

На правах рукописи

Ядерец Вера Владимировна

Разработка методов направленного 11 β - и 14 α -гидроксилирования стероидов

03.01.06. «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2011

Работа выполнена в Центре «Биоинженерия» Российской Академии
Наук

Научные руководители:

кандидат химических наук
Андрюшина Валентина
Александровна;

Официальные оппоненты:

кандидат биологических наук
Войшвилло Наталия Евгеньевна

доктор химических наук
Заварзин Игорь Викторович

кандидат биологических наук
Мурыгина Валентина Павловна

Ведущая организация

Московский государственный
университет пищевых
производств.

Защита диссертации состоится 22 марта 2011 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета.

Автореферат разослан 21 февраля 2011 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Пискункова Н.Ф.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время в медицине и ветеринарии в качестве лекарственных средств, как правило, используются модифицированные аналоги стероидных гормонов, обладающие более сильным и направленным действием, не отягощенным побочными эффектами. Особое место среди модифицированных стероидов занимают гидроксилсодержащие стероиды, поскольку введение гидроксила в любое положение молекулы приводит либо к повышению ее биологической активности, либо к изменению направленности действия, причем на активность влияет не только положение, но и пространственная ориентация гидроксигруппы относительно стероидного скелета.

Так, например, гидроксигруппа при C₁₆ - за глюкокортикоидную активность. Введение гидроксила в 9 α -положение стероидной молекулы приводит к интермедиатам, широко используемым в фармацевтической практике для синтеза фторированных кортикоидов противовоспалительного и антиаллергического действия. Гидроксилированные в 14 α -положение андростаны являются важными интермедиатами синтеза высокоактивных гестагенов, а 11 α -гидроксилирование прегнановых производных повышает гестагенный и контрацептивный эффект. Избирательное гидроксилирование в 11 β -положение стероидной молекулы приводит к синтезу высокоактивных кортикостероидов противовоспалительного и антиаллергического действия, таких как гидрокортизон, преднизолон, триамцинолон, дексаметазон и др., многие из которых входят в список жизненно необходимых и имеют неограниченное практическое использование в онкологии, пульмонологии, дерматологии, ревматологии и других областях медицины. [Fernandes P. et al. 2003].

Спрос на стероидные лекарственные препараты в мире с каждым годом возрастает, что объясняется ухудшением экологии и ростом в связи с этим онкологических, аллергических и других заболеваний. Эта ситуация диктует необходимость поиска путей синтеза новых высокоактивных аналогов стероидов с улучшенными терапевтическими свойствами. Опыт синтеза новых стероидных соединений, являющихся структурными аналогами природных гормонов, и изучения их активности, открывает перспективу дальнейших исследований с целью создания новых эффективных препаратов, приемлемых в медицине и ветеринарии в лечебных целях и для регуляции рождаемости. Поэтому тема настоящего исследования, посвященная синтезу гидроксил-содержащих стероидов, обладающих высокой и пролонгированной активностью, не отягощенной сопутствующими побочными эффектами, является чрезвычайно актуальной.

Состояние вопроса. Химический синтез стероидных соединений труден и многостадийен и, как правило, наиболее сложным этапом этого синтеза является введение гидроксильной группы. Поэтому проблема селективного гидроксилирования относится к числу важнейших в химии стероидов. И только микробиологическое гидроксилирование позволяет заменить многостадийный химический синтез одностадийной биоконверсией. Поэтому

при модификации стероидной молекулы предпочтение отдается микробиологической трансформации, отличающейся стерео- и региоспецифичностью, недоступной химическим методам и не требующей предварительной защиты имеющихся в молекуле функциональных групп. Немаловажную роль играет в этом случае и экологическая безопасность. Зачастую, микробиологическое гидроксирование является единственно возможным методом. [Fernandes P. et al. 2003].

Однако, несмотря на полувековую историю применения микробиологических методов трансформации стероидов, процесс гидроксирования по-прежнему остается наименее изученным. Недостаточно сведений о зависимости направленности микробиологического гидроксирования от структуры стероидного субстрата и таксономического положения микроорганизма-трансформатора.

Используемые в известных способах синтеза штаммы недостаточно селективны, процесс гидроксирования проводится при низких нагрузках стероидного субстрата с низкими выходами целевых продуктов, а образующиеся многочисленные побочные продукты значительно затрудняют стадии выделения и очистки.

Продолжает оставаться неизвестной физиологическая роль гидроксирования стероидов грибами, у которых скорость, направление и ориентация трансформации зависят от вида микроорганизма, трансформируемого субстрата и ряда физико-химических факторов. Поэтому актуален поиск новых продуцентов с высокой стерео – и региоспецифической гидроксилазной активностью и подбор условий, позволяющих осуществлять данный процесс селективно с максимальным выходом целевого продукта.

В настоящее время идентифицированы различные микроорганизмы, использование которых позволяет осуществить почти все возможные трансформации стероидной молекулы. Из них наибольшую практическую значимость имеют следующие реакции: гидроксирование ($7\alpha/\beta$, 9α -, $11\alpha/\beta$ -, 14α -, $15\alpha/\beta$, 16α -), 1,2-дегидрирование и селективное отщепление боковой цепи стероидов и желчных кислот, получившие промышленное применение в производстве стероидных лекарственных препаратов.

Объектами настоящего исследования являются практически значимые процессы направленного 11β - и 14α -гидроксирования, открывающие пути синтеза новых модифицированных стероидов с ценными фармакологическими свойствами.

Анализ фактического материала, накопленного к настоящему времени, свидетельствует о том, что, в отличие от 11α -гидроксирования, которое осуществляют достаточное число микроорганизмов, способность к накоплению 11β -гидроксистероидов с удовлетворительным выходом, но в смеси с 11α -гидроксипродуктами, присуща ограниченному количеству видов грибов (*Absidia orchidis*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella elegans*, *Cochliobolus lunatus*). И только штаммы *Curvularia lunata* (коллекций - ATCC, IFO, NRRL, ВКМ, ВКПМ и др.) из 35 известных видов широко

распространенного в природе плесневого гриба рода *Curvularia*, проводят гидроксирование Δ^4 -3-кетостероидов преимущественно в 11 β -положение и применяются в промышленности для получения гидрокортизона и его производных.

Несмотря на внушительное число исследований, выполненных с различными штаммами грибов и, главным образом с *C. lunata*, особого прогресса в процессе 11 β -гидроксирования не наблюдается: используемые штаммы далеки от совершенства, а нагрузки субстратов невысоки.

Что касается 14 α -гидроксирования, то интерес к этой реакции обусловлен тем, что 14 α -гидроксистероиды или сами по себе обладают физиологической активностью, или открывают путь к синтезу соединений с высокой контрацептивной и канцеролитической активностью [Yoshioka H. et al. 1994]. Однако в мировой практике используются только несколько препаратов этого ряда, что объясняется трудностью их синтеза, а конкретно - сложностью введения гидроксильной группы в стерически затрудненное 14 α -положение. Кроме того, микробиологическое 14 α -гидроксирование по сравнению с 9 α - и 11 β -гидроксированием менее изучено.

В целом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что не смотря на большое количество работ, посвященных проблемам 11 β - и 14 α – гидроксирования, многие вопросы, имеющие ключевое значение для решения проблемы селективности и повышения эффективности этих процессов остаются недостаточно изученными.

Поэтому представлялось целесообразным разработать и оптимизировать методы направленного 11 β - и 14 α -гидроксирования, обеспечивающие селективность процесса, а также максимальную нагрузку исходного субстрата и выход целевого продукта. Кроме того, планировалось на основе полученных гидроксистероидов разработать схему синтеза гестагенов нового поколения (аналогов пролигестона) и изучить их биологическую активность.

Цели и задачи работы. Основной целью работы являлась разработка методов направленного 11 β - и 14 α -гидроксирования стероидной молекулы, открывающих путь к синтезу высокоактивных аналогов стероидных лекарственных препаратов.

В ходе работы необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Выявить наиболее активные штаммы со способностью к 11 β - и 14 α -гидроксированию стероидов андростанового и прегнанового рядов;
2. Провести селекционные работы с выбранными штаммами для разработки способов 11 β - и 14 α -гидроксирования с повышенными нагрузками стероидных субстратов;
3. Исследовать взаимосвязь между строением стероидной молекулы и направлением реакций гидроксирования с помощью выбранных микроорганизмов;
4. Разработать эффективный способ 14 α -гидроксирования андростендиона как первой стадии синтеза препаратов для медицины и ветеринарии антигонадотропного и канцеролитического действия;

5. Разработать эффективный способ 11 β -гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов для синтеза высокоактивных аналогов стероидных лекарственных препаратов;

6. Провести исследования по синтезу пролигестона и его аналогов из андростендиона и наработать 14 α -гидроксилированные производные прегнана для изучения их биологической активности.

