

2

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

67 681

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 07.I.1969 (P 131 087)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 10.VI.1973

Kl. 12o,25/02

MKP C07c 167/14

CZYTELNIK
UKD
Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: Irena Eysymontt, Wiesław Lewenstein, Wiesława Kotula, Jadwiga Golonka, Jacek Vaedtke

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania $\Delta^{1,4}$ -3-ketonów sterydowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania $\Delta^{1,4}$ -3-ketonów sterydowych metodą mikrobiologiczną z Δ^5 -3-oli sterydowych lub z Δ^4 -3-ketonów sterydowych. Układ $\Delta^{1,4}$ -3-ketonowy jest charakterystyczny dla większości nowych hormonów leków sterydowych o wzmożonej czynności, takich jak prednizon, prednizolon, triamcynolon, deksametazon, fluocinolon i inne.

Wiadomo, że $\Delta^{1,4}$ -3-ketony sterydowe można otrzymać z odpowiednich Δ^5 -3-oli sterydowych poprzez Δ^4 -3-ketony sterydowe w wyniku dehydrogenacji, którą zazwyczaj poprowadzić trzeba dwustopniowo.

W pierwszym etapie dehydrogenacji ulega grupa 3β -hydroksylowa Δ^5 -3-olu sterydowego i powstaje Δ^4 -3-keton sterydowy. Dehydrogenację tę prowadzi się na drodze chemicznej, na przykład metodą Oppenhauera, albo też częściej przy pomocy preparatów enzymatycznych pochodzących z mikroorganizmów. Stosując drożdże względnie *Proactinomyces erythropolis* Mamoli i Vercelone [Ber. 71 B, 1686 (1938)] oraz Turfitt [Biochem. J. 40, 79 (1946)] przeprowadzili tę dehydrogenację w szeregu androstanu. Perlman [Science 115, 529 (1952)] otrzymał progesteron z Δ^5 -pregnen- 3β -ol-20-onu stosując szczepy z rodzaju *Streptomyces*, *Aspergillus niger* i *Phycomyces blakesleeana*, a Ercoli [Boll. sci. facoltà chim. ind. Bologna 279-282 (1940)] tej samej przemiany dokonał przy użyciu *Flavobacterium dehydrogenans*. Mamoli [Ber. 72, 1863

2

(1939)] otrzymał dezoksykortikosteron stosując *Corynebacterium mediolanum*, a Protiva (opis patentowy ČSSR nr 110 080) uzyskał substancję S Reichsteina stosując *Flavobacterium fulvum* oraz *Flavobacterium bucalis*.

W drugim etapie w wytworzonym Δ^4 -3-ketonie sterydowym dehydrogenacji ulega wiązanie 1,2 i powstaje $\Delta^{1,4}$ -3-keton sterydowy. Dehydrogenację tę prowadzi się na drodze chemicznej, stosując na przykład dwutlenek selenu lub niektóre chinony, takie jak dwucyjanodwuchlorochinon, albo też w sposób bardziej selektywny i z większą wydajnością przy pomocy mikroorganizmów, takich jak *Flavobacterium fulvum*, *Corynebacterium simplex*, *Fusarium solani*, *Pseudomonas* sp. 125, *Nocardia restrictus*, a także według opisu patentowego nr 56 331 za pomocą *Cephalosporium* sp. C-5 oraz *Cephalosporium* sp. C-9.

$\Delta^{1,4}$ -3-ketony sterydowe uzyskiwano również bezpośrednio z Δ^5 -3-oli sterydowych przy użyciu niektórych mikroorganizmów. Tak więc Visser i Wettstein [Experientia 9, 371 (1953)] do przemiany dehydroepiandrosteronu i pregnenolonu w $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,17-dion zastosowali *Fusarium solani* i *Fusarium caucasicum*, a Charney, Nobile i inni [Tetrahedron 18, 591 (1962)] stosując *Corynebacterium simplex* ATCC 6946 z 5-androsten- 3β ,17 β -diolu uzyskali $\Delta^{1,4}$ -androstadien-17 β -ol-3-on w mieszaninie z $\Delta^{1,4}$ -androstadien-3,17-dionem i z Δ^4 -androsten-3,17-dionem w stosunku wagowym

3:1:1, a z 5-pregnen-3 β ,17 α ,21-triol-20-onu 3,21-octanu uzyskali mieszaninę substancji S Reichsteina i Δ^1 -pochodnej substancji S. Jak wynika z powyższego reakcja nie przebiega jednokierunkowo przy czym, jak podano, wydajność procesu jest niewielka.

