

SZABADALMI LEÍRÁS

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

(11)

196 847

B

Nemzetközi
osztályjelzet:
(51) NSZO.

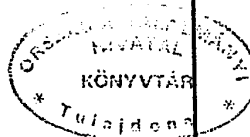
C 12 P 33/02

A bejelentés napja: (21) 2671/88 (22) 1983. VI. 24.

A bejelentés elsőbbsége: (33) US
(32) 1983. III. 15.
(31) 475 437

A közzététel napja: (41) (42) 1984. V. 28.

Megjelent: (45) 1989. 09. 04.



Feltaláló(k): (72)

Kominek, Aloysius Leo, Portage, Wolf, Jo Holly, Kalamazoo,
Evans, Wendell Timothy, US Three Rivers, Michigan

Szabadalmas: (73)

The Upjohn Co. US Kalamazoo, Michigan

(54)

Uj eljárás 1,2-dehidro-szteroidok előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya új eljárás 1,2-telített szteroidok 1,2-dehidro-szteroidokká való átalakítására, oly módon, hogy az 1,2-telített szteroidokat *Arthrobacter simplex* vagy *Bacterium cycloxydans* mikroorganizmussal egy exogén elektron átvivő anyag és aromás szénhidrogénekből álló, vízzel nem elegyedő oldószer jelenlétében alakítják át.

A találmány tárgya mikrobiológiai eljárás 1,2-dehidro-szteroidok előállítására a megfelelő 1,2-telített származékaikból.

A kortikoszteroidokat először az ötvenes években használták gyógyászati célokra, amikor a kortizon-acetátot reumás arthritis kezelésére alkalmazták. A későbbi vizsgálatok bebizonyították, hogy az 1,2-helyzetben telítetlen hidrokortizon, illetve kortizon származékok, a prednizonon és prednizon, jelentős többlethatással rendelkeznek, és kevesebb só visszatartást okoznak. Ezt követően a legtöbb szteroidot, amelyet a kortikoidok okozta betegségek kezelésére alkalmaztak, úgy állították elő, hogy az 1- és 2-helyzetben kettős kötést tartalmazzanak.

1977-ben két amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás a kortikoszteroidok szintézisére szterin prekursorokból kiinduló eljárást javasolt, amely a kortikoszteroidok szintézisének új megközelítését jelentette. A 4 035 236. számú USA-beli szabadalmi leírás 9 α -hidrox-androsztendion előállítására vonatkozik szitoszterin, sztigmaszterin vagy koleszterin fermentálásával. A 4 041 055. számú USA-beli szabadalmi leírás gyógyászati alkalmas kortikoszteroidok ebből az androsztén-származékból való általános szintézisére vonatkozik. Az ebben a folyamatban leírt intermedierek 3-keto- $\Delta^{4,9(11)}$ konfigurációjúak lehetnek.

További, az 1,2-telített szteroidok 1,2-dehidro-szteroidokká való átalakításával foglalkozó irodalmi hivatkozások az alábbiak:

A 2 837 464. számú USA-beli szabadalmi leírás Corynebacteriummal történő dién-előállítást ír le. A leírás szerint a szteroidok 1-dehidrogenézését fermentációs úton, *Arthrobacter* (*Corynebacterium*) simplex segítségével hajtják végre.

A 3 360 439. számú USA-beli szabadalmi leírás 1-dehidro-szteroidok előállítására vonatkozik. A szteroidok 1-dehidrogenézését úgy végzik el, hogy A. simplex sejteket rövidszénláncú alkanollal vagy alkanonnal, például acetonnal előkezelnek, majd szubsztátummal és egy hidrogén átvívó katalizátorral összekeverik.

Charney, W. és Herzog, H.: *Microbial Transformation of Steroids* (Academic Press, Inc., New York, 4.9. és 236-261. oldalak (1967)) című könyvében a szteroid biokonverziókról ad történeti áttekintést, és felsorolja az 1-dehidrogenézéshez ismert és használatos mikroorganizmusokat.