Научная новизна работы. Методом лабораторной селекции при непосредственном участии автора получен новый штамм *Curvularia lunata* с маркером резистентности к антибиотику генетицину “G-418”, отличающийся от известных штаммов высокой селективностью в процессе 11 β -гидроксилирования. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-988 и защищен патентом РФ № 2399674 (Бюл. Изобр. № 26 от 20.09.2010).

Впервые с использованием штамма *C. lunata* ВКПМ F-988 разработан способ направленного 11 β -гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов, который может быть использован при разработке биотехнологических методов получения новых лекарственных препаратов противовоспалительного и антиаллергического действия.

Впервые с использованием штамма *C. lunata* ВКПМ F-981, полученного ранее в лаборатории биотехнологии стероидов, разработан способ направленного 14 α -гидроксилирования Δ^4 -3,17-дикетоандростенов, перспективных в синтезе новых стероидных препаратов канцеролитического, контрацептивного и антигонадотропного действия. На способ 14 α -гидроксилирования получен патент РФ № 2 407 800 (Бюл. Изобр. № 36 от 27.12.2010).

Оптимизированы процессы 11 β - и 14 α -гидроксилирования новыми штаммами грибов, что позволило значительно увеличить нагрузку некоторых стероидных субстратов в реакциях гидроксилирования грибами.

Осуществлен синтез пролигестона из основного предшественника андростендиона с использованием на первой стадии разработанного метода направленного 14 α -гидроксилирования.

Впервые показана возможность использования 14 α -гидроксикортексолона в качестве интермедиата в синтезе гестагенов нового поколения.

Впервые получен новый аналог пролигестона с высокой контрацептивной активностью.

Практическая значимость работы. Результаты работы являются основой новых биотехнологических методов получения ценных гидроксистероидов, которые или сами по себе обладают высокой биологической активностью или являются полупродуктами синтеза новых высокоэффективных аналогов стероидов.

Полученные в процессе исследования штаммы могут быть использованы в промышленном производстве стероидных лекарственных препаратов с уникальной фармакологической активностью.

Проведенная оптимизация способов направленного 11 β - и 14 α -гидроксилирования стероидов позволит использовать эти методы при масштабировании процессов синтеза гидроксилсодержащих стероидных аналогов с ценными терапевтическими свойствами.

Разработан способ получения гестагенов нового поколения и показана их высокая контрацептивная активность.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 сообщение, 5 тезисов и 2 патента РФ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: I Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» (2007, Пушкино), XX зимней международной молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (2008, Москва), XXVIII Российской Школе «Наука и технология» (2008, Миасс), V Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (2009, Москва), Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова. (2009, Москва), Международной конференции «Передовые технологии российских инноваторов» (2010, Париж.)

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа содержит 115 страниц печатного текста, 11 таблиц, 38 рисунков. Библиография включает 153 наименований, из них 123 иностранных работ.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Культивирование микроорганизмов. Культивирование мицелиальных грибов, используемых в работе, за исключением *Rhizopus nigricans*, проводили в жидкой среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20.0, пептон – 5.0, дрожжевой экстракт – 5.0, соевая мука – 10.0, рН = 6.0-6.3. Среда для выращивания *R. nigricans* содержала (г/л): глюкоза – 10.0, кукурузный экстракт – 15.0, КН₂РО₄ – 1.0, рН = 5.4-5.6. Культуры выращивали в 70-100мл среды в колбах Эрленмейера объемом 750 мл в течение 72 ч при температуре 29°C и скорости перемешивания 220 об/мин. Посевной материал (10% об.) переносили в свежую среду того же состава. Для получения рабочего мицелия продолжали инкубацию в течение 24-48 ч. Для трансформации в условиях растущей культуры через 16-18 ч роста вносили стероидный субстрат в виде раствора в метаноле (2 % об.) в количестве 0.5-1.0 г/л.

Получение гриба *C. lunata*, устойчивого к генетицину “G-418”.

Клоны гриба, резистентные к генетицину, получали методом ступенчатой селекции на указанной выше агаризованной среде в чашках Петри, но содержащей антибиотик в определенной концентрации. Был получен штамм, обладающий способностью к росту на среде с генетицином в количестве 80 мкг/мл. Агаризованную среду с антибиотиком максимальной концентрации использовали для поддержания культуры.

Трансформацию стероидов отмытым мицелием *C. lunata* проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл при температуре 28-29°C и скорости перемешивания 220 об/мин. В качестве среды для трансформации использовали 1/15 М фосфатный буфер, pH = 6.0 – 6.2, который разливали в колбы по 50-70 мл. Стероидные субстраты вносили в виде растворов в органических растворителях (диметилформамид (ДМФА), метанол (MeOH), количество которых составляло 4% об, а также в виде тонко измельченного порошка или в виде комплекса с метилциклодекстрином (МЦД).

Аналитические методы.

ТСХ. Пробы стероидов экстрагировали этилацетатом (1:2 об.) и анализировали на пластинках Silufol UV 250 нм (Чехословакия) и Sorbfill UV 250 нм (Россия), используя систему хлороформ/ацетон (7:3). Для анализа трансформации 5-олефинов использовали цветные реакции, для чего пластинки опрыскивали растворами сульфата церия или ванилина в водных растворах серной или хлорной кислот и нагревали до 70-80° С.

ВЭЖХ анализ проводили на колонке “Нуклеосил C₁₈” 250 x 4.0 мм. Подвижная фаза – смесь 70% метанола с 30% воды, подкисленной концентрированной ортофосфорной кислотой (1 мл кислоты на 1 л воды). Скорость подвижной фазы – 1.2 мл/мин. Детекция в УФ при 240 нм, чувствительность 0.05 ед. ОП на шкалу. Пробы вводили инжектором с дозирующей петлей, вместимостью 10 мкл. Определение проводили при комнатной температуре. Концентрация стандартов - 1 мг/мл.

Выделение продуктов трансформации. Мицелий *C. lunata* отфильтровывали, промывали водой и проверяли с помощью ТСХ содержание в нем стероидов. При их наличии мицелий экстрагировали этилацетатом. Фильтрат (трансформационная среда) и промывную воду объединяли и экстрагировали до полного извлечения стероидов. Объединенный экстракт осветляли активированным углем и упаривали на ротонном испарителе. Полученный остаток сушили до постоянного веса и анализировали с помощью ТСХ. Для получения индивидуальных соединений использовали метод кристаллизации в органическом растворителе (метаноле). Многокомпонентные смеси разделяли препаративной хроматографией на стеклянных пластинках Merck Kieselgel 40 F₂₅₄ или на колонке с SiO₂ 40-100 мк. На колонке выделяли также побочные соединения, которые накапливались в маточных растворах при перекристаллизации стероидов.

Выход соединений рассчитывали по формуле $Q=100 \cdot P / (S \cdot (M_p / M_s))$, где P - вес выделенного кристаллического продукта, S – количество взятого в

реакцию субстрата, M_p - молекулярный вес продукта, M_s - молекулярный вес субстрата.

Хроматографирование на пластинке. 20-25 мг смеси стероидов растворяли в 1-2 мл хлороформа или в смеси хлороформ/метанол (1:1) и наносили на пластинку (20x20 см), которую помещали в систему хлороформ/ацетон (4:1). Распределение полос со стероидами определяли на УФ-хроматоскопе или проявляя раствором ванилина в хлорной кислоте. Сорбент, содержащий определенный стероид, снимали с пластинки и промывали хлороформом на фильтре Шотта. Растворитель упаривали и выделяли кристаллический продукт, который промывали эфиром. Структуру веществ подтверждали ПМР-спектроскопией.

Хроматографирование на колонке. Многокомпонентную смесь растворяли в хлороформе и заливали на колонку, заполненную силикагелем из расчета 1 г смеси на 50 мл силикагеля. Элюировали смесью хлороформ/ацетон от 7:1 до 4:1, контролируя появление целевого стероида с помощью ТСХ. Элюат упаривали, кристаллический остаток промывали эфиром. Предполагаемую структуру подтверждали ПМР-спектроскопией.

Протонный магнитный резонанс (ПМР) использовали для идентификации продуктов трансформации. Спектры ПМР снимали на ПМР-спектрометре XL-400 («Varian» США) в $CDCl_3$ или в смеси $CDCl_3$ и DMSO.

Все эксперименты проведены три раза в трех повторностях. Результаты представлены усредненными значениями. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью Excel (MS Office 2007).

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

2.2.1. Разработка способа 14 α -гидроксилирования.

2.2.1.1. Выбор способа гидроксилирования. Для синтеза биологически активных 14 α -гидроксилсодержащих прегнанов последнего поколения, в частности препарата пролигестона, возможны два подхода. Первый включает первоначальное построение диоксиацетоновой цепи у андростанов (5 химических стадий) с последующим одностадийным микробиологическим введением гидроксильной группы в 14 α -положение.