Sposób według wynalazku polega na zastosowaniu enzymów wytwarzanych przez nieznany dotąd i nieopisany w literaturze szczep *Cephalosporium* sp. X-1. Zastosowanie tego szczepu umożliwia otrzymanie $\Delta^{1,4}$ -3-ketonów sterydowych z Δ^4 -3-ketonów sterydowych oraz bezpośrednio z Δ^5 -3-oli-steroidowych w reakcji jednokierunkowej i przy dobrej wydajności.

Według wynalazku Δ^5 -3-ol-steroidowy lub Δ^4 -3-keton sterydowy poddaje się działaniu hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. X-1, zawiesinie grzybni tego mikroorganizmu w wodzie z ewentualnym dodatkiem substancji buforowych, lub otrzymanymi z tego mikroorganizmu preparatami enzymatycznymi w obecności tlenu powietrza sposobem konwencjonalnym, po czym otrzymany $\Delta^{1,4}$ -3-keton sterydowy wyodrębnia się i oczyszcza w znany sposób.

Szczep *Cephalosporium* sp. X-1, opracowany w Pracowni Mikrobiologicznej Instytutu Farmaceutycznego na drodze selekcji z dzikiego szczepu macierzystego wyizolowanego z gleby, można inkubować w temperaturze od 20° do 30°C. Najszybszy wzrost osiąga się w temperaturze 26° do 30°C. Szczep charakteryzuje się wytwarzaniem synnemata, które w ogólnym pokroju kształtem przypominają korzeń pietruszki. Od strzępek tworzących synnemata i grzybni podstawowej prostopadle wyrastają konidiofory przeważnie nie podzielone. Konidiofory z podziałem spotyka się rzadko. Obserwowano również konidiofory rozgałęzione. Na delikatnie zwężających się ku szczytowi konidioforach występują zarodniki zlepione mulistą substancją tworząc charakterystyczne główki. W starszych hodowlach główki zarodników zlewają się w bezkształtną masę.

Hialinowe zarodniki wytwarzane są egzogenicznie i mają kształt owalny, gładką powierzchnię. Barwnik wytwarzany jest w bardzo małych ilościach i daje słabe cieliste zabarwienie hodowli. Dyfuzji barwnika do podłoża nie obserwowano. Na podłożach powszechnie stosowanych dla grzybów szczep rośnie w postaci kolistych kolonii pokrytych delikatną grzybnią powietrzną. Intensywność wzrostu i zarodnikowania zależy od rodzaju podłoża.

Na podłożu Czapek-Doxa z sacharozą uzyskuje się wzrost słaby, kolonie są szarawo-białe, prawie przezroczyste, grzybnia powietrzna bardzo słabo rozwinięta. Synnemata występują rzadko i składają się z kilku strzępek. Konidiofory przeważnie bez podziału lub bardzo rzadko podzielone. Konidia o wymiarach 4–6 μ na 2–4 μ tworzą główki o średnicy 6,25 μ . Długość konidioforów 12,5 μ .

Na agarze ziemniaczanym wg Waksmana wzrost jest znacznie obfitszy i szybszy. Kolonie kolistе o lekko cielistym zabarwieniu. Grzybnia podstawowa obfita i dobrze rozwinięta. Grzybnia powietrzna krótka. Synnemata nieliczne, małe ale typowe w kształcie korzenia pietruszki. Zarodniki o wymiarach 3–4 μ na 2,5–4 μ na konidioforach tworzą główki o średnicy 7,5–10 μ . W starszych (siedmiodniowych) hodowlach główki zlewają się tworząc bardzo obfitą bezkształtną masę zarodników.

Na agarze owsianym kolonie lekko cieliste, grzybnia podstawowa delikatna, powierzchnia słabo rozwinięta. Bardzo dużo pionowych konidioforów zakończonych główkami (zarodników), które w miarę powiększania się łączą się po kilka ze sobą. Synnemata występują rzadko i są bardzo cienkie. Konidiofory bywają różnej długości (do 25 μ) bez podziałów i delikatnie zwężają się w kierunku główki. Zdarzają się nieliczne konidiofory rozgałęzione. Konidia owalne o wymiarach 3–4 μ na 2–3 μ . Średnica główek 7–10 μ .