Yamane, T., Nakatani, H. és munkatársai (*Biotechnology and Bioengineering*, 21, 2133 (1966)) 4-androsztén-3,17-dion *Nocardia rhodocrous* mikroorganizmussal történő 1-dehidrogenézésének vizsgálatát végezték el 50% benzol-heptán tartalmú elegyben. Ennek az oldószernek a biokonverziós elegyhez való hozzáadása következtében a reakciósebesség 180-szeresére növekedett. A benzol azonban rákkeltő tulajdonságú. A *Nocardia rhodocrous* aktivitása szempontjából az előnyös elektron-akceptor a fenazin-metoszulfát volt. Ez az elektron akceptor túl drága és instabil ahhoz, hogy a biokonverziós folyamatokban használni lehessen. A *Nocardia rhodocrous* enzim inaktív volt menadion, (2-metil-1,4-naftokinon), az *Arthrobacter simplex* baktérium szempontjából kedvező elektron akceptor jelenlétében. A *Nocardia rhodocrous*ban lévő enzim különbözik az A. simplex által termelt enzimtől. A reakció 20% szteroid tartalmú szerves oldószerben játszódott le. Kimutatták, hogy a

szteroid növekvő koncentrációjával a reakciósebesség csökkent. Az oxigén az 1-dehidrogenézési reakció nélkülözhetetlen eleme. Az alkalmazott oldószer (50% benzol-heptán) oxigén jelenlétében gyúlékony. Azt, hogy az oxigént hogy vezették be a rendszerbe úgy, hogy a gyulladást elkerüljék, nem ismertették.

Somoto, K., Jin, I. és munkatársai (*Agricultural Biological Chemistry*, 44, 1119-1126 (1980)) a hidrokortizon A simplex-szel való 1-dehidrogenézését vizsgálták. Két egymással nem elegyedő oldószert, n-butanol és n-amil-alkoholt használtak, de a biokonverzió nem játszódott le ezeknek az oldószereknek a jelenlétében. Vízoldható oldószereket, például 10% metanol-víz és 10% propilén-glikol-víz, találtak oldószerként a legmegfelelőbbnek.

Összefoglalóan megállapítható, hogy az ismert irodalmi hivatkozások nem ismertetnek vagy javasolnak találmányunk szerinti javított eljárásokat.

A találmány szerinti eljárás során az *Arthrobacter simplex* vagy *Bacterium cycloxydans* mikroorganizmus sejtek vizes sűrű szuszpenziójához aromás szénhidrogénekből álló, vízzel nem elegyedő oldószert, exogén elektron akceptort és dehidrogenézendő szteroidot adunk. A szuszpenziót keverjük, és az oxigén-bevezetést úgy tesszük lehetővé, hogy a gáztérben az oxigéntartalmat kisebb értéken tartjuk, mint a robbanáshoz szükséges oxigén mennyisége, vagy a reakciót a szerves oldószer gyulladáspontja alatti hőmérsékleten hajtjuk végre.

A találmányunk szerinti eljárás előnyei az ismert mikrobiológiai szteroid-dehidrogenézési eljárásokkal szemben:

- a) a biokonverzió végtermékében kevesebb az átalakulatlan szteroid,
- b) a reakció nagyobb szteroid koncentráció alkalmazásával hajtható végre,
- c) fajlagosan kevesebb mikroorganizmus sejt, például A. simplex szükséges a szteroid konverziójához,
- d) az eljárás a szteroidban, a mikroorganizmus sejteiben vagy sejtek által a szteroidból végzett szennyeződésekkel szemben kevésbé érzékeny,
- e) a redukció vagy a mikroorganizmus sejtekben jelenlévő szteroid degradáló enzimek teljes eltávolítása nagyobb kitermeléssel valósítható meg.

A találmányunk szerinti oldószeres eljárás azért is előnyösebb a más, például *Nocardia rhodocrous* mikroorganizmussal végzett eljárással szemben, mert az A. simplex katalizálta reakció stabilabb és olcsóbb elektron akceptorok, például a menadion jelenlétében hajtható végre.

A találmány szerinti eljáráshoz bármely ismert 1-dehidrogenező mikroorganizmus felhasználható.