Согласно второму пути, сначала осуществляется введение 14 α -гидроксигруппы химическим или микробиологическим способом в молекулу стероида и последующим наращиванием прегнановой боковой цепи до получения целевого продукта.

Исходными соединениями в обоих вариантах являются андростендион (АД) и дегидроэпиандростерон (ДЭА) – полупродукты синтеза стероидных препаратов из растительного сырья. Первоначально мы проверили возможность введения гидроксильной группы при C_{14} с помощью химических реакций.

К сожалению опробованные нами варианты синтеза оказались неудачны: Нам не удалось получить 14 α -ОН-АД химическим путем, а выход 14 α -ОН-ДЭА не превысил 35%. Это согласуется с известными из литературных

источников данными по химическим методам 14 α -гидроксилирования, отличающимся жесткими условиями реакций и чрезвычайно низкими выходами.

Прямое введение кислородной функции в неактивное положение стероидного ядра на стыке колец С и D стероидной молекулы (intact ring system) было осуществлено путем окисления хромовым ангидридом 5,6-дибромида ацетата ДЭА в уксусной кислоте в безводных условиях по методу Физера с последующим дебромированием продукта реакции. Однако данный способ оказался малоэффективным. Таким образом, микробиологическое 14 α -гидроксилирование оказалось предпочтительнее.

2.2.1.2. Исследование гидроксилазной активности плесневых грибов.

Кортексолон (**в-во «S»**) – основное соединение в синтезе биологически активных стероидных соединений, а после введения 14 α -гидроксигруппы и удаления гидроксильной группы в 21-положении может быть рассмотрено как ценный интермедиат в синтезе гестагенов нового поколения.

Поэтому, на первом этапе исследования была проведена работа по поиску культур, способных вводить 14 α -гидроксильную группу в молекулу АД, ацетата ДЭА (АДЭА), в-во «S». Для исследования были выбраны культуры, имеющиеся в коллекции Центра «Биоинженерия» РАН: *Cunninghamella blakesleeana* ВКМ F-993, *Cunninghamella echinulata* ВКМ F-1059, *Curvularia lunata* ВКПМ F-981, *Helicostylum piriforme* ВКМ F-1068, *Mortierella isabellina* ВКМ F-1626, *Rhizopus nigricans* LBS, *Thieghemella hyalospora* LBS. Основанием для такого выбора служили литературные данные о способности штаммов этих микроорганизмов к образованию 11- и 14-гидроксипроизводных Δ^4 -3-кетостероидов ряда андростана и прегнана.

Результаты представлены в табл.1.

Таблица 1.

Гидроксилирование в-ва «S», АД и АДЭА плесневыми грибами

Культура	Субстраты, реакции					
	«S»		АД		АДЭА	
	основная реакция	побочная реакция	основная реакция	побочная реакция	основная реакция	побочная реакция
<i>C. lunata</i>	11 β -	14 α -	14 α	17-CO -> 17 β -ОН	7 α	-
<i>C. blakesleeana</i>	11 α -	11 β -	н/пр	14 α -следы	7 α	н/пр
<i>C. echynulata</i>	11 α -	11 β -	н/пр	14 α -следы	7 α	н/пр
<i>H. piriforme</i>	н/пр		н/пр		7 α	н/пр
<i>M. isabellina</i>	11 α -	11 β -	н/пр		7 α	17-CO -> 17 β -ОН
<i>T. hyalospora</i>	11 α -	11 β -	17-CO -> 17 β -ОН		7 α	н/пр
<i>R. nigricans</i>	11 α -	6 β -	11 α -	6 β -	11 α -	11 α -

Прим. н/пр – смесь неидентифицированных продуктов; 17-CO -> 17 β -ОН – восстановление кетогруппы при С₁₇; (-) – отсутствие реакции.

Как видно из представленных данных, 14 α -гидроксилирование как основная реакция протекала только при гидроксилировании АД с помощью культуры *C. lunata*. Наблюдалось образование 14 α -гидрокси-АД (**14 α -ОН-АД**), а в качестве побочного соединения - 11 β -гидрокси-тестостерона (**11 β -ОН-ТС**) (см. рис.1). При трансформации в-во «S» для всех штаммов, кроме *H. piriforme*, отмечена способность вводить в в-во «S» 11-гидроксигруппу. И только при трансформации с помощью *C. lunata* наблюдалось образование 14 α -производного, но в качестве побочного продукта (рис.2).

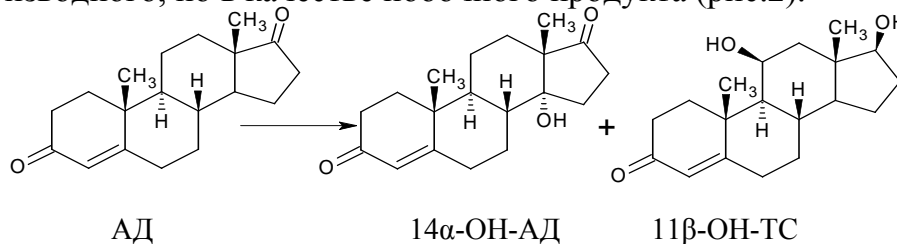


Рис. 1. Гидроксилирование АД *C. lunata*.

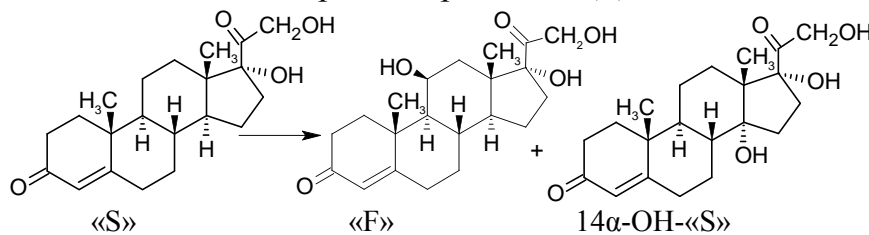


Рис. 2. Гидроксилирование «S» *C. lunata*.

Для культуры *R. nigricans*, в отличие от *C. lunata*, характерна одинаковая направленность гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов ряда прегнана (в-во «S») и андростана (АД). При наличии 11 α -/11 β -гидроксилазной активности по отношению к в-ву «S», хотя и слабой, у культур *C. blakesleeana*, *C. echinulata*, *M. isabellina* при гидроксилировании АД наблюдалось образование смеси трудно разделяемых гидроксипроизводных. Тем не менее, в культуральной жидкости грибов рода *Cunninghamella* зафиксировано присутствие 14 α -ОН-АД в следовых количествах. В ряде случаев идентифицированы продукты восстановления C_{17} -кетогруппы, т.е. происходила реакция, которая является первым шагом к деструкции кольца D. Следовательно, т.н. смесь не идентифицированных продуктов могла состоять из целого ряда гидроксипроизводных, образующихся на разных стадиях разрушения стероидной молекулы.

Исключением являются эксперименты с культурой *T. hyalospora*, которая гидроксилировала в-во «S» и АДЭА, но АД только восстанавливала в ТС, который оказался основным продуктом трансформации, что для данной культуры показано впервые.

У исследуемого штамма *H. piriforme* способность вводить 14 α -гидроксигруппу в в-во «S» и АД не обнаружена, хотя согласно литературным данным [Hu S.-h. et al. 1995] этот вид образует 14 α -гидроксипроизводные из ТС, АД и прогестерона (Δ^4 ПГ).

Таким образом, для 11 β - и 14 α -гидроксилирования был выбран штамм *C.lunata* F-981, полученный ранее в нашей лаборатории методом селекции при непосредственном участии автора.

2.2.1.2. Выбор субстрата для синтеза 14 α -гидроксилированных производных прегнана. С целью выбора субстрата для синтеза гестагенов нового поколения был проведен анализ продуктов трансформации стероидов андростанового, прегнанового и эстранового рядов. Идентификация продуктов гидроксилирования проводилась с помощью ПМР-спектроскопии. Концентрация исходных соединений – 1г/л. Результаты представлены на рис.3 и 4.

