



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

235 660

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 11 82
(21) PV 8126 - 82

(51) Int. Cl.³

C 12 P 33/00

(40) Zveřejněno 17 09 84

(45) Vydáno 01 06 86

(75)

Autor vynálezu

PROTIVA JIŘÍ RNDr. CSc.,
SCHWARZ VLADIMÍR RNDr. CSc.,
PIHERA PAVEL, PRAHA

(54)

Způsob výroby 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu
mikrobiálním štěpením postranního řetězce sterolů

Způsob výroby 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu spočívající v odštěpení části alifatického postranního řetězce různých zoosterolů a fytosterolů, přičemž 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-on je konečným produktem řady reakcí katalysovaných enzymy nově vyšlechtěného mutantu *Mycobacterium* sp. CCM 3528.

Vynález se týká způsobu výroby 22-hydroxy-23,24-bisnorcho-la-1,4-dien-3-onu mikrobiálním odštěpením části alifatického postranního řetězce sterolů za současné oxidace 3 β -hydroxylové skupiny enzymatickou činností nově vyšlechtěného bakteriálního kmene, získaného mutací kultury *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483. Nově vyšlechtěný mutant *Mycobacterium* sp. CCM 3528, uložený v Čsl.sbírce mikroorganismů UJEP v Brně, částečně odštěpuje alifatický postranní řetězec různých zoosterolů a fytosterolů, přičemž v médiu se hromadí jako konečný produkt sledu enzymatických reakcí 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-on spolu s malým množstvím 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-en-3-onu, na rozdíl od výchozího kmene *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483, který různé steroly degraduje hluboce až na nízkomolekulární nesteroidní štěpy.

Význam postupu podle vynálezu spočívá mimo jiné v tom, že jím získaný hlavní produkt 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-on je klíčovým meziproduktem pro syntézu význačných steroidních hormonů 20-pregnanonové skupiny, jako jsou kortikoidy, gestageny a jiné, přičemž k biodegradaci používané výchozí steroly jsou snadno dostupné a lze jich použít bez jakékoliv předběžné úpravy jejich chemické struktury.

Je známo, že různé mikroorganismy rozkládají přírodní steroly až na kysličník uhličitý a vodu, aniž by bylo možno zachytit jednotlivé meziprodukty ve využitelném množství. Pouze za přítomnosti enzymových jedů v reakční směsi (Brit.patent 1,113,887, US patent 3,338,042), nebo při použití uměle připravených laboratorních mutantů (US patent 3,684,654, US patent 3,759,791, US patent 4,293,644) se podařilo izolovat steroidní štěpy s 19 uhlíky, androst-4-en-3,17-dion a androsta-1,4-dien-3,17-dion, vhodné pro syntézu steroidních hormonů.

Poněvadž řada cenných léčiv jsou steroidní deriváty zpravidla odvozené od struktury s 21 uhlíky a poněvadž výstavba postranního řetězce u odpovídajících C-19 steroidů je chemicky značně nesnadná, vznikla potřeba vyšlechtit takové mikroorganismy, které by štěpily postranní řetězec sterolů nikoliv beze zbytku, ale za vzniku produktu s více než 19 uhlíky, zejména poté, když jako vedlejší produkt biodegradace různých sterolů mutanty *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 a *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 byl v malém množství zachycen 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-en-3-on a jeho 1-dehydroderivát (US patent 3,684,657, US patent 3,759,791). Množství těchto steroidních štěpů se podařilo u obou zmíněných mutantů zvýšit při biodegradaci sterolů za přítomnosti různých sloučenin boru až na trojnásobek (DT patent 2,757,156).