Az 1-dehidrogenező baktériumokat Bergey: *Manual of Determinative Biology* (8. kiadás) szerint két csoportra oszthatjuk. Az általunk leírt eljárás sikeresen alkalmazható az *Arthrobacter* és *Corynebacterium* fajokra, és azokra a törzsekre, amelyeket a 17. rész *Actinomycetes* és hasonló mikroorganizmusok címszó alatt tárgyal. Más törzsek 1-dehidrogenező fajai, mint a *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* és *Bacterium* is alkalmasak az eljárás megvalósítására.

Eljárásunkat két, mindenki által hozzáférhető szteroidokat 1-dehidrogenező hatású mikroorganizmuson mutatjuk be. Egyrészt a 3 065 146. számú USA-beli szabadalmi leírásban 1-dehidrogenezőként szereplő *Bacterium cycloxydans*-t (ATCC száma 12673)

vizsgáltuk. A 2 837 464. számú USA-beli szabadalmi leírásban szereplő *Arthrobacter simplex* (ATCC száma 6946) mikroorganizmust gyakrabban használják szteroidok 1-dehidrogénezésére. Ezért a leírás legnagyobb részében ezt a mikroorganizmust használjuk a találmány szerinti eljárás ismertetésére. De felhívjuk a figyelmet, hogy bármely 1-dehidrogénező mikroorganizmus alkalmas a találmány szerinti eljárás végrehajtására.

A mikroorganizmusokat a következő összetételű táptalajon tenyésztettük:

a) szervetlen vegyületek (nitrátok vagy ammónium-sók) vagy szerves nitrogéntartalmú vegyületek (élesztő extraktum, pepton, gabonaáztatólé) a növekedéshez szükséges nitrogén biztosítására,

b) szén- és energiaforrások, például szénhidrátok és cukorszármazékok, olaj, zsírsavak és metil-észterek, alkohokok, aminosavak vagy szerves savak,

c) ionok és nyomelemek (nátrium, kálium, magnézium, foszfát, szulfát, mangánát, réz, kobalt, inolibdén) olyan mennyiségben, amely a csapvízben vagy a kevésbé finomított közegként használatos anyagokban található.

A mikroorganizmusok növekedésükhöz oxigént igényelnek a felettük lévő légtérben. Az *A. simplex* növekedéséhez megfelelő hőmérséklet 10–45 °C, előnyösen 28–37 °C. A növekedéshez optimális pH-érték semleges körül van.

A sejteket szteroid-1-dehidrogénezésére úgy aktiváljuk, hogy 1,2-telített-3-keto-szteroidot, például androszta-4-én-3,17-diont vagy kortizon-acetát adunk 0,005 tömeg/térfogat%, vagy nagyobb mennyiségben a közeghez. Az indukálószer jelenlétében a sejteket 6 órán keresztül inkubáljuk, majd összegyűjtjük és szárítjuk őket.

Az indukálószer a növekedési ciklus bármely pontján hozzáadható a mikroorganizmusokhoz. A disznózsír-olajhoz (triglicerideket és szabad zsírsavat tartalmazó olaj) hasonló táptalajon tenyésztett kultúrák a szteroid-1-dehidrogenázt gyorsan kezdik szintetizálni, míg a glükózon tenyésztett mikroorganizmusok csak a szubsztátum elfogyasztása után kezdenek enzimet termelni. Az inkubálást 6 vagy még több órán keresztül folytatjuk az indukálószer hozzáadása után, majd a sejteket begyűjtjük az oldószeres folyamatban való használat vagy szárítás céljából.

A sejteket szárítás céljából elkülönítjük a táptalajtól, és hagyományos módszerek, például centrifugálás, flokkulálás, szűrés vagy ultraszűrés segítségével koncentrálnuk őket. Az elválasztott sejteket ezután csökkentett nyomáson 1–85 °C, előnyösen 55–75 °C hőmérsékleten meleg levegővel porlasztva, vagy forgatva szárítjuk, amíg az anyag nedvességtartalma 1–10%, előnyösen 5% nem lesz. A biokonverzióhoz használt sejteket 5 °C-on tároljuk. Aktív szárított sejteket standard módszerek segítségével állíthatunk elő a szárított sejtek immobilizálásával például úgy, hogy poliakril-amid gélbe zárjuk vagy egy polielektrolit hordozóanyaghoz kollagén vagy kovalens kötéssel kötjük őket (Methods in Enzymology, XLIV. kötet, Academic Press Inc., New York, 11-317. oldal [1976]).