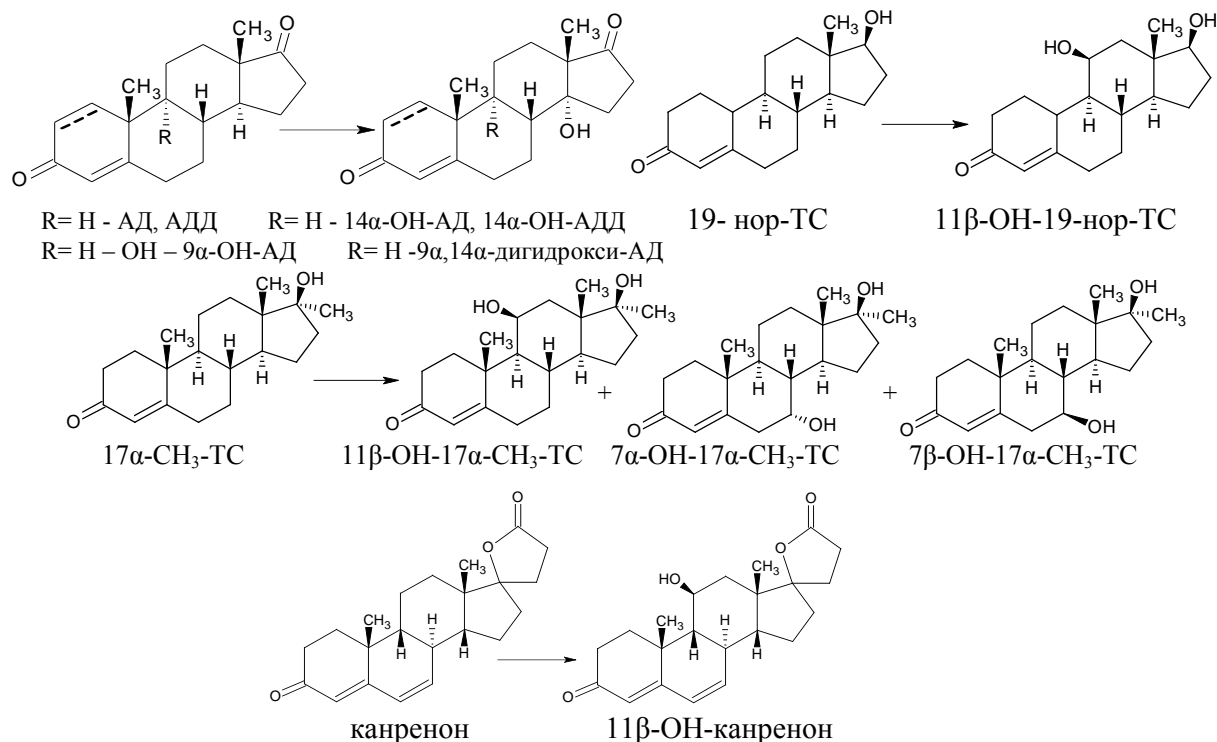


Рис. 3. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетоандростенов *C.lunata*.

Установлено, что основными продуктами гидроксилирования Δ^4 -3-кето-прегнанов мицелием *C. lunata* являются 11 β -гидроксистероиды. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетоандростенов с кетогруппой при С₁₇ – андростадиендиона (АДД), АД и 9 α -гидрокси-АД (9 α -ОН-АД) происходило в основном в 14 α -положение. Гидроксилирование 17-гидрокси-андростенов – канренона и ТС происходило так же, как и гидроксилирование прегнанов, – в 11 β -положение. А при трансформации 17 α -метил-тестостерона (17 α -СН₃-ТС) помимо 11 β -гидроксилирования, наблюдалось введение гидроксильной группы в 7 α - и 7 β -положения.

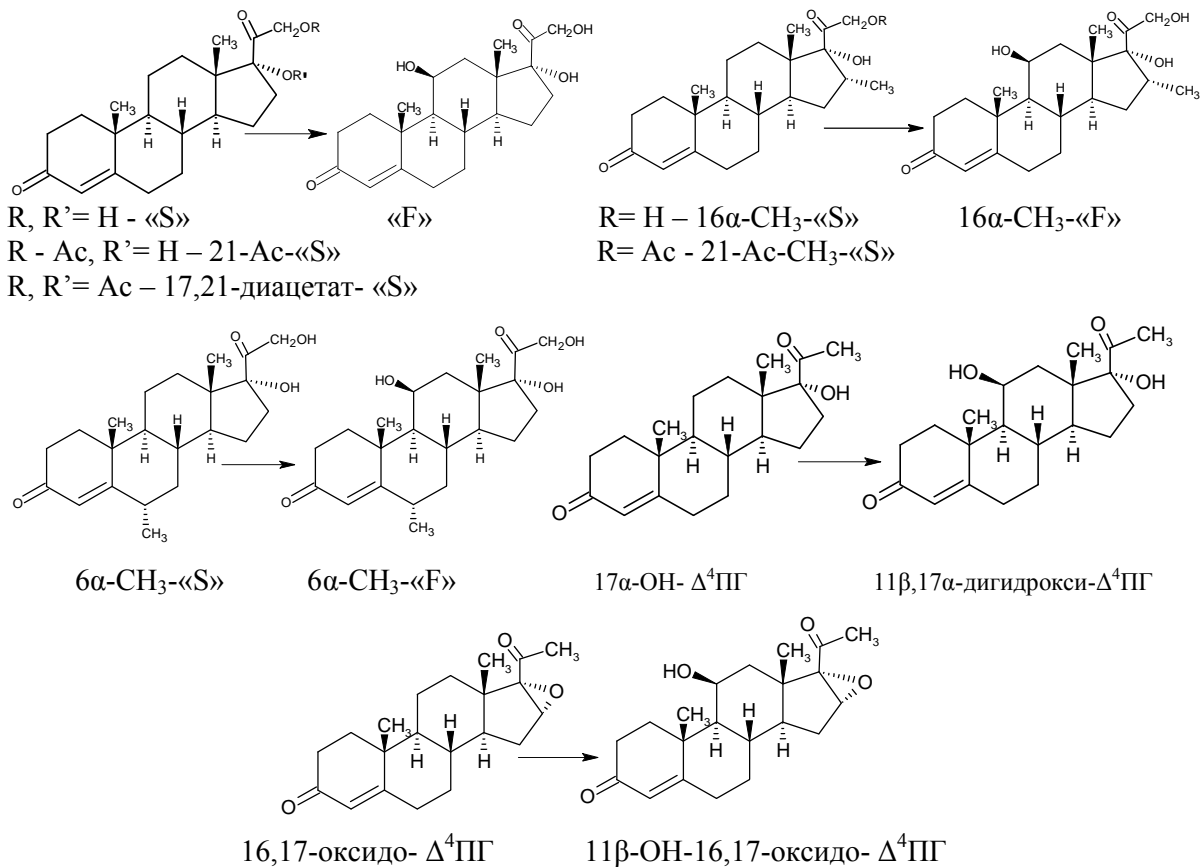


Рис. 4. Гидроксилирование Δ^4 -3-кетопрегнанов *C. lunata*.

Данные гидроксилирования АД, ТС и $17\alpha\text{-CH}_3\text{-ТС}$ отчетливо демонстрируют зависимость положения и ориентации вводимой гидроксильной группы от структуры стероидной молекулы. Они хорошо согласуются с основными положениями теории направленного гидроксилирования, разработанной проф. Джонсом с сотр. для $5\alpha\text{-H}$ -стероидов, согласно которой направление вводимой в стероиды гидроксигруппы определяется структурой стероидной молекулы, определяющей в свою очередь ее ориентацию по отношению к активному центру фермента [Jones E. R. H. 1973].

Особый интерес представляло получение 14α -гидроксипроизводного CN-АД, поскольку метод построения из данного соединения прегнановой боковой цепи известен и легко осуществим [Патент РФ № 2156255]. Однако вместо него при микробиологическом гидроксилировании CN-АД (рис. 5.) получили с низким выходом $14\alpha\text{-OH}$ -АД (не более 30%), причем при концентрации субстрата не выше 0.5 г/л. По-видимому, ингибирующее влияние циангидринной группировки не способствовало образованию нужного продукта, к тому же сама эта группировка оказалась неустойчивой в условиях гидроксилирования.

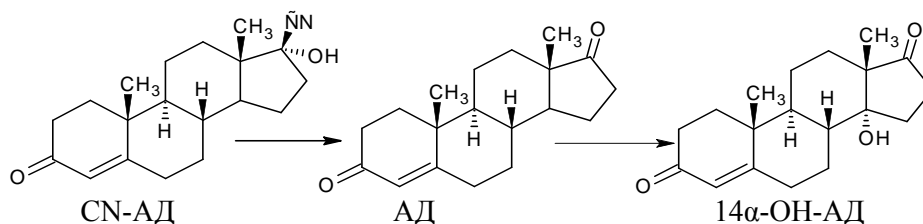


Рис. 5. Гидроксилирование CN-АД (0.5 г/л) *C. lunata*.

На основании полученных результатов, для оптимизации условий микробиологического 14 α -гидроксилирования был выбран АД (рис. 2).

В связи с высокой гидрофобностью указанного субстрата были проведены эксперименты по определению его оптимального количества. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица № 2.