Szczep ten na płynnych podłożach hodowlanych wytwarza dwie dehydrogenazy: 1,2 dehydrogenazę i Δ^4 -3-hydroksysterydową. Aktywne obydwie dehydrogenazy uzyskuje się w hodowlach szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 na podłożach zawierających źródło węgla, azotu i sole mineralne. Źródłem węgla mogą być węglowodany, na przykład glukoza, sacharoza, maltoza, laktoza i podobne. Jako źródło azotu można stosować na przykład pepton, ekstrakt mięsny, namok kukurydziany, mąkę sojową, hydrolizat kazeiny, ekstrakt drożdżowy i nieorganiczne związki azotu. Składniki mineralne mogą być w postaci soli szczególnie fosforanów i siarczanów sodu, potasu, żelaza i magnezu.

Różnice między szczepem *Cephalosporium* sp. X-1 i szczepami *Cephalosporium* sp. C-5 i *Cephalosporium* sp. C-9 najbardziej zbliżonymi morfologicznie i stosowanymi według opisu patentowego nr 56 331 do dehydrogenacji w pozycji 1–2 związków sterydowych, wynikają z następujących zestawień:

Tablica

Nazwa podłoża	Szczep X-1	Szczep C-9	Szczep C-5
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	Wzrost hodowli słaby. Kolonie o zabarwieniu szarawo-białym, prawie przezroczyste. Grzybnia powietrzna bardzo słabo rozwinięta.	Wzrost hodowli dobry. Kolonie białe zabarwiające się na kolor różowo-łososiowy. Grzybnia powietrzna biała, krótka wzniesiona.	Wzrost hodowli dobry. Kolonie kremowe. Grzybnia powietrzna biała, krótka, spleciona, silnie rozgałęziona.

Nazwa podłoża	Szczep X-1	Szczep C-9	Szczep C-5
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	Konidiofory przeważnie bez podziału lub bardzo rzadko podzielone, nie dłuższe niż 12,5 μ . Konidia o wymiarach 4—6 μ na 2—4 μ , owalne.	Konidiofory kształtu butelki, średnica podstawy 3—5 μ i 2,5—3,5 μ . Konidia owalne, elipsoidalne lub łódkowate, wymiary 7—10 μ na 3—4 μ .	Konidiofory długości 10—60 μ . Konidia owalne, elipsoidalne o wymiarach 4—10 μ na 2,3—4 μ zawierają drobne granulki o charakterze lipoidalnym.
Agar ziemniaczany wg Waksmana	Wzrost dość obfity, szybszy niż na Czapek-Doxie. Kolonie o lekko cielistym zabarwieniu. Grzybnia podstawowa obfita, dobrze rozwinięta. Grzybnia powietrzna krótka.	Wzrost dobry. Kolonie różowo-łososiowe. Grzybnia podstawowa wrastająca w podłoże tworzy pętle. Grzybnia powietrzna w kolorze łososiowym, gęsta, krótka w postaci igiełek.	Wzrost dobry. Kolonie białe. Grzybnia podstawowa tworzy obrzeżenie kolonii. Grzybnia powietrzna biała w postaci rzadkich, długich, wzniesionych igiełek.
Agar owsiany	Kolonie o zabarwieniu lekko-cielistym. Grzybnia podstawowa delikatna. Grzybnia powietrzna słabo rozwinięta. Konidia owalne o wymiarach 3—4 μ na 2—3 μ .	Kolonie brudno-różowe. Grzybnia podstawowa różowa, nieregularnie rozgałęziona. Grzybnia powietrzna w postaci kilku strzępek na środku kolonii. Konidia mogą być elipsoidalne, łódkowate o wymiarach 7—17 μ na 2,5—4 μ . Cytoplazma drobno granulowana.	Kolonie bezbarwne z wyraźnie zaznaczonym środkiem. Grzybnia podstawowa bezbarwna. Grzybnia powietrzna słabo rozwinięta, występuje tylko na środku kolonii. Konidia mogą być elipsoidalne o wymiarach 6—12 μ na 2—3 μ . Cytoplazma w równych granulach.