A biokonverziót az elkészített sejtek és a szteroid szubsztátum egymásra hatása révén érjük el. Általában a sejteket és a szteroidot egy gyengén puffertolt 6–10, előnyösen 7,25–8,5 pH-jú vizes közegben szuszpen-

dáljuk. A sejtkoncentráció 0,1–50 g/l, a szteroid és a sejtek tömegaránya 0,05–5. Vizes közegben 8–10 g/l sejt-, illetve 5–10 g/l szteroidkoncentráció előnyös a biokonverzió végrehajtásához. Katalitikus mennyiségű exogén elektron átvivő anyagot (például 5×10^{-4} mól menadiont) is adunk a reakcióelegyhez. Katalizátorként menadion (2-metil-1,4-naftokinon), fenazin-metoszulfátot, diklór-fenil-indofenolt, 1,4-naftokinont, menadion-biszulfítot, ubikinonokat (Koenzim Q) és K-vitamin típusú vegyületeket használhatunk. Az elegyeket 0–14 napon keresztül 5–45 °C hőmérsékleten inkubáljuk. Az inkubálás alatt az elegyben felesleges mennyiségű molekuláris oxigénnek kell lennie, ezért előnyösen keverjük. Az 1-dehidrogénezés sebessége általában az idővel csökken. A biokonverzió 10 g/l szubsztátát alkalmazásával kevesebb, mint 24 óra alatt 98–100%-os lehet.

Az eljárást a következő módokon hajthatjuk végre:

a) A szteroidot és a menadiont gyengén puffertolt vizes oldatban szuszpendáljuk, majd a szárított sejteket hozzáadjuk. A Tween 80-hoz hasonló felületaktív anyagok is hozzáadhatók az elegyhez 0–5% koncentrációban.

b) A sejteket vizes puffertoldatban szuszpendáljuk, majd a metanolban, etanolban, acetonban (amely térfogata nem lehet több, mint a végtérfogat 5%-a) oldott elektron átvivő anyagot adjuk hozzá. A szteroid szubsztátát száraz porként vagy vízzel elegyedő szerves oldószerben (például dimetil-formamidban, etanolban, metanolban, acetonban, dimetil-szulfoxidban) vagy vízzel nem elegyedő szerves oldószerben (például toluolban) oldva vagy szuszpendálva adjuk hozzá.

c) A száraz sejteket kis mennyiségű puffertoldatban rehidratáljuk további puffer- vagy szerves oldószer hozzáadásával. A végleges 0–95% (t/f) eléréshez etanolt, acetont, xilolt, butil-acetátot, metilén-kloridot vagy toluolt adunk hozzá. A használt aromás szénhidrogén mennyisége a legjobban oldódó szteroid feloldásához szükséges oldószer felétől a legkevésbé oldódó szteroid feloldásához szükséges oldószer felétől a legkevésbé oldódó szteroid oldásához szükséges oldószer négyszerese között változhat. A reakció megindításához elektron átvivő anyagot és szteroidot adunk a reakcióelegyhez. Az aromás szénhidrogént előnyösen a szteroiddal együtt adjuk az elegyhez, bár ez egy korábbi vagy későbbi időpontban is megtörténhet.

d) A nedves sejtömeget szuszpendáljuk vagy a fermentációs levét hígítjuk gyengén puffertolt vizes oldattal, majd egy exogén elektron átvivő anyagot, a szteroidot és egy aromás szénhidrogént adunk hozzá.

