatycznego Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej o charakterze zarówno odczynnikowym jak i surowca do zastosowań produkcyjnych skłaniają do używania w badaniach naukowych i w praktyce przemysłowej jako źródła Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej hodowli mikroorganizmu względnie wydzielonych z podłoża i bezpośrednio użytych komórek. Zgodnie np. z opisem patentu 56 331 po okresie inkubacji dodaje się do hodowli pleśniaków 1,2-dwuhydrosteryd i poddaje się go działaniu tej hodowli.

Po zakończeniu procesu mieszaninę zazwyczaj

ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym. Można również mieszaninę przesączyć lub odwirować, przesącz poddać ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym, a wydzieloną biomasę ewentualnie zawrócić do następnej szarży produkcyjnej, przy czym biomasa może być wykorzystana w ten sposób nie więcej niż parę razy.

Sposób ten wymaga każdorazowego przygotowania hodowli mikroorganizmu przed przeprowadzeniem procesu dehydrogenacji, co jest kłopotliwe, głównie z uwagi na konieczność zatrudnienia specjalnie przeszkolonego personelu mikrobiologicznego i potrzebę instalowania specjalnej aparatury (trzęsawek) w osobnych pomieszczeniach termostatowych oraz konieczność utrzymania warunków jałowych, a poza tym czasochłonne ze względu na długi okres inkubacji. Warunki jałowe muszą być również zachowane w czasie samej dehydrogenacji, gdzie zachodzi możliwość zakażenia hodowli np. w chwili pobierania próbek kontrolnych lub przy silnym pienieniu się mieszaniny.

W sposobie tym w czasie dehydrogenacji następuje zazwyczaj silne pienienie się, co uniemożliwia pełne wykorzystanie pojemności fermentora, a ponadto zmusza do używania środków przeciwpienionych, utrudniających wyodrębnienie produktu. W czasie wyodrębniania produktu za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym występuje w silnym stopniu niekorzystne zjawisko tzw. interfazy, czyli tworzenia się emulsji. Wreszcie mieszanina, w której zachodzi dehydrogenacja, wykazuje zazwyczaj silne zabarwienie, w związku z czym otrzymanie produktu bezbarwnego napotyka na trudności.

Poza tym podczas transformacji prowadzonej w warunkach hodowli z reguły występuje wielokierunkowa przemiana substratu a to przez zachodzenie reakcji równoległych czy następczych w wyniku sukcesywnego indukowania przez rozwijający się w warunkach hodowli mikroorganizm nowych układów enzymatycznych.

Ze względu na to, że każda hodowla mikroorganizmu w każdej pojedynczej kolbie czy tanku fermentacyjnym stanowi oddzielną, niezależnie się rozwijającą jednostkę biologiczną i ulega wpływom wszystkich zmiennych warunków zewnętrznych, w zasadzie niemożliwe jest osiągnięcie przy jej użyciu całkowitej powtarzalności wyników i ich porównywalności, dostępnej dopiero po nadaniu enzymowi charakteru odczynnikowego.

Poza tym niemożliwe jest bezpośrednie przenoszenie wyników ze skali mniejszej (kolb) do większej (tanków) m. in. z uwagi na niewykonalność pomiaru efektu napowietrzania czy mieszania w kolbach, służących do prowadzenia hodowli mikroorganizmu.

Niemożliwe jest także w tym przypadku zmniejszenie skali badawczej poniżej pewnego poziomu, warunkującego prawidłowy rozwój hodowli podpowierzchniowej, a tym samym poprawienie bilansu zużycia bardzo na ogół kosztownych wyjściowych produktów sterydowych.

Okazało się, że wszystkich wymienionych ujemnych skutków znanych metod można uniknąć, jeżeli zamiast hodowli mikroorganizmu w procesie

dehydrogenacji sterydów w pozycji 1 zastosuje się preparat enzymatyczny otrzymany z pleśniaków w rodzaju *Cephalosporium* sp. C-9. Wprowadzony według wynalazku sposób utrwalania komórek mikroorganizmu drogą łagodnego i stopniowego odwodnienia wpraw poprzec wyprasowanie nadmiaru wilgoci z biomasy, a następnie wysuszenie korzystnie w warunkach zmniejszonego ciśnienia nad substancją pochłaniającą wodę, taką jak P_2O_5 i w obniżonej temperaturze — zapewnia zachowanie przez komórki pierwotnej aktywności Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej bez jej ubytku w ciągu wielu, co najmniej sześciu, miesięcy.