Hodowlę szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 prowadzi się znanymi sposobami, np. na płynnym podłożu, na trzęsawce wahadłowej, przy 110 wychyleniach na minutę i długości posuwu 8,5 cm w temperaturze od 20° do 30°C, a najlepiej w 28°C w czasie od 16 do 24 godzin. Substrat można dodawać w formie krystalicznej, mikronizowany, w postaci roztworów lub zawiesin w rozpuszczalniku, którym może być np. etanol, metanol, aceton lub dwumetyloformamid. Steryd można dodawać do pożywki w czasie szczepienia, można wprowadzać do wyrosniętej hodowli lub do zawieszonej w wodzie lub buforze grzybni lub zarodników szczepu *Cephalosporium* sp. X-1.

Po zakończeniu transformacji, co można stwierdzić chromatograficznie, brzczkę przerabia się znanymi sposobami, np. ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym, na przykład dwuchlorometanem, chloroformem lub octanem butylu. Ekstrakt odwadnia się siarczanem sodowym i odparowuje pod próżnią. Wydzielanie produktu (Δ^1 -pochodnych substratów sterydowych) i ich oczyszczanie można prowadzić w zwykły sposób na przy-

kład stosując chromatografię kolumnową, krystalizację i tym podobne.

Jako preparat enzymatyczny można stosować preparat otrzymany w znany sposób, np. przez namnożenie hodowli *Cephalosporium* sp. X-1 na odpowiednim podłożu wzrostowym, oddzieleniu od niej materiału zawierającego $\Delta^{1,4}$ -dehydrogenazę 3-ketosterydową, odmyciu wodą pozostałości pożywki, a następnie usunięciu wody z produktu drogą liofilizacji. Preparat ten można użyć bezpośrednio, albo też po dodaniu środków konserwujących przechować w niskiej temperaturze, po czym preparat może być zastosowany w odpowiednim czasie.

Wydażność otrzymywania $\Delta^{1,4}$ -3-ketonów sterydowych przy użyciu *Cephalosporium* sp. X-1 według wynalazku wynosi 75—95% przy zastosowaniu jako substratu Δ^5 -3 β -oli sterydowych oraz 90—95% przy stosowaniu jako substratu Δ^4 -3-ketonów sterydowych.

Przykład I. Zawiesinę zarodników uzyskaną ze zmycia siedmiodniowej hodowli szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 z agaru skośnego według Waksmana posiano 50 ml podłoża o składzie: eks-

trakt drożdżowy 0,5%, pepton 0,5% i brzeczka browarnicza o gęstości 8,7°Blg — 50% V/v. Hodowlę inkubowano przez 23 godziny w temperaturze 28°C na trzęsawce wahadłowej (110 uderzeń na minutę, długość wychylenia 8,5 cm). Hodowlą tą posiewano 2 kolby dwulitrowe wypełnione po 500 ml pożywką o składzie 0,25% ekstraktu drożdżowego, 0,4% peptonu, 0,4% fosforanu jednopotasowego i 25% V/v brzeczki browarnicznej o gęstości 8,7 Blg. Kolby inkubowano na trzęsawce w tych samych warunkach co pierwsze stadium. Po 20 godz. gdy wzrost był obfity, dodano do każdej kolby 250 mg pregnen-5-triol-3 β ,17 α -onu-20, rozpuszczonego w 2,5 ml metanolu. Mieszaninę powtórnie umieszczono na trzęsawce. Po 20 godzinach według oceny chromatografii bibułowej przemiana była ukończona.

Zawartość kolb ekstrahowano czterokrotnie po 50 ml chloroformu, ekstrakty połączone, odwodniono siarczanem sodowym, przesączono przez bibułę filtracyjną i przesącz odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość po odparowaniu ekstraktów rozpuszczono w 5 ml mieszaniny benzenu z acetonem w stosunku 95:5 i wprowadzono kolumnę z 25 g żelu krzemionkowego zdezaktywowanego dodatkiem 20% wody. Prowadzono elucję gradientową mieszaniną benzenu ze wzrastającą ilością etanolu od 0 do 2,5%. Odbierano frakcję odcieku po 20 ml i kontrolowano je za pomocą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym (rozwijanie mieszaniną chloroform-metanol 95:5).

Frakcje zawierające właściwy produkt połączone, odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość przekrystalizowano z acetonu uzyskując 400 mg krystalicznego produktu o następujących własnościach: temperatura topnienia 238—241°C E=15 000 przy λ_{max} =243 m μ ; $[\alpha]_D^{20}$ =+72° (chloroform C=1,0). Produkt na chromatogramie dawał pozytywne reakcje na układ $\Delta^{1,4}$ -3-ketonowy (reakcja z hydrazidem kwasu izonikotynowego wg Smitha i Foela, charakterystyczna barwa i fluorescencja w świetle ultrafioletowym λ =366m μ po wywołaniu kwasami). Powyższe własności pozwoliły zidentyfikować go jako pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-dion-3,20.