Трансформация АД и накопление продуктов гидроксилирования

Концентрация АД, г/л	Время трансформации, ч	Степень конверсии АД, %	Содержание продуктов гидроксилирования, %	
			14 α -ОН-АД	11 β -ОН-ТС
2.0	28	80	58	15
3.0	40	50	42	следы
4.0	40	40	30	следы

Как видно из табл. 2, наибольшая степень конверсии АД и максимальное содержание 14 α -ОН-АД (55-58%), имели место при нагрузке исходного не выше 2 г/л.

Можно предположить, что концентрация АД является лимитирующим фактором при его трансформации с помощью мицелия *C. lunata*. В нашем случае из-за высокой гидрофобности АД, большая его часть оставалась недоступной для стероидных гидроксилаз и концентрация 2.0 г/л являлась предельной.

2.2.1.3. Поиск путей регуляции 11 β /14 α -гидроксилазной активности *C. lunata*. В связи со способностью выбранной культуры образовывать 11 β - и 14 α -гидроксипроизводные в обоих рядах проводилась работа по поиску условий, позволяющих проводить процессы более селективно. Известно, что на гидроксилазную активность влияют возраст микроорганизма-трансформатора и его количество, состав ростовой и трансформационной сред, наличие в среде индукторов ферментной активности или веществ, влияющих на проницаемость клеточной стенки, способы внесения трансформируемых субстратов и т.п. В ряде случаев показано, что изменение указанных факторов помогает регулировать как скорость, так и соотношение основных продуктов.

Как видно из табл. 3 и 4 наибольшей стероид-гидроксилазной активностью обладает мицелий, возраст которого соответствует 24 ч. Однако, оптимальное количество биомассы, необходимое для эффективного превращения в-ва «S» (4.0 г/л) и АД (2.0 г/л) в в-во «F» (гидрокортизон) и в

14 α -ОН-АД соответственно, различно. Для трансформации в-ва «S» оно составляет 13.5-15.0 г/л (сухой вес), для АД – 9.5 – 10.5 г/л. В оптимальных условиях была достигнута степень конверсии в-ва «S» - не ниже 90%, содержание в-ва «F» – 60%; степень конверсии АД - 80-85%, содержание 14 α -ОН-АД – 60%.

Таблица 3.

Потребление «S» и накопление основных продуктов трансформации в зависимости от возраста мицелия и его количества

Возраст мицелия, ч	Время тр-ии, ч	Содержание АД и продуктов гидроксилирования, %					
		АД		14 α -ОН-АД		11 β -ОН-ТС	
		биомасса*, г/л					
		1	2	1	2	1	2
24	24	следы	-	60	50	10	20
48	24	-	0,2	40	45	следы	10

Прим.* 1 – 9,5-10 г/л; 2 – 13,5-15 г/л.

Таблица 4.

Потребление АД и накопление основных продуктов трансформации в зависимости от возраста мицелия и его количества

Возраст мицелия, ч	Время тр-ии, ч	Содержание «S» и продуктов гидроксилирования, %					
		«S»		«F»		14 α -ОН-S	
		биомасса*, г/л					
		1	2	1	2	1	2
24	26	10	-	55	62	10	15
48	26	15	следы	47	52	8	7

Прим.* 1 – 9,5-10 г/л; 2 – 13,5-15 г/л.

Необходимо отметить, что увеличение биомассы с 9.5 до 15.0 г/л при трансформации АД привело к интенсификации процессов восстановления и и увеличению содержания таких побочных продуктов, как ТС и 11 β -ОН-ТС (схема гидроксилирования АД представлена на рис. 6).

Также известно [Суходольская Г.В. и др, 1986], что для мицелия *C. lunata*, находящегося в стационарной фазе роста, что соответствует 48 ч, характерна более высокая 14 α -гидроксилазная активность по отношению к в-ву «S». Однако в нашем случае эти данные не были подтверждены, и лучшие результаты получены с культурой в середине экспоненциальной фазы роста (24 ч). Можно предположить, что происходящие со временем морфофизиологические изменения клетки приводят к изменению массообменных процессов, и в результате трудно растворимые стероиды становятся недоступными для стероидных гидроксилаз. Подтверждением сказанного является тот факт, что мицелий, находящийся в стационарной фазе роста, имеет черный цвет в отличие от светлокорицневой окраски растущего мицелия, что свидетельствует о накоплении меланина в клетке. [Lanisnik R. et al. 2003]. Поэтому, если предположить, что гидроксилирование

стероидов – это одна из стадий их детоксикации, то защищенный меланином мицелий становится невосприимчивым к внешним экзогенным веществам, в том числе и к стероидам.

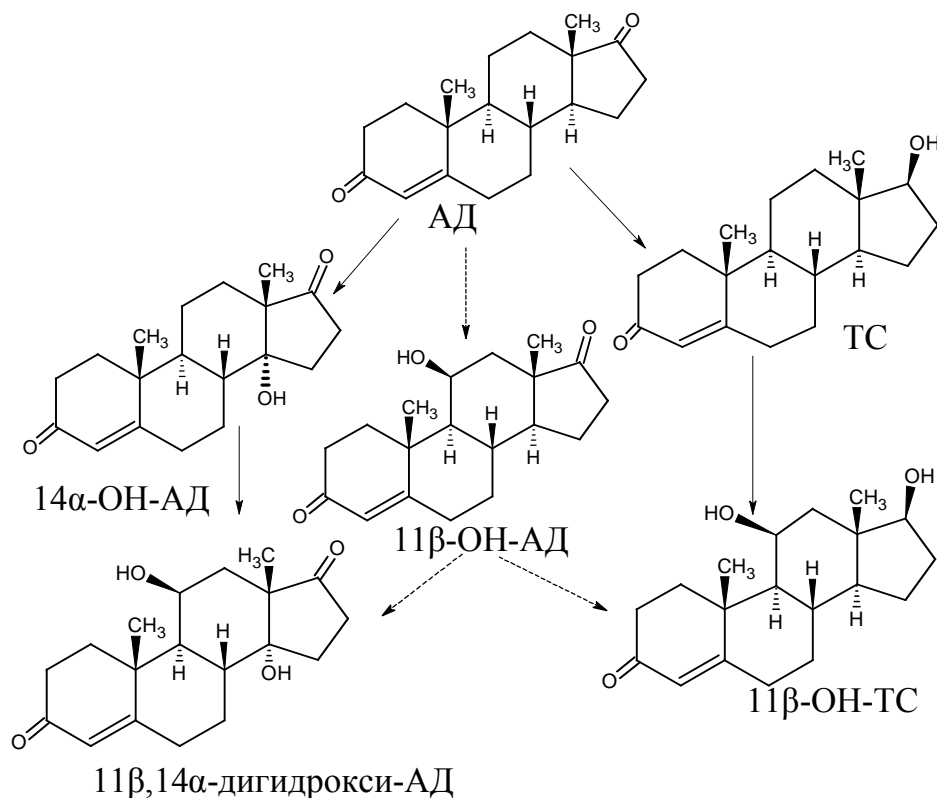


Рис. 6. Продукты трансформации АД *S. lunata* ВКПМ F-981

Не привело к увеличению активности мицелия и выращивание его в среде, содержащей индукторы, в качестве которых мы использовали АД, в-во «S», Δ⁴ПГ и ДЭА в количестве 0.2 г/л. Литературные данные также подтверждают конститутивную природу 11β-гидроксилазы [Smith K. E et. al. 1994.]

Конверсия в-ва «S» (4.0 г/л) и АД (2.0 г/л) в буферах разного состава не выявила существенных различий в накоплении в-ва «F» и 14α-OH-АД соответственно или соотношении основных реакций к побочным. (рис. 7 и 8)

Примечание к рис. 7 и 8: 1 – фосфатный буфер (контроль); 2 – цитратный буфер; темные символы – в-во «S», АД; светлые – в-во «F», 14α-OH-АД.

Во всех приведенных примерах степень конверсии исходных соединений и выход целевых продуктов были практически одинаковыми. Для в-ва «S» степень конверсии составляла 90%, содержание в-ва «F» не превышало 60%, содержание 14α-OH-«S» -15%; степень конверсии АД - 80-85%, содержание 14α-OH-АД – 60%, 11β-OH-ТС – 15%.

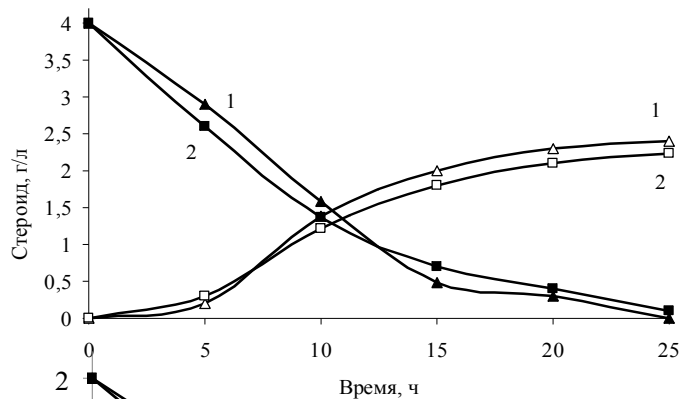


Рис. 7. Потребление «S» и накопление «F».

