

На правах рукописи

**Ядерец Вера Владимировна**

# **Разработка методов направленного 11 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 C<sub>16</sub> - за глюкокортикоидную активность. Введение гидроксила в 9 $\alpha$ -положение стероидной молекулы приводит к интермедиатам, широко используемым в фармацевтической практике для синтеза фторированных кортикоидов противовоспалительного и антиаллергического действия. Гидроксилированные в 14 $\alpha$ -положение андростаны являются важными интермедиатами синтеза высокоактивных гестагенов, а 11 $\alpha$ -гидроксилирование прегнановых производных повышает гестагенный и контрацептивный эффект. Избирательное гидроксилирование в 11 $\beta$ -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 регио-специфичностью, 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 регио-специфической 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 ( $7\alpha/\beta$ ,  $9\alpha$ -,  $11\alpha/\beta$ -,  $14\alpha$ -,  $15\alpha/\beta$ ,  $16\alpha$ -), 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  $11\beta$ - и  $14\alpha$ -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  $11\alpha$ -гидроксирования, которое осуществляют достаточное число микроорганизмов, способность к накоплению  $11\beta$ -гидроксистероидов с удовлетворительным выходом, но в смеси с  $11\alpha$ -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  $\Delta^4$ -3-кетостероидов преимущественно в 11 $\beta$ -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 $\beta$ -гидроксирования не наблюдается: используемые штаммы далеки от совершенства, а нагрузки субстратов невысоки.

Что касается 14 $\alpha$ -гидроксирования, то интерес к этой реакции обусловлен тем, что 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -положение. Кроме того, микробиологическое 14 $\alpha$ -гидроксирование по сравнению с 9 $\alpha$ - и 11 $\beta$ -гидроксированием менее изучено.

В целом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что не смотря на большое количество работ, посвященных проблемам 11 $\beta$ - и 14 $\alpha$  – 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 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -гидроксированию стероидов андростанового и прегнанового рядов;
2. Провести селекционные работы с выбранными штаммами для разработки способов 11 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -гидроксирования андростендиона как первой стадии синтеза препаратов для медицины и ветеринарии антигонадотропного и канцеролитического действия;

5. Разработать эффективный способ 11 $\beta$ -гидроксилирования  $\Delta^4$ -3-кетостероидов для синтеза высокоактивных аналогов стероидных лекарственных препаратов;

6. Провести исследования по синтезу пролигестона и его аналогов из андростендиона и наработать 14 $\alpha$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -гидроксилирования  $\Delta^4$ -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 $\alpha$ -гидроксилирования  $\Delta^4$ -3,17-дикетоандростенов, перспективных в синтезе новых стероидных препаратов канцеролитического, контрацептивного и антигонадотропного действия. На способ 14 $\alpha$ -гидроксилирования получен патент РФ № 2 407 800 (Бюл. Изобр. № 36 от 27.12.2010).

Оптимизированы процессы 11 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -гидроксилирования.

Впервые показана возможность использования 14 $\alpha$ -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 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 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 C<sub>18</sub>” 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 F<sub>254</sub> или на колонке с SiO<sub>2</sub> 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 $\alpha$ -гидроксилирования.

**2.2.1.1. Выбор способа гидроксилирования.** Для синтеза биологически активных 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -положение.

Согласно второму пути, сначала осуществляется введение 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ОН-АД химическим путем, а выход 14 $\alpha$ -ОН-ДЭА не превысил 35%. Это согласуется с известными из литературных

источников данными по химическим методам 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда андростана и прегнана.

Результаты представлены в табл.1.

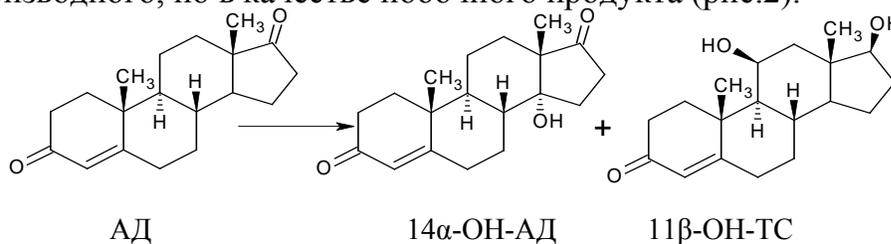
Таблица 1.