Istotnym czynnikiem korzystnym dla zachowania wysokiej aktywności przez preparat jest użycie do jego wyprodukowania specjalnie dobranego środka konserwującego w postaci soli sodowej kwasu 2-etyloroteciobenzenokarboksylowego-1. Substancja ta działając wybiórczo z jednej strony nie przejawia wpływu inhibującego na czynność Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej, a z drugiej wykazuje silny wpływ inhibujący na rozwój mikroorganizmów. Chroni ona w ten sposób preparat przed skutkami zakażeń możliwych w czasie manipulacji związanych z jego produkcją i późniejszym stosowaniem, a w tym przed działaniem proteaz rozkładających Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową.

Sposób wytwarzania preparatu może być aktualny i dla innych mikroorganizmów zawierających Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową.

Sposobem według wynalazku otrzymaną w znany sposób biomasa pleśniaka z rodzaju *Cephalosporium* sp. C-9, wykazującą aktywność enzymatyczną w kierunku dehydrogenacji sterydów w pozycji 1, wydziela się z podłoża wzrostowego przez odsączenie lub odwirowanie w momencie, gdy hodowla osiąga najwyższy poziom aktywności.

Istotnym czynnikiem wydzielania jest możliwie dokładne usunięcie resztek podłoża wzrostowego. Następnie biomasę zwiła się rozcieńczonym roztworem wodnym środka konserwującego, takiego jak sól sodowa kwasu 2-etyloroteciobenzenokarboksylowego-1, po czym odciąga się resztę roztworu, np. na sączku bakteriologicznym, wyprasowuje nadmiar wilgoci i suszy w temperaturze około 0° do $+10^\circ C$, korzystnie pod zmniejszonym ciśnieniem i przy użyciu substancji odciągającej wodę, np. pięciotlenku fosforu, aż do uzyskania 10—20% suchej masy w preparacie.

Otrzymany preparat enzymatyczny przechowuje się w szczelnych naczyniach, w chłodni, w opakowaniu zabezpieczonym przed działaniem światła. Preparat może być przechowywany w okresie co najmniej 6 miesięcy bez wyraźnej straty aktywności.

Preparat enzymatyczny otrzymany z pleśniaków z rodzaju *Cephalosporium* sp. C-9, zawieszają w wodzie o temperaturze $24-32^\circ C$, do zawiesiny wprowadzają się przy mieszaniu roztwór lub zawiesinę związku Δ^4 -3-ketosteroidowego szeregu androstanu w możliwie małej ilości rozpuszczalnika organicznego, takiego jak dwumetyloformamid, aceton, metanol, po czym doprowadzają się przy mieszaniu tlen, np. w postaci powietrza i utrzymuje zawartość reaktora w tych warunkach aż do stwier-

dzenia, że ilość produktu dehydrogenacji nie zwiększa się. Następnie proces przerywa się przez zaniechanie napowietrzania i mieszania oraz dodanie rozpuszczalnika organicznego, takiego jak chlorowcoalkan, np. chloroform. Produkt i nieprzereagowany substrat wyodrębnia się w znany sposób.

Proces dehydrogenacji można przyspieszyć dodając odpowiednio większą ilość preparatu enzymatycznego. Tak więc np. przy dehydrogenacji 50 mg 17 α -metyloandrostenu-4-ol-17 β -onu-3 czas przereagowania przy użyciu 1 g preparatu enzymatycznego wynosi 16 godzin, a przy użyciu 5 g preparatu enzymatycznego czas przereagowania do tego samego poziomu przereagowania wynosi tylko 3 godziny.

Przykład. W tanku fermentacyjnym przeprowadzono hodowlę pleśniaka *Cephalosporium* sp. C-9 w znany sposób. Po około 12 godzinach od chwili zaszczipienia tanku, tj. w momencie, gdy hodowla osiągnęła najwyższy poziom aktywności Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej, przerywano inkubację i zawartość tanku przesączono przez filtr bakteryjny Seitza. Po przemyciu wodą pozostała na sączku biomasę pleśniaka zwilżono wodnym 0,01% roztworem soli sodowej kwasu 2-etylotęciotio-benzenokarboksyłowego-1 w ilości 70 ml roztworu na 100 g wilgotnej biomasy i odciągnięto nadmiar roztworu pod zmniejszonym ciśnieniem. Biomasa zdjęta z sączka, zawinięto w trzy warstwy bibuły filtracyjnej twardej, umieszczono pod prasą i wyciśnięto część pozostałego roztworu.