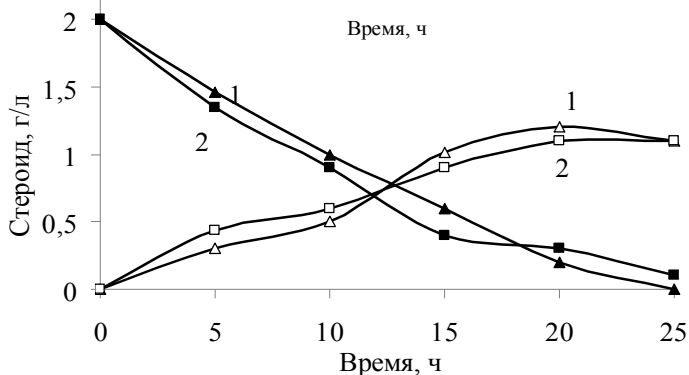


Рис. 8. Потребление АД и накопление 14α-OH-АД

Согласно литературным данным, некоторые растворители, солюбилизаторы и поверхностно активные вещества позволяют регулировать как скорость реакции, так и выход, и соотношение основных продуктов трансформации. [Horhold C. et al. 1999]

Влияние ДМФА и МеОН на потребление в-ва «S» (4.0 г/л) и АД (2.0 г/л) и соответственно накопление в-ва «F» и 14α-OH-АД показано на рис. 9-10.

Примечание к рис. 9-10: способ внесения субстратов: 1- микрокристаллы (контроль); 2 – 4% р-р ДМФА; 3 – 4% р-р МеОН.

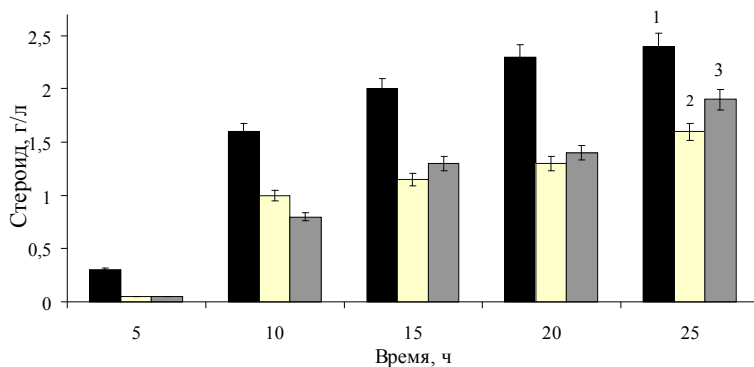


Рис. 9. Накопление в-ва «F» в присутствии растворителей.

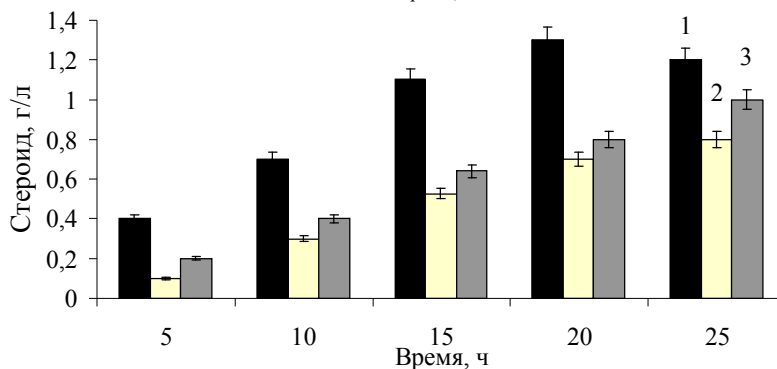


Рис. 10. Накопление 14α-OH-АД в присутствии растворителей.

В присутствии ДМФА и MeOH отмечено частичное ингибирование биоконверсии в-ва «S» и АД. Наблюдалось уменьшение степени конверсии исходных соединений (с 85% для контрольных образцов до 50% в варианте с ДМФА), и уменьшение выхода целевых продуктов (с 60% до 40% в варианте с ДМФА).

2.2.1.4. Селекционные работы с культурой *C. lunata* ВКПМ F-981.

Несмотря на то, что гидроксилазы низших грибов содержат ионы некоторых тяжелых металлов, влияние последних на выход основного и побочного продуктов гидроксилирования изучено недостаточно. Известно, что выход гидроксипродуктов, образуемых *C. lunata*, возрастал в присутствии Fe^{2+} , но не Cu^{2+} , а накоплению побочных 6β - и 14α -гидроксистероидов, образуемых *C. blakesleeana*, способствовали ионы Zn^{2+} .

Совместно с сотруд. лаборатории биоинженерии антибиотиков Центра «Биоинженерия» РАН были получены клоны *C. lunata* ВКПМ F-981 с устойчивостью к тяжелым металлам (Co, Mo и Cu). Мы рассчитывали найти среди полученных мутантов клоны гриба, отличающиеся биохимическими и физиологическими свойствами от исходного штамма.

Гидроксилазную активность проверяли по отношению к в-ву «S» у клонов, резистентных к ионам Co^{2+} и Cu^{2+} , так как при максимальной исследуемой концентрации солей 2% молибден не ингибировал рост гриба. На средах с Co^{2+} и Cu^{2+} ингибирование роста происходило при концентрациях 0.45 и более 0.5% соответственно.

Следует заметить, что мицелий, выращенный на агаровой среде, содержащей токсичные для него дозы солей тяжелых металлов (0.4% $CoCl_2$ или 0.45 и 0.5% $CuSO_4$), и перенесенный в жидкую питательную среду, не содержащую указанные соли, отличался от контрольного варианта наличием черной пигментации уже на ранней стадии роста.

Таблица 5.

Гидроксилирование 4 г/л «S» мицелием *C. lunata*, выращенным в присутствии солей меди и кобальта.

Концентрация солей в агаровой среде, %	Стероиды в реакционной смеси, %		
	«S»	«F»	14 α -ОН-«S»
$CuSO_4$, 0.2	15	49	12
$CuSO_4$, 0.35	следы	42	11
$CoCl_2$, 0.3	13	40	7.5
Контроль	7	58	16

У клонов, резистентных к солям в максимальной концентрации (0.4% Co^{2+} и 0.5% Cu^{2+}) полностью отсутствовала гидроксилазная активность. Мицелий, выращенный при более низких концентрациях ионов Co^{2+} и Cu^{2+} ,

проявлял гидроксилазную активность по отношению к в-ву «S», но меньшую по сравнению с контролем (табл. 5).

Уменьшение гидроксилазной активности мицелия, резистентного к солям тяжелых металлов, можно объяснить несколькими способами. С одной стороны, используемые соли могут быть ингибиторами гидроксилазных ферментов, и поэтому реакции протекают с меньшей скоростью, или же, исходя из предположения о том, что гидроксилирование в-ва «S» является следствием реакции детоксикации, то защищенный меланином мицелий становится более устойчив к токсичным для него экзогенным веществам, присутствующим в окружающей среде. Однако не исключено, что увеличение содержания меланина в клетке приводит к такому изменению клеточной проницаемости, когда стероид становится недоступным ферментным системам.

Наряду с ранее рассмотренными путями повышения стероид трансформирующей активности микроорганизмов особое внимание уделяется применению водорастворимых стероидных комплексов [W. Lu et al. 2007], для образования которых используют различные производные циклодекстринов (ЦД). При разработке способа 14 α -гидроксилирования наряду с другими параметрами (варьирование температуры, pH, способа внесения субстрата, использование ПАВ, индукторов, растворителей и др.) мы использовали ранее найденный в нашей лаборатории для процессов гидроксилирования универсальный солубилизатор - МЦД. В результате были подобраны оптимальные условия для трансформации АД с нагрузкой 6.0 г/л, (количество биомассы 14.5-15 г/л) (табл. 6). По найденному способу была проведена наработка 14 α -ОН-АД для разработки метода синтеза пролигестона и его аналогов.

Таблица 6.

Трансформация АД мицелием *S. lunata* ВКПМ F-981 в присутствии МЦД*

Время тр-ии, ч	Субстрат и продукты трансформации			
	АД	14 α -ОН-АД	ТС	11 β -ОН-ТС
	Содержание стероидов в реакционной смеси, %			
18	30	35	10	следы
24	22	44	13,5	5
40	6	60	15	9
46	следы	58	10	12

*Прим. соотношение стероид/МЦД 1:5 (весовое).