A találmány szerinti reakcióban használható vegyületek a 3-keto- Δ^4 -androsztén és a 3-keto- Δ^4 -pregnén típusú szteroidokhoz tartoznak. A szteroid-1-dehidrogenáz szubsztátjai az A gyűrű 1-es és 2-es szénatomja között telítettek, és az A gyűrű 3-as helyzetében hidroxil- vagy ketocsoportot tartalmaznak. Az androsztén-típusú vegyületek közé az alábbiak tartoznak:

- 1) androszta-4-én-3,17-dion,
- 2) androszta-4,9(11)-dién-3,17-dion és ezek 6-alfa-fluor-, 6-alfa-metil- vagy 16 metil-származékai,
- 3) 11-béta-hidroxi-androszta-4-én-3,17-dion és származékai.

A felhasználható r-keto- Δ^4 -pregnén-típusú vegyületek közé az alábbiak tartoznak:

- 1) 17-alfa-hidroxi-pregn-4-én-20-in-3-on és 16-metil-származékai,
- 2) 11-béta,21-dihidroxi-pregn-4,17(20)-dién-3-on és 6-alfa-metil-származékai,
- 3) 2-klór-pregn-4,9(11),17(20)-trién-21-al-3-on,
- 4) a 3,20-diketo- Δ^4 -pregnének számos csoportja, vagyis
 - a) 11,17,21-trihidroxi-vegyületek, mint például a hidrokortizon és 6-alfa-metil-származékai,
 - b) 9-béta,11-béta-epoxi-17,21-vegyületek, mint például a 9-béta,11-béta-epoxi-17,21-dihidroxi-16-béta-metil-pregn-4-én-3,20-dion,
 - c) 2,30-diketo-4,9(11)-pregné-diének, mint például a 17-alfa,21-dihidroxi-pregn-4,9(11)-dién-3,20-dion és ennek 16-alfa-metil-, 16-béta-metil- vagy 16-alfa-hidroxi-származékai vagy 17-alfa-acetát-észtere,
 - d) 3,20-diketo-4,9(11)-, 4,9(11),16-pregnén-triének, mint például a 21 hidroxipregn-4,9(11),16-tri-én-3,20-dion és ennek 6-alfa-fluor-származékai.

A 21-es helyzetben hidroxil-csoportot tartalmazó 2 és 4 pont alatti szteroidok 21-észter származékai szintén alkalmazhatók szubsztrátként. Az előnyös 21-észterek az alacsonyabb szénatomszámú zsírsavakhoz hasonló alacsonyabb szénatomszámú alkil- vagy aril-csoportokat tartalmaznak, például ecetsavat vagy monociklikus karbonsavakat, például benzoésavat.

A biokonverzió terméke és az át nem alakult szubsztrát szokványos módszerekkel választható el a keverékből. A szteroidokat általában szűréssel, majd a szűrőn maradt lepeny szerves oldószerekkel, mint például acetonnal vagy metilén-kloriddal való extrakciójával választják el. Egy másik alternatív módszer az, hogy az egész biokonverziós keveréket egy vízzel nem elegyedő szerves oldószerekkel, mint például butil-acetáttal vagy metilén-kloriddal extraháljuk, majd a terméket a szerves oldószerekből különítik el.

A találmány szerinti eljárást az alábbi példákkal illusztráljuk, anélkül azonban, hogy a találmányt a példákra korlátoznánk. A példák is bizonyítják, hogy a találmány szerinti eljárás sokkal jobb az irodalomból ismert eljárásoknál. A biokonverziót a fentiekben részletezett körülmények között hajtottuk végre.

1. példa

Száritott sejtek előállítása

6–6 g/l keményítőcukrot, peptont és kukorica-ekvart tartalmazó (pH = 7,0) rázó lombikba *Bacterium cycloocydans*-t (ATCC 12673) oltottunk. A kultúrákat 28 °C hőmérsékleten egy rotarázógépen inkubáltuk, amíg glükóz kimerülés nem lépett fel. Ekkor 0,5 g/l kortizon-acetátot adtunk hozzá, és a lombikot további 16 órán keresztül inkubáltuk. A sejteket centrifugálással nyertük ki, kétszer vízzel mostuk, majd csökkentett nyomáson 45 °C hőmérsékleten megszáritottuk.