Przykład II. Do hodowli szczepu Cephalosporium sp. X-1 uzyskanej w sposób analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I dodano do każdej kolby 250 mg pregnen-4-diol-17 α ,21-dionu-3,20. Według oznaczeń chromatografii bibułowej proces był ukończony po 14 godzinach. Zawartość kolb ekstrahowano 4-krotnie po 50 ml chloroformu, ekstrakty połączone, odwodniono siarczanem sodowym i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suchą pozostałość rozpuszczono — oczyszczono na kolumnie chromatograficznej i krystalizowano jak w przykładzie I. Posiadał on podobne własności do otrzymanego w przykładzie I i zidentyfikowano go jako pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-dion-3,20.

Przykład III. Przygotowano hodowlę Cephalosporium sp. X-1 sposobem opisanym w przykładzie I. Do każdej kolby dodano 250 mg 21-aetoksy pregnen-4-ol-17 α -dionu-3,20 w 2,5 ml metano-

lu. Kolby inkubowano jak w przykładzie I. Po 20 godzinach zawartość kolb wyekstrahowano chloroformem 4 razy po 50 ml. Ekstrakty połączone, przesączono, wysuszone nad bezwodnym siarczanem sodowym i odparowano do sucha. Produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej i krystalizowano jak w przykładzie I. Otrzymany produkt ma własności podobne do otrzymanego w przykładzie I i zidentyfikowanego jak pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-dion-3,20.

Przykład IV. Do hodowli szczepu Cephalosporium sp. X-1 przygotowanej w sposób analogiczny do sposobu opisanego w przykładzie I dodano do każdej kolby 50 mg 17 α -metylotestosteronu rozpuszczonego w 1 ml metanolu. Po 20 godzinach inkubacji (jak w przykładzie I) zawartość kolb ekstrahowano chloroformem 4 razy po 20 ml. Ekstrakt chloroformowy przesączono, wysuszone bezwodnym siarczanem sodowym i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w benzenie i wprowadzono na kolumnę z tlenku glinowego dezaktywowanego dodatkiem 8 ml wody na 100 g adsorbentu o aktywności I.

Prowadzono elucję gradientową benzenem ze wzrastającą ilością etanolu od 0 do 1,6%. Odbierano frakcje po 20 ml i kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej [silikażel/chloroform, aceton 4:1]. Frakcje zawierające produkt odparowano do sucha, a pozostałość przekrystalizowano z mieszaniny benzenu z heptanem. Substancja krystaliczna wykazywała temperaturę topnienia 160—162°C, E=15.100 przy λ_{max} =243 m μ ; $[\alpha]_D^{20}$ =+2 (chloroform, C=1,0). Chromatografia cienkowarstwowa [silikażel/chloroform: aceton 4:1] oraz bibułowa [formamid/heptan: benzen 1:1] wykazała, że produkt jest identyczny z 17 α -metyloandrostadien-1,4-ol-17 β -onem-3. W surowym ekstrakcie stwierdzono chromatograficznie również obecność niewielkich ilości produktu ubocznego o niezidentyfikowanej budowie.

Przykład V. Przygotowano hodowlę podpowierzchniową szczepu Cephalosporium sp. X-1 w sposób opisany w przykładzie I. Do każdej kolby dodano po 50 mg androsten-4-dionu-3,20 rozpuszczonego w 1 ml metanolu. Po 20 godz. inkubacji zawartość kolb ekstrahowano jak w przykładzie IV. Ekstrakty połączone, przesączono, wysuszone nad bezwodnym siarczanem sodowym i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Dalej postępowano ściśle jak w przykładzie IV. Uzyskana, krystaliczna substancja posiadała następujące własności fizyczne: temperatura topnienia 139—140°C; E=15.500 przy λ_{max} =243 m μ $[\alpha]_D^{20}$ =120° (chloroform, C=1,0). Chromatografia wykazała ponadto identyczność produktu z substancją wzorcową: androstadien-1,4-dionem-3,20. W surowym ekstrakcie płamie androstadien-1,4-dionu-3,20 towarzyszyły śladowe plamy niezidentyfikowanych produktów ubocznych.