Operację tę powtórzono jeszcze dwukrotnie, przy czym biomasa straciła łącznie około 1/3 swojej pierwotnej wagi, jaką posiadała po odsączeniu i przemyciu środkiem konserwującym. Następnie półsuchą biomasę umieszczono w eksykatorze próżniowym nad pięciotlenkiem fosforu i odciągano powietrze w ciągu 1/2 godziny. Potem eksykator umieszczono w chłodni w temperaturze +4° na okres 48 godzin, a otrzymany preparat enzymatyczny w postaci suchego proszku zawierającego 12,9% suchej masy rozważono do słoików z ciemnego szkła, zaparafinowano korki i przechowywano w chłodni w temperaturze +4°C. Preparat przechowywany w tych warunkach w ciągu 6 miesięcy nie stracił swej pierwotnej aktywności Δ^1 -dehydrogenazy 3-ketosteroidowej.

Część preparatu enzymatycznego rozmieszano starannie z wodą w stosunku 5 części wagowych wody na 1 część wagową preparatu. Otrzymaną zawiesinę przeniesiono do reaktora z wodą o temperaturze 27–29°C w takiej ilości, aby 1 g preparatu przypadał na 30 ml wody i rozpoczęto napowietrzanie i mieszanie zawartości reaktora. Po 5 minutach dodano 20%-wy roztwór metanolowy 17 α -metyloandrostenu-4-ol-17 β -onu-3 w ilości odpowiadającej 59 mg substancji steroidowej na 1 g preparatu enzymatycznego.

Proces prowadzono przy stałym mieszaniu i napowietrzaniu zawartości reaktora w temperaturze

27–29°C w ciągu 16 godzin, przy czym obserwowano co najwyżej nieznaczne pienienie się zawartości. Proces przerywano przez zaniechanie mieszania i doprowadzania powietrza. Mieszaninę poddano wyczerpującej ekstrakcji chloroformem użytym w trzech porcjach, każda w ilości równej połowie objętości mieszaniny, przy czym nie zaobserwowano powstawania emulsji. Połączone ekstrakty przemyciły 1%-wym roztworem kwaśnego węgla sodowego, użytym w stosunku objętościowym do ekstraktu jak 1:1, a następnie dwukrotnie wodą. Z ekstraktu chloroformowego po osuszeniu go nad siarczanem sodowym oddestylowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem.

Pozostałość bez odbarwiania rozpuszczono w etanolu z dodatkiem kwasu octowego, do roztworu dodano odczynnik Girarda T, rozcieńczono wodą, po czym mieszaninę ekstrahowano eterem etylowym. Z ekstraktu eterowego oddestylowano rozpuszczalnik, uzyskując po przekrystalizowaniu pozostałości z etanu etylowego chromatograficznie czysty 17 α -metyloandrostadien-1,4-ol-17 β -onu-3 z wydajnością 70%. Z warstwy wodnej pozostałej po wykryształizowaniu eterem odzyskano nieprzereagowany substrat przez rozłożenie kwasem solnym zawartego w niej hydrazonu i ekstrakcję eterem etylowym (wydajność około 80%).

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania związków Δ^1 -3-ketosteroidowych szeregu androstanu na drodze dehydrogenacji Δ^1 -3-ketosteroidów szeregu androstanu przy użyciu preparatu enzymatycznego z grzybnicy *Cephalosporium* C-9, **znamienny tym**, że z hodowli pleśniaka z rodzaju *Cephalosporium* sp. C-9 wydzielają biomasę pleśniaka, możliwie dokładnie usuwają z niej podłoże wzrostowe, nasycają ją roztworem środka konserwującego, takiego jak sól sodowa kwasu 2-etylotęciotio-benzenokarboksyłowego-1, odciągają resztę roztworu, wyprasowują nadmiar wilgoci, suszą w temperaturze 0–10°C korzystnie pod zmniejszonym ciśnieniem przy użyciu substancji odciągającej wodę, takiej jak pięciotlenek fosforu, aż do uzyskania 10–20% suchej masy w preparacie, po czym otrzymany w ten sposób preparat enzymatyczny zawierający Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową zawiesza się w wodzie o temperaturze 24–32°C i stosuje w znany sposób do dehydrogenacji Δ^1 -3-ketosteroidów przez wprowadzenie do zawiesiny preparatu enzymatycznego roztworu lub zawiesiny związku Δ^1 -3-ketosteroidowego szeregu androstanu w rozpuszczalniku organicznym, takim jak metanol, aceton, dwumetyloformamid, mieszanie i napowietrzanie, po czym mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym, takim jak chlorowcoalkan, np. chloroform, a produkt i nieprzereagowany substrat wyodrębnia się w znany sposób.

Errata

strona 3, łam 5, wiersz 57

jest: 59 mg

powinno być: 50 mg