Postup štěpení sterolů, při kterém jako hlavní produkty vznikají 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-on a 22-hydroxy-23,24-bisnorchol-4-en-3-on pomocí mikroorganismu systematicky zařazeného jako *Mycobacterium parafortuitum* komplex MCI 0617 je chráněn EP 0001622. Podle něho produkční mikroorganismus, který byl získán mutací divokého kmene *Mycobacterium parafortuitum* komplex ATCC 25790, hromadí jako produkty degradace různých sterolů značná množství výše specifikovaných 22 uhlíkatých štěpů zejména za přítomnosti glyceridů nebo tuků ve fermentačním médiu.

Mikroorganismus *Mycobacterium* sp. CCM 3528, používaný v postupu podle vynálezu, byl získán mutací UV zářením z izolátu divokého kmene *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483. Provedením mutagenního zásahu UV zářením a technika výběru žádaných mutantů z ozářené populace jsou odborníkovi dostatečně známé. V tomto vynálezu popsáný mutant *Mycobacterium* sp. CCM 3528 se odlišuje od dříve popsaného mutantu *Mycobacterium parafortuitum* komplex MCI 0617 nejen systematickým zařazením výchozího šlechtěného druhu (viz: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8.vydání, 1974), ale zejména vyšší biodegradací aktivitou při nízké náročnosti na složení fermentační půdy.

Mutant *Mycobacterium* sp. CCM 3528 má kultivační znaky a většinu znaků morfologických shodných s výchozím kmenem *Mycobacterium vaccae* ATCC 15483. Kromě výrazně odlišného účinku na steroly se zřetelně odlišuje nepřítomností žluté složky pigmentu, vy-

tvářeného při kultivaci na tekutých nebo ztužených živných médiích. Roste rychle na jednoduchých kultivačních půdách v rozmezí teplot 25 °C až 37 °C. Živné půdy sestávají z asimilovatelných zdrojů uhlíku a dusíku a z minerálních solí. Vhodnými zdroji uhlíku jsou např. sacharosa, glukosa, fruktosa, maltosa, glycerol, kyselina citronová, kyselina mléčná, melasa a pod. Jako dusíkaté živiny se používají anorganické sole amonné, nebo sloučeniny odvozené od kyseliny dusičné, dále organické zdroje jako jsou pepton, hydrolyzáty kaseinu, masový extrakt, kvasničný extrakt, kukuřičný extrakt, sojová mouka, bavlníková mouka, arašídová mouka, močovina a pod. Pro průběh a výsledky biodegradace sterolů mutantem *Mycobacterium* sp. CCM 3528 není rozhodující přítomnost glyceridů nebo tuků, nebo jejich přírodních zdrojů ve fermentačním médiu. Pokud je to nezbytné, mohou se do kultivačního média přidat některé anorganické sloučeniny, např. fosforečnany, sole hořčíku a železa. Potřebné stopové prvky jsou obvykle obsaženy v dostatečném množství v komplexních složkách živného média, nebo v použité vodě. Pro rychlý nárůst mykobaktéria je vhodné upravit počáteční reakci živného média na hodnotu pH v rozmezí 6,0 až 7,5. Kultivace se uskuteční za aerobních podmínek s výhodou za přítomnosti malé koncentrace některé z povrchově aktivních látek. Pokud je to nezbytné, může být složkou živného média protipěnidlo, ovšem jeho přídavek není nezbytně nutný.

K uskutečnění selektivního štěpení postranního řetězce sterolů se použije rostoucích nebo narostlých buněk *Mycobacterium* sp. CCM 3528 v kultivačním médiu, nebo suspense buněk z kultivačního média oddělených, nebo se použije do různého stupně vyčištěných enzymů izolovaných z buněk mykobaktéria.

Jako substráty ke štěpení postranního řetězce enzymatickou činností mikroorganismu *Mycobacterium* sp. CCM 3528 jsou použitelné cholesterol, β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, ergosterol, nebo směs dvou nebo více sterolů, jako je tomu např. u steroidní frakce získané z talových olejů nebo z desodoračních kondensátů odpadajících při čištění jedlých tuků. Jako substráty jsou vhodné též produkty oxidace přírodních sterolů, nebo jejich 3-estery.