Androszta-1,4,9(11)-trién-3,17-dion előállítása

6–6 g/l glükózt, kukorica-ekvart és porlasztva száritott zsiremulziót tartalmazó rázó lombikokban *Arthrobacter simplex* (ATCC 6946) mikroorganizmust tenyésztettünk. A kultúrákat 28 °C hőmérsékleten rotációs rázóban addig inkubáltuk, amíg glükóz kimerülést nem észleltünk. Ekkor kortizon-acetátot (0,15 g/l) adtunk az elegyhez, hogy megindítsuk a szteroid-1-dehidrogenáz szintézist. Egy éjszakai inkubálás

után a sejteket centrifugálással gyűjtöttük össze. A sejt pelleteteket 55 °C hőmérsékleten alacsony nyomáson 24 órán át szárítottuk. 24 órával később a száraz anyagot egy légmentesen záródó tartályba tettük és 5 °C hőmérsékleten tároltuk, amíg a biokonverzióhoz fel nem használtuk.

2. példa

(1) Egy edénybe a következő anyagokat mértük be (1 l alap):

- a) 0,9 l 50 mmól-os kálium-foszfát puffer (pH=7,5)
- b) 3,66 g száraz *A. simplex* sejt
- c) 0,08 g menadion
- d) 8 g 21-acetoxi-pren-4,9(11),16-tri-én-3,20-dion
- e) 100 ml toluol

(2) Keverés közben 62,8 J/l.min hőfelvételi sebességgel melegítettük.

(3) Annyi levegőt eresztettünk a lombikba, hogy a gázterben lévő oxigén mennyisége 3–6% legyen.

(4) A hőmérsékletet 28±1 °C-on tartottuk.

(5) 25 órás reakcióidő után a toluolos fázist elválasztottuk.

Ebben az esetben a toluolos fázis összetétele a következő volt:

- 94,3% acetoxi-pregn-1,4,9(11),16-tetra-én-3,20-dion,
- 4,2% 21-hidroxi-pregn-1,4,9(11),16-tetra-én-3,20-dion
- 1,5% 21-acetoxi-pregn-4,9(11),16-tri-én-3,20-dion.

A fenti lépések a következő eltérésekkel hajthatók végre:

30

(1) lépés

a) A puffer pH-ja 6–10 között változhat.

b) Az *A. simplex* mennyisége akkorára korlátozható, amely éppen elegendő a reakció befejezéséhez. Általában 0,05–1 g sejt/l szteroid mennyiségben alkalmazzuk. Az enzim mikrobiális forrása: *Arthrobacter* (*Corynebacterium*) *simplex* (ATCC 6946) vagy *Bacterium cyclooxydans* (ATCC 12673).

35

A mikroorganizmus előállítása: Az *A. simplex* sejteket a fermentációban használhatjuk, vagy összegyűjthetjük, megszárithatjuk, acetonnal kezelést alkalmazhatunk vagy immobilizálhatjuk őket a szakirodalomból ismert módszerek segítségével.

40

c) Elektronakceptoroként a következő vegyületeket alkalmazhatjuk: menadion (2-metil-1,4-naftokinon),

45

menadion-biszulfit,

1,4-naftokinon és

más K-vitamin típusú vegyületek.

Az elektronakceptor alkalmazott mennyisége a költségektől és a reakciósebességgel kapcsolatos megfontolásoktól függ. A reakciósebesség lineárisan arányos a menadion koncentrációval. Általában 5–40 g elektron akceptor/kg szteroid felhasználása előnyös.

50

d) A szteroid koncentráció olyan magas legyen, amennyi hatékonyan át tud alakulni.

A szteroid a 3-keto- Δ^4 -androsztének vagy a 3-keto- Δ^4 -pregnének közé tartozzon, és a szerves oldószerekben oldhatósága nagyobb legyen, mint 5 g/l.

55

e) Az aromás szénhidrogén toluol, benzol vagy xilol lehet. Ezeket az oldószereket együttesen, vagy más, vízzel nem elegyedő oldószerekkel, például hexánal vagy metilén-kloriddal hígítva alkalmazhatjuk.

60

Az aromás szénhidrogén mennyisége a legjobban oldódó kiindulási vagy végtermék szteroid feoldási-

hoz szükséges oldószer fele és a legrosszabbul oldódó kiindulási vagy végtermék szteroid feloldásához szükséges oldószer négyeszerese között változhat.