Разработанная технология 14 α -гидроксилирования с помощью культуры *S. lunata* ВКПМ F-981 была подтверждена на примерах получения 14 α -гидроксипроизводных Δ^4 -3,17-дикетоандростенов (АД, АДД и 9 α -ОН-АД). Помимо оптимизации условий микробиологической трансформации, были

разработаны условия выделения и очистки целевых гидроксипродуктов с высокими выходами и качеством. И на разработанный способ 14α -гидроксилирования стероидов получен патент РФ № 2407800 от 27.12.2010 Бюл. Изобр. № 36.

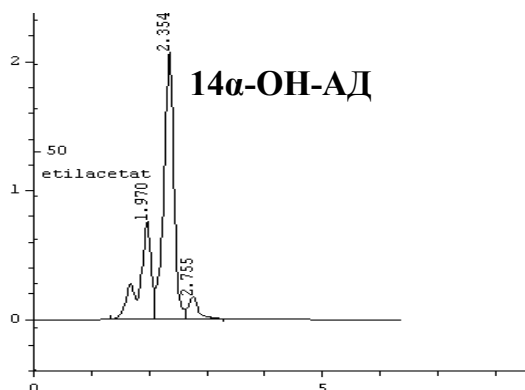


Рис. 11. Содержание 14α -ОН-АД в трансформационной среде при 6 г/л АД (46 ч, ВЭЖХ).

2.2.2. Разработка способа 11β -гидроксилирования.

2.2.2.1. Трансформация в-ва «S» мицелием *C. lunata*, резистентным к генетицину «G418». До настоящего времени гидроксилирование «S» изучалось только с целью получения «F», и образование 14α -ОН-«S» рассматривалось как нежелательный побочный процесс. Поэтому достаточное количество исследований сводилось к поиску методов гидроксилирования, позволивших свести побочные процессы гидроксилирования «S» к минимуму. Однако, мы рассматривали 14α -ОН-«S» как ценный интермедиат в синтезе гестагенов нового поколения. Поэтому наши дальнейшие усилия были направлены на определение оптимальных условий гидроксилирования не только с целью получения «F», но и ценного интермедиата - 14α -ОН-«S».

Одним из способов увеличения гидроксилазной активности микроорганизмов является получение мутантов, устойчивых к воздействию различных экзогенных факторов. [Paraszkiwicz K. et al. 1998.]

Полученный методами селекции совместно с лабораторией биоинженерии антибиотиков клон гриба, устойчивый к антибиотику генетицину “G-418” (80 мкг/мл), был проверен на способность к 11β -гидроксилированию в-ва «S» при нагрузках 4.0-20.0 г/л. Результаты представлены в табл. 7.

Подобранные условия 11β -гидроксилирования с новым штаммом позволили увеличить нагрузку «S» с 4.0 до 20.0 г/л, что существенно превышает известные литературные данные. Можно отметить как высокие степень конверсии исходного соединения и скорость 11β -гидроксилирования, так и высокий выход гидроксипродуктов.

Наряду с образованием «F» с выходом 60% при нагрузке 20 г/л, удалось достигнуть выхода 14 -ОН-«S» до 25%, который далее был использован в синтезе производных пролигестона.

Таблица 7.

Трансформация «S» мицелием гриба *C. lunata* ВКПМ F-988

Нагрузка, г/л	Способ внесения	Время тр-ции, ч	Степень конверсии, %	Выход выделенных продуктов трансформации, %	
				«F»	14 α -ОН-«S»
4.0	микрокристаллы	20	90	62	10
10.0	микрокристаллы	48	92	44	15
	комплекс с МЦД	28	91.5	64	15
15.0	комплекс с МЦД	28	96	62	20
20.0	комплекс с МЦД	48	98	60	25

Штамм *C. lunata*, устойчивый к антибиотику генетицину «G-418» и обладающий высокой 11 β -гидроксилазной активностью, был депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-988.

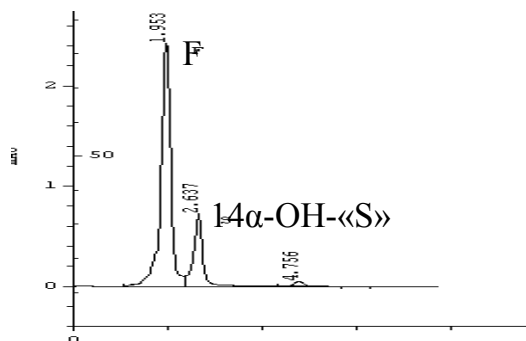


Рис. 12. Состав реакционной среды при трансформации «S» 20 г/л. (48 ч, ВЭЖХ)

2.2.2.2. 11 β -гидроксилирование 16 α -метил-кортексолона (16 α -CH₃-«S») с помощью *C. lunata* ВКПМ F-988. Высокая 11 β -гидроксилазная активность нового штамма была подтверждена на примере получения 11 β -гидроксипроизводного основного предшественника дексаметазона - 16 α -CH₃-«S», полученного нами ранее из АД серией химических реакций.

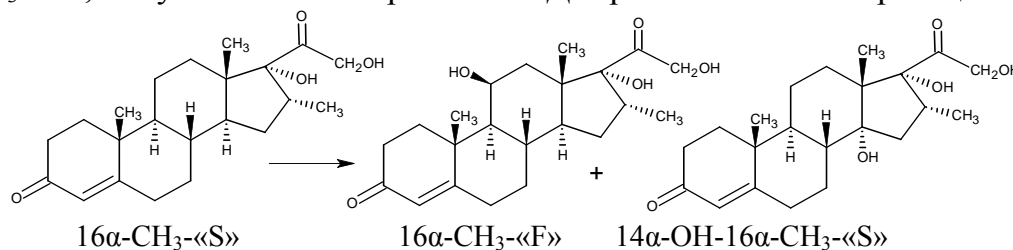


Рис. 13. Гидроксилирование 16 α -CH₃-«S» с помощью мицелия *C. lunata* ВКПМ F-988.

Как следует из табл. 8, концентрация 2.0 г/л для 11 β -гидроксилирования 16 α -CH₃-«S» является оптимальной (в виде микрокристаллов). И только

использование МЦД позволило увеличить нагрузку стероида до 10.0 г/л, при которой трансформация заканчивалась через 48 ч, степень конверсии составила 80%, а содержание 16 α -CH₃-«F» не ниже 50% (см. табл. 8).

Таблица 8.

Гидроксилирование 16 α -CH₃-«S» *C. lunata* ВКПМ F-988

Нагрузка, г/л	Способ внесения	Время тр-ции, ч	Степень конверсии исходного субстрата, %	Содержание основных продуктов гидроксилирования, %	
				16 α -CH ₃ -F	14 α -OH-16 α -CH ₃ -«S»
1.0	микрокристаллы	18	85	65	10
2.0	микрокристаллы	24	80	55	20
4.0	микрокристаллы	32	50	40	следы
	комплекс с МЦД	26	80	60	15
10	комплекс с МЦД	48	80	50	15

Помимо оптимизации условий процесса 11 β -гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов новым штаммом, были подобраны оптимальные условия выделения и очистки гидроксипродуктов. На способ 11 β -гидроксилирования с помощью *C. lunata* ВКПМ F-988 получен патент РФ № 2399674 от 20.09.2010.

2.2.3. Синтез пролигестона и его аналога. Согласно литературным данным, основными способами построения прегнановой цепи являются циангидринный метод и конденсация с ацетиленом. Хорошо отработанный на АД циангидринный метод в нашем случае не дал положительного результата из-за сложности подхода CN-иона с α -стороны стероидной молекулы, которая стерически блокирована гидроксильной группой при C₁₄. При ацетиленовом синтезе атака с α -стороны стероидной молекулы также является предпочтительной, а образующийся 17 β -гидрокси-17 α -замещенный стероид с помощью химических реакций превращается в нужный изомер.

Но существует ряд работ [EU Pat 0189951], в которых показана возможность образования 14 α ,17 α -дигидрокси-17 β -замещенных стероидов. Основным способом получения данного изомера является реакция взаимодействия 14 α -гидрокси-17-кетостероидов с металлорганическими соединениями, такими как ацетилиды щелочных металлов (K, Na, Li), или реактивом Гриньяра. Мы остановили свой выбор на известном способе проведения ацетиленового синтеза в присутствии сильного основания и эпиамина, который способствует получению нужного 17 β -этинил,17 α -гидроксипроизводного.

В результате проведенной работы из полученного нами 14 α -OH-АД был синтезирован пролигестон, формула которого представлена на рис. 14.

Помимо 14 α -ОН-АД в синтезе пролигестона и его аналогов может быть использован и 14 α -ОН-«S» после предварительного удаления гидроксильной группы при С₂₁. Однако в своей работе мы использовали непосредственно 14 α -ОН-«S», и в результате проведенной работы было получено ранее не описанное в литературе аналог пролигестона, структурная формула которого указана на рис. 14.