V případě, že se štěpení provede v nativní kultuře, může se steroidní substrát přidat do kultivačního média před jeho steri-

lisací, nebo před zaočkováním, nebo během kultivace a to najednou, nebo po částech. Koncentrace přidávaného sterolu je obecně od 0,01 % do 1,0 % hmotnostních, přičemž doba potřebná k odštěpení části postranního řetězce substrátu je od 10 hodin do 7 dní. Rychlost štěpení je do značné míry úměrná stupni disperse použitého sterolu, který lze přidat v pevné formě jako prášek nebo mikrokrytalickou hmotu, nebo jako roztok ve vhodném rozpouštědle např. dimethylformamidu, nebo jako dispersi sterolu připravenou např. mechanicky nebo působením ultrazvuku, případně za zvýšené teploty, ve vodném prostředí v přítomnosti povrchově aktivní látky.

S výhodou se postup podle vynálezu uskuteční v nativní kultuře *Mycobacterium* sp. CCM 3528 rostoucí v živném médiu, ke kterému se před sterilizací přidá vodná mikrosuspense sterolu v koncentraci 0,1 % hmotnostních. Po 48 až 96 hodinové inkubaci při 30 °C za aerobních podmínek je biotransformace ukončena. Nahromaděné steroidní produkty se z kultivačního média extrahují vhodným organickým rozpouštědlem s vodou omezeně mísitelným a hlavní produkt, 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-on se izoluje ze surového extraktu krystalizací. Výtěžek hlavního produktu se vypočítá ze vztahu

$$Y = \frac{100 \cdot P}{Q \cdot S},$$

kde Y značí výtěžek v procentech molárních, S je množství spotřebovaného substrátu v gramech, P je množství čistého produktu v gramech a Q je poměr molekulových hmotností produktu a substrátu.

Podrobnosti postupu podle vynálezu vyplývají z příkladů provedení, které však tento způsob nijak neomezují pouze na uvedené podmínky.

Příklad 1

Ve varné baňce obsahu 6 litrů se vysterylizuje 1000 ml živného média obsahujícího 5,0 g glycerolu, 8,0 g kukuřičného extraktu (50 % hmotnostních sušiny), 5,0 g peptonu, 2,0 g KH_2PO_4 , 1,0 g MgSO_4 kryst., 1,0 g polyethylensorbitanmonooleátu (Tween 80) a upraveného roztokem hydroxidu draselného na pH 7,0. Před sterilizací se přidá k živnému médiu vodná mikrosuspense připravená z 1,0 g cholesterolu. Obsah baňky se sterilizuje 30 minut při 120 °C. Po ochlazení na kultivační teplotu 30 °C se obsah baňky zaočkuje 50 ml submersního inokula *Mycobacterium* sp. CCM 3528 starého 24 hodin a inkubuje se na reciprokém třepacím stroji 66 hodin. Poté se kultivační médium opakovaně extrahuje dichlormethanem, spojené organické výtřepky se promyjí vodou, vysuší bezvodým síranem sodným a organické rozpouštědlo se oddestiluje za zvýšené teploty ve vakuu. Odparek se rozpustí v nejmenším množství octanu ethylnatého a z roztoku se krystalizací získá 585 mg (výtěžek 76 %) 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu o t.t. 181 až 183 °C, $[\alpha]_D^{20} +28^\circ$ (chloroform). Z matečných louhů se chromatografií na sloupci silikagelu dále získá po eluci směsí benzen - octan ethylnatý 98 : 2 90 mg nezreagovaného cholesterolu, směsí benzen - octan ethylnatý 87 : 13 dalších 75 mg 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu o t.t. 180 až 182 °C, směsí benzen - octan ethylnatý 85 : 15 malá množství 24-norchol-4-en-3,22-dionu o t.t. 192 až 195 °C a 24-norchola-1,4-dien-3,22-dionu o t.t. 220 až 224 °C.