A fenti példában a toluolt olyan mennyiségben alkalmaztuk, hogy éppen elegendő volt a reakció befejezésekor a szteroid feloldásához.

Az aromás szénhidrogént előnyösen a szteroiddal együtt adjuk a reakcióelegyhez. Azonban az aromás szénhidrogént későbbi vagy korábbi időpontban is hozzáadhatjuk az elegyhez.

(2) lépés

Az elegyet annyira kell keverni, amennyire ez lehetséges. A reakciósebesség a keverési erőtől erősen függ.

(3) lépés

A reakció oxigénigényes. Azonban az aromás szénhidrogén jelenléte következtében a reaktor gáztérben robbanásveszélyes gázelegy keletkezik. Ennek a veszélynek a leküzdése érdekében a gáztérben lévő oxigén mennyiségét a gyulladáshoz szükséges mennyiség alatt kell tartani. Benzol esetén a gyulladáshoz szükséges minimális oxigén 11,2%. Xilol esetén is lehetséges a reakciót a lobbanáspont alatt tartani. M-xilol, o-xilol és p-xilol esetén a gyulladási hőmérséklet 29, 32, illetve 39 °C.

(4) lépés

A reakcióhőmérséklet 0–45 °C között változhat.

(5) lépés

A reakció általában 2 nap alatt zajlik le, de a reakcióidő néhány óra és néhány hét között változhat.

3. példa

A toluolos és vizes eljárások összehasonlítása

A (eljárás)

0,4 g A. simplex sejtet és 50 ml 50 mmól-os kálium-foszfát puffert (pH = 7,5) összekevertünk. 2 órán keresztül mozgattuk, amíg egységes fermentlevet nem kaptunk. 2–25 ml-es frakciókat vettünk ki belőlük, és 125 ml-es lombikba tettük. Mindegyik lombikba 0,25 ml 3A-alkoholban oldott 5 mmól menadiont és 0,2 g androszta-4,9(11)-dién-3,17-diont adtunk. Az egyik lombikba 2 ml toluolt öntöttünk. 4 napon keresztül rázógépen mozgattuk. 4 nap elteltével 25 ml toluollal extraháltuk. Az extraktumokat analizáltuk.

B (eredmények)

	Eljárás	
	Vizes	toluolos
Szubsztrát:		
androszta-4,9(11)-dién-3,17-dion	17,7%	0,00%
Termék:		
androszta-1,4,9(11)-trién-3,17-dién	82,3%	100,00%

4. példa

A 2. példának megfelelő módon eljárva a következő szteroidokat alakítottuk át 1,2-dehidro-származékaikká A. simplex szárított sejtek segítségével:

1. androszta-4-én-3,17-dion
2. 6-alfa-fluor-androszta-4,9(11)-dién-3,17-dion
3. 6-alfa-metil-androszta-4,9(11)-dién-3,17-dion
4. 16-béta-metil-androszta-4,9(11)-dién-3,17-dion

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

5. 17-alfa-hidroxi-pregn-4-én-20-in-3-on
6. 17-alfa-hidroxi-pregn-4,9(11)-dién-20-in-3-on
7. 17-alfa-hidroxi-16-béta-metil-pregn-4,9(11)-dién-20-on-3-on
8. 21-acetoxi-11-béta-hidroxi-pregn-4,17(20)-dién-20-in-3-on
9. 20-klór-pregn-4,9(11),17(20)-trién-21-al-3-on
10. 21-acetoxi-17-hidroxi-pregn-4,9(11)-dién-3,20-dion
11. 21-acetoxi-17-hidroxi-16-alfa-metil-pregn-4,9(11)-dién-3,20-dion
12. 21-benzol-oxi-17-hidroxi-16-alfa-metil-pregn-4,9(11)-dién-3,20-dion
13. 21-acetoxi-17-hidroxi-16-béta-metil-pregn-4,9(11)-dién-3,20-dion
14. 21-acetoxi-pregn-4,9(11),16-trién-3,20-dion
15. 21-acetoxi-6-alfa-fluor-pregn-4,9(11),16(17)-trién-3,20-dion.