Przykład VI. Do hodowli podpowierzchniowej szczepu Cephalosporium sp. X-1 przygotowanej w sposób opisany w przykładzie I dodano po 250 mg pregnen-4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20 rozpuszczonego w 2,5 ml metanolu. Po 20 godz. według

wyników chromatografii cienkowarstwowej transformacja była zakończona. Zawartość kolb ekstrahowano chloroformem 4 razy po 50 ml. Połączone ekstrakty chloroformowe wysuszono nad siarczanem sodowym, przesączono i odparowano do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczono w mieszaninie benzenu z acetonem (9:1) i wprowadzono na kolumnę z żelom krzemionkowym dezaktywowanym 25% wody. Elucję gradientową prowadzono benzenem ze wzrastającą ilością etanolu od 0 do 3,5% zbierając frakcje po 20 ml. Skład frakcji kontrolowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej [silikażel/chloroform : metanol 95 : 5].

Frakcje zawierające produkt połączone i odparowano do sucha, a pozostałość przekrystalizowano z acetonu otrzymując 420 mg krystalicznego produktu, który posiadał następujące właściwości: temperatura topnienia 228–230°, $E=15.500$ przy $\lambda_{\max}=238 \text{ m}\mu$; $[\alpha]_D^{20}=+165^\circ$ (dioksan, $C=1,0$). Produkt w badaniach chromatograficznych okazał się identyczny z substancją wzorcową pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-trionem-3,11,20 (prednizonem).

Przykład VII. Przygotowano hodowlę szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I. Do każdej kolby dodano po 250 mg 21-acetoksypregnen-4-ol-17 α -trionu-3,11,20 rozpuszczonego w 2,5 ml metanolu. Kolby inkubowano na trzęsawce przez 20 godz., a następnie ekstrahowano ich zawartość chloroformem czterokrotnie po 50 ml. Ekstrakty połączone, wysuszono nad siarczanem sodowym bezwodnym, przesączono i odparowano do sucha. W suchym ekstrakcie stwierdzono przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej [silikażel/chloroform : metanol 95 : 5] obecność octanu prednizonu, prednizonu i śladową plamę substratu.

Przykład VIII. Przygotowano hodowlę szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 sposobem opisanym w przykładzie I. Do każdej kolby dodano 100 mg progesteronu rozpuszczonego w 1 ml metanolu. Mieszaninę reakcyjną inkubowano jak w przykładzie I. Po 20 godzinach zawartość kolb wyekstrahowano chloroformem 4 razy po 30 ml. Ekstrakty połączone, osuszono, przesączono i odparowano do sucha. Zawartość suchego ekstraktu oznaczono przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Chromatogram wykazał obecność pięciu plam odpowiadających produktom ubocznym oraz plamę produktu głównego, którą z uwagi na istnienie układu $\Delta^{1,4}$ -3-keto (reakcja z hydrazidem kwasu izonikotynowego według Smitha i Foela, reakcje barwne i rodzaj fluorescencji po wywołaniu kwasem siarkowym i kwasem fosforowym (oraz wartość R_f) nieco niższą niż substratu określono jako Δ^1 -pochodną progesteronu.

Przykład IX. Przygotowano hodowlę podpowierzchniową szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 w sposób opisany w przykładzie I. Grzybnię oddzielono od brzeckki przez odwirowanie hodowli przy 3000 obr./min. w ciągu 20 minut. Płyn z nad grzybni zlane. Grzybnię z każdej kolby zawieszono w 100 ml 0,03 molarnego buforu fosforanowego o wartości $pH=7,0$ i do zawiesiny dodano 250 mg pregnen-4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20 rozpuszczonego w 2,5 ml metanolu. Zawartość kolb inkubowano

na trzęsawce w temperaturze 28°C przez 18 godzin, a następnie ekstrahowano, osuszono, przesączono i odparowano jak w przykładzie I. Zawartość suchego ekstraktu badano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Chromatogram wykazał tylko plamę pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20.