Příklad 2

K 1000 ml živného média popsaného v příkladu 1 se před sterilizací přidá vodná mikrosuspense připravená z 1,0 g β -sitosterolu. Po sterilizaci 30 minut při 120 °C a po ochlazení na kultivační teplotu 30 °C se živné médium zaočkuje 50 ml 24 hodin starého submersního inokula *Mycobacterium* sp. CCM 3528 a inkubuje se na reciprokém třepacím stroji 90 hodin. Produkty biotransformace se z kultivačního média extrahují a pak izolují jak je popsáno v příkladu 1. Získá se 0,31 g čistého krystalického 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu (výtěžek 55 %) a 0,29 g nezreagovaného β -sitosterolu.

Příklad 3

K 1000 ml živného média popsaného v příkladu 1 se před sterilizací přidá vodná mikrosuspense připravená z 1,0 g stigmasterolu.

Po sterilisaci 30 minut při 120 °C a po ochlazení na kultivační teplotu 30 °C se živné médium zaočkuje 50 ml 24 hodin starého submersního inokula *Mycobacterium* sp. CCM 3528 a inkubuje se na reciprokém třepacím stroji 90 hodin. Produkty biotransformace se z kultivačního média extrahují a pak izolují jak je popsáno v příkladu 1. Získá se 0,47 g čistého krystalického 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu (výtěžek 69 %) a 0,15 g nezreagovaného stigmasterolu.

Příklad 4

K 1000 ml živného média popsaného v příkladu 1 se před sterilisací přidá vodná mikrosuspense připravená z 1,0 g směsi sterolů izolovaných z desodoračního kondensátu (složení: 46 % hmotnostních β -sitosterolu, 32 % kampesterolu, 11 % brasikasterolu, 6 % cholesterolu a 4,5 % stigmasterolu). Po sterilisaci 30 minut při 120 °C a po ochlazení na kultivační teplotu 30 °C se živné médium zaočkuje 50 ml 24 hodin starého submersního inokula *Mycobacterium* sp. CCM 3528 a inkubuje se na reciprokém třepacím stroji 90 hodin. Produkty biotransformace se z kultivačního média extrahují a izolují jak je popsáno v příkladu 1. Získá se 0,39 g čistého krystalického 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu (výtěžek 67 %) a 0,28 g směsi nezreagovaných sterolů.

Příklad 5

K 1000 ml živného média popsaného v příkladu 1 se před sterilisací přidá vodná mikrosuspense připravená z 1,0 g směsi sterolů izolovaných z talového oleje (složení: 80 % hmotnostních β -sitosterolu a 20 % kampesterolu). Po sterilisaci 30 minut při 120 °C a po ochlazení na kultivační teplotu 30 °C se živné médium zaočkuje 50 ml 24 hodin starého submersního inokula *Mycobacterium* sp. CCM 3528 a inkubuje se na reciprokém třepacím stroji 90 hodin. Produkty biotransformace se z kultivačního média extrahují a pak izolují jak je popsáno v příkladu 1. Získá se 0,51 g čistého krystalického 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu (výtěžek 68 %) a 0,06 g směsi nezreagovaných sterolů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

235 660

Způsob výroby 22-hydroxy-23,24-bisnorchola-1,4-dien-3-onu mikrobiálním odštěpením části postranního řetězce sterolů, např. cholesterolu, β -sitosterolu, stigmasterolu, kampesterolu, brasikasterolu, ergosterolu nebo směsi dvou nebo více sterolů, popřípadě produktů jejich oxidace nebo jejich 3-esterů, vyznačující se tím, že se ke štěpení využívá činnosti enzymů mutantu *Mycobacterium* sp. CCM 3528 při výchozí koncentraci steroidního substrátu 0,02 % až 1 % hmot. a při pH reakční směsi v rozmezí hodnot 6,0 až 8,8, za aerobních podmínek.