A konverzióval a következő termékekhez jutottunk:

- 1a. androszta-1,4-dién-3,17-dion
- 2a. 6-alfa-fluor-androszta-1,4,9(11)-trién-3,17-dion
- 3a. 6-alfa-metil-androszta-1,4,9(11)-trién-3,17-dion
- 4a. 16-béta-metil-androszta-1,4,9(11)-trién-3,17-dion
- 5a. 17-alfa-hidroxi-pregn-1,4-dién-20-in-3-on
- 6a. 17-alfa-hidroxi-pregn-1,4,9(11)-trién-20-in-3-on
- 7a. 18-alfa-hidroxi-16-béta-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-20-in-3-on
- 8a. 21-acetoxi-11-béta-hidroxi-pregn-1,4,17(20)-trién-3-on és 11-béta,21-dihidroxi-pregn-1,4,17(20)-trién-3-on
- 9a. 20-klór-pregn-1,4,9(11),17(20)-trién-21-al-3-on
- 10a. 21-acetoxi-17-hidroxi-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion és 17,21-dihidroxi-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion
- 11a. 21-acetoxi-17-hidroxi-16-alfa-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion és 17,21-dihidroxi-16-alfa-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion
- 12a. 21-benzol-oxi-17-hidroxi-16-béta-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion
- 13a. 21-acetoxi-17-hidroxi-16-béta-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion és 17,21-dihidroxi-16-béta-metil-pregn-1,4,9(11)-trién-3,20-dion
- 14a. 21-acetoxi-pregn-1,4,9(11),16-tetraén-3,20-dion és 21-hidroxi-pregn-1,4,9(11),16-tetraén-3,20-dion
- 15a. 21-acetoxi-6-alfa-fluor-pregn-1,4,9(11),16-tetraén-3,20-dion és 6-alfa-fluor-21-hidroxi-pregn-1,4,9(11),16-tetraén-3,20-dion.

Az 1,2-dehidro-szteroidok felhasználása jól ismert. Például a 3 284 447. számú USA-beli szabadalmi leírás szerint az $\Delta^{1,4,9(11)}$ -pregnén-triének a 16. szénatomszámon helyettesített diuretikus kortikoszteroidok szintéziséhez használhatók fel. A 4 041 055. számú $\Delta^{1,4}$ -androsztén-dion származékokból, ezáltal bizonyítva azt, hogy az 1,2-dehidro-androsztének fontos intermedierek gyógyászatilag hasznos előállításában.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás 1,2-telített szteroidok 1,2-dehidro-szteroidokká való átalakítására, *Arthrobacter simplex* vagy *Bacterium cyclooxydans* mikroorganizmussal, az a l j e l l e m e z v e , hogy egy exogén elektron

196.847

átvivő anyag és aromás szénhidrogénekből álló, vízzel nem elegyedő oldószer jelenlétében alakítjuk át.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy elektron átvivő anyagként 2-metil-1,4-naftokinont, 1,4-naftokinont, 2-metil-1,4-naftokinon-biszulfitot vagy más, K-vitamin típusú vegyületet, aromás szénhidrogénként toluolt vagy xilolt alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az aromás szénhidrogénekből álló, vízzel nem elegyedő oldószert a legjobban oldódó szubsztrát vagy végtermék szteroid feloldásához szükséges fele és a legkevésbé oldódó szubsztrát vagy vég-

5

10

15

termék szteroid feloldásához szükséges mennyiség négyszerese közötti mennyiségben alkalmazzuk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az átalakítást az oxidációhoz minimálisan szükséges koncentrációjú oxigén jelenlétében végezzük.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy az átalakítást a szerves oldószer lobbanáspontja alatti hőmérsékleten végezzük.

6. Az 1., 4. vagy 5. igénypontok szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a vízzel nem elegyedő oldószert más, vízzel nem elegyedő oldószerral hígítjuk.

rajz nélkül

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal
Felelős kiadó: Himer Zoltán o.v.

KÓDEX