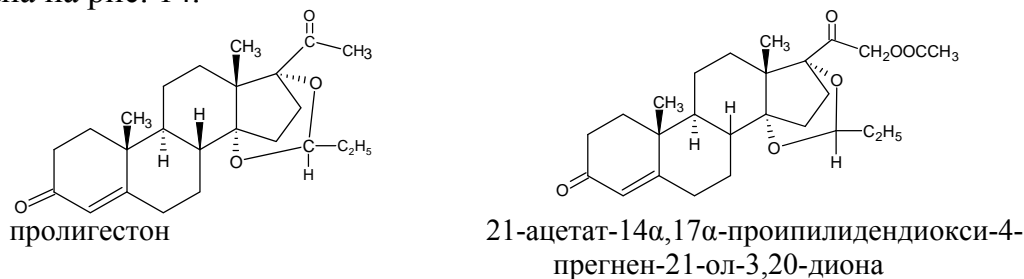


Рис. 14. Структурные формулы пролигестона и его аналога.

Указанные соединения были направлены в Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН для исследования их контрацептивной активности, которое проводилось в комбинации с этинилэстрадиолом в соотношении 1:20. Опыты осуществлялись на половозрелых белых крысах-самках линии «Вистар» массой 200-250 г (опыт №1) и 180-200 (опыт №2) г. Животные были получены из питомника «Рапполово» и содержались в регламентированных условиях вивария НИИАГ им. Д.О. Отта РАМН при соблюдении всех правил содержания лабораторных животных.

Изучаемые эстроген-гестагенные комбинации вводили в виде масляного раствора (растворитель – растительное масло) в желудок (перорально) в объеме 0,3 мл с использованием зонда в течение 14 дней. Доза этинилэстрадиола и гестагена во всех исследованиях была одинаковой и составила 0,04 мг/кг и 0,8 мг/кг соответственно. Животные контрольной группы получали растительное масло в том же объеме и в те же сроки, что и животные подопытных групп.

Результаты представлены в табл. 9-10.

Таблица 9.

Исследование контрацептивной активности (КА) пролигестона (0.8 мг/кг) в комбинации с этинилэстрадиолом (0.04 мг/кг)

Группа животных	Количество крыс в группе				КА, %
	всего	покрытых	беременных	небеременных	
контрольная	15	14	14	0	0
подопытная группа	17	11	0	11	100

Таблица 10.

Исследование контрацептивной активности (КА) 21-ацетат-14 α ,17 α -пропилидендиокси-4-прегнен-21-ол-3,20-диона (0.8 мг/кг) в комбинации с этинилэстрадиолом (0.04 мг/кг)

Группа животных	Количество крыс в группе				КА, %
	всего	покрытых	беременных	небеременных	
контрольная	15	12	12	0	0
подопытная группа	11	7	0	7	100

Результаты экспериментального исследования контрацептивной активности (табл. 9-10) показали, что оба исследуемых препарата в количестве 0.8 мг/кг в комбинации с этинилэстрадиолом (0.04 мг/кг) обладают 100%-ной контрацептивной активностью.

Полученные результаты могут послужить основой для расширения спектра контрацептивных препаратов нового поколения, обладающих такими преимуществами, как высокая пролонгированная активность и отсутствие побочных действий.

3. ВЫВОДЫ:

1. Изучена субстратная специфичность *C. lunata* ВКПМ F-981 и показана зависимость направленности гидроксирования от строения стероидной молекулы.

2. Разработан метод направленного 14 α -гидроксирования стероидов с помощью штамма *C. lunata* ВКПМ F-981 как первой стадии синтеза высокоактивных препаратов для медицины и ветеринарии антигонадотропного, контрацептивного и канцеролитического действия. Способ позволяет достигнуть полной конверсии АД за 48 ч с нагрузкой 6.0 г/л, и выходом 14 α -ОН-АД 60%. На способ получен Патент РФ №2 407 800 (Бюл. Изобр. №36 от 27.12.2010)

3. Разработан способ направленного 11 β -гидроксирования стероидов с помощью нового штамма *C. lunata* ВКПМ F-988. Способ позволяет проводить 11 β -гидроксирование кортексолона с нагрузкой до 20 г/л за 48 ч трансформации с выходом гидрокортизона 60% и может быть использован в промышленном масштабе для синтеза высокоактивных глюкокортикостероидных препаратов противовоспалительного, антиаллергического и противошокового действия. На способ получен патент РФ №2399674 (Бюл. Изобр. №26 от 20.09.2010).

4. Подобраны оптимальные условия 11 β -гидроксирования 16-метилсодержащих аналогов кортексолона, позволяющие получать полупродукты синтеза дексаметазона и других фторированных противовоспалительных кортикостероидов с выходом 50% при нагрузке субстрата 10 г/л, что значительно превышает мировые стандарты.

5. Разработана схема синтеза пролигестона и его аналогов из 3,17-дикетоандростенов (АД, АДД и 9 α -ОН-АД) - полупродуктов синтеза стероидных лекарственных препаратов из растительного сырья.

6. Проведен синтез пролигестона из 14 α -ОН-АД, полученного микробиологическим путем по разработанному способу.

7. Получен ранее не описанный в литературе аналог пролигестона - 21-ацетат-14 α ,17 α -пропилидендиокси-4-прегнен-21-ол-3,20-диона - из 14 α -ОН-«S» с высокой контрацептивной активностью.

Список публикаций по теме диссертации:

1. **Ядерц В.В.**, Андриюшина В.А., Бартошевич Ю.Э., Домрачева А.Г., Новак М.И., Стыценко Т.С., Войшвилло Н.Е. Изучение стероидгидроксилирующей активности мицелия *Curvularia lunata*.//Прикладная биохимия и микробиология. 2007. Т.43. № 6. С.: 695-700.

2. **Ядерц В. В.**, Андриюшина В. А., Войшвилло Н. Е., Стыценко Т.С., Зейналов О. А. Изучение путей синтеза биологически активных 14 α -гидроксилированных стероидов.//Хим. – Фарм. журнал. 2009. № 1. С.: 37-40.

3. Андриюшина В.А. Войшвилло Н.Е. Дружинина А.В., Стыценко Т.С., **Ядерц В.В.**, Скрябин К.Г., Бартошевич Ю.Э., Новак М.И., Домрачева А.Г. Способ 11 β -гидроксилирования Δ^4 -3-кетостероидов.//Патент РФ № 2399674 (Бюл. № 26 от 20.09.2010)

4. **Ядерц В.В.**, Андриюшина В.А., Войшвилло Н.Е., Двойников П.С., Стыценко Т.С., Зейналов О.А., Скрябин К.Г. Способ получения 14 α -гидроксипроизводных Δ^4 -3,17-дикетоандростенов.//Патент РФ № 2407800 (Бюл. Изобрет. № 36 от 27.12.2010.)

5. **Ядерц В.В.**, Войшвилло Н.Е., Стыценко Т.С., Егоров И.М. Поиск условий селективного гидроксилирования стероидов с помощью гриба *Curvularia lunata*.//Тезисы докладов VII Международного форума «Биотехнология и современность». С.- Петербург, 14-16 июня. 2006. С.: 29- 30.

6. **Ядерц В.В.** Поиск путей регуляции 14 α /11 β -гидроксилирования стероидов грибом *Curvularia lunata* путем изменения условий выращивания и трансформации.//Тезисы конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты». Пушино, 24-25 мая. 2007. 42 с.

7. **Ядерц В.В.** Исследования в области синтеза биологически активных гидроксилсодержащих стероидов.//Наука и технологии. Краткие сообщения 28-ой Российской школы. Миасс, 24-28 июня. 2008. С.: 58-60.

8. **Ядерц В.В.** Разработка способа направленного микробного гидроксилирования для синтеза стероидных препаратов нового поколения.//Тезисы V Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 16-20 марта. 2009. С.: 226-227.

9. **Ядерц В.В.** Особенности гидроксилирования стероидов плесневым грибом *Curvularia lunata* ВКПМ F-981.//Тезисы международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова. Москва, 28 сентября – 1 октября. 2009. Т.2. С.: 276-279.

10. **Ядерц В.В.** Инновационные технологии для получения стероидных фармацевтических субстанций.//Доклад на конференции «Передовые технологии российских инноваторов». Париж, 25-27 ноября. 2010.

Автор выражает глубокую признательность своим научным руководителям к.х.н. Андриюшиной В.А. и к.б.н. Войшвилло Н.Е. за всестороннюю поддержку при выполнении диссертации, к.х.н. Стыценко Т.С. за неоценимую помощь при планировании и выполнении работы, Соловьёвой Н.П. за помощь в снятии и интерпретации ПМР спектров, Комбаров С.П. за ценные советы, также всем сотрудникам лабораторий биотехнологии стероидов и биоинженерии антибиотиков Центра «Биоинженерия» РАН.