Przykład X. Przygotowano hodowlę szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I. Grzybnię oddzielono od brzeckki przez odwirowanie hodowli przy 3000 obr./min. przez 20 minut. Płyn z nad grzybni zlane. Grzybnię z każdej kolby zawieszono w 500 ml wody i do zawiesiny dodano 250 mg pregnen-5-triol-3 β ,17 α ,21-onu-20 rozpuszczonego w 2,5 ml metanolu. Mieszaninę powtórnie umieszczono na trzęsawce. Po 20 godzinach zawartość kolb ekstrahowano czterokrotnie 50 ml chloroformu, ekstrakty połączone-odwodniono siarczanem sodowym bezwodnym i przesączono. Przesącze odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Zawartość ekstraktów oznaczono przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej [silikażel/chloroform : metanol 95 : 5] i na podstawie reakcji barwnych z hydrazidem kwasu izonikotynowego według Smitha i Foela, reakcji barwnych i fluorescencji po wywołaniu kwasem siarkowym i kwasem fosforowym, stwierdzono istnienie układu $\Delta^{1,4}$ -3-ketonowego. Z wartości R_f nieco niższej niż dla substancji S Reichsteina oraz zgodności R_f z produktem własnym (otrzymanym według przykładu I) stwierdzono, że produkt jest pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-trionem-3,20.

Przykład XI. Zawiesinę zarodników szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 uzyskaną ze zmycia 10-dniowej hodowli agarowej posiano 10 flaszek Roux z podłożem Waksmana. Hodowlę inkubowano w 28°C przez 10 dni, a następnie zarodniki zmywano 50 ml jałowej wody. Zawiesinę zarodników umieszczono w jednolitrowych kolbach płaskodennych, do każdej kolby dodano 50 mg pregnen-4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20 rozpuszczonego w 1,5 ml metanolu. Mieszaninę inkubowano 18 godzin, po czym ekstrahowano czterokrotnie po 30 ml chloroformu. Ekstrakty połączone, osuszono bezwodnym siarczanem sodowym, przesączono i odparowano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem. Suche ekstrakty analizowano stosując chromatografię cienkowarstwową [silikażel/chloroform : metanol 95 : 5] i bibułową [formamid/benzen : chloroform 1 : 1]. Chromatogram wykazał plamę produktu głównego identyczną z wzorcem pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-trionem-3,11,20 (wartość R_f , reakcja z hydrazidem kwasu izonikotynowego wg Smitha i Foela, oraz rodzaj fluorescencji po wywołaniu kwasem siarkowym i kwasem fosforowym) oraz śladową plamę substratu.

Przykład XII. Przygotowano hodowlę szczepu *Cephalosporium* sp. X-1 w sposób analogiczny jak podano w przykładzie I. Grzybnię oddzielono od brzeckki przez odwirowanie hodowli przy 3000 obr./min przez 20 minut. Płyn usunięto, a biomase po dokładnym przemyciu wodą poddano wirowaniu w tych samych warunkach. Otrzymany preparat enzymatyczny zliofilizowano, przechowywa-

no w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Po około 7 dniach zawieszono w 100 ml wody o temperaturze $24-32^{\circ}\text{C}$.

Do zawiesiny dodano 250 mg pregnen-4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20 rozpuszczonego w 2 ml metanolu. Zawartość kolb inkubowano na trzęsawce w temperaturze 28°C przez 12 godzin, po czym ekstrahowano, osuszono, przesączono i odparowano jak w przykładzie I. Zawartość suchego ekstraktu badano za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej. Chromatogram wykazał tylko plamę pregnadien-1,4-diol-17 α ,21-trionu-3,11,20.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania $\Delta^{1,4}$ -3-ketonów sterydowych metodą mikrobiologiczną, **znamienny tym**, że Δ^5 -3-ol sterydowy lub Δ^4 -3-keton sterydowy podaje się działaniu hodowli szczepu Cephalosporium

sp. X-1, zawiesinie grzybni tego mikroorganizmu w wodzie z ewentualnym dodatkiem substancji buforowych, lub otrzymanymi z tego mikroorganizmu preparatami enzymatycznymi w obecności tlenu powietrza sposobem konwencjonalnym, po czym otrzymany produkt wyodrębnia się i oczyszcza w znany sposób.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako preparat enzymatyczny stosuje się preparat otrzymany przez namnożenie hodowli Cephalosporium sp. X-1 na odpowiednim podłożu wzrostowym, oddzieleniu od niej materiału zawierającego $\Delta^{1,4}$ -dehydrogenazę 3-ketosterydową, odmyciu wodą pozostałości pożywki, a następnie usunięciu wody z produktu drogą liofilizacji, przy czym preparat ten stosuje się bezpośrednio, albo po dodaniu środków konserwujących i przechowaniu w niskiej temperaturze.

Cena zł 10,—