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

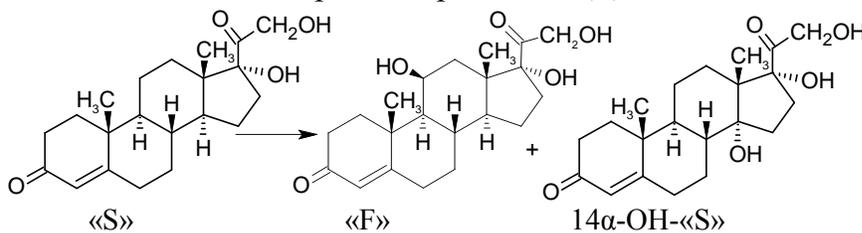
| Культура               | Субстраты, реакции |                  |                         |                         |                  |                         |
|------------------------|--------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|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

Прим. н/пр – смесь неидентифицированных продуктов; 17-CO -> 17 $\beta$ -ОН – восстановление кетогруппы при С<sub>17</sub>; (-) – отсутствие реакции.

Как видно из представленных данных, 14 $\alpha$ -гидроксилирование как основная реакция протекала только при гидроксилировании АД с помощью культуры *C. lunata*. Наблюдалось образование 14 $\alpha$ -гидрокси-АД (**14 $\alpha$ -ОН-АД**), а в качестве побочного соединения - 11 $\beta$ -гидрокси-тестостерона (**11 $\beta$ -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 $\alpha$ -производного, но в качестве побочного продукта (рис.2).



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



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

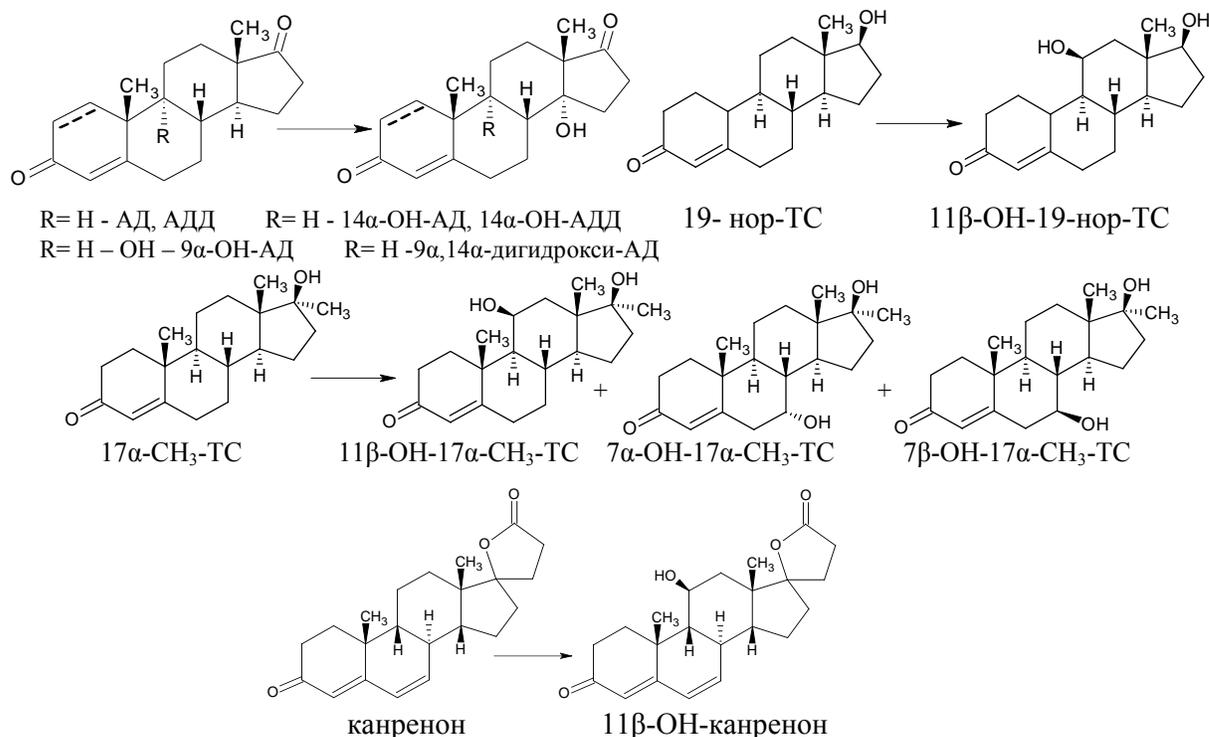
Для культуры *R. nigricans*, в отличие от *C. lunata*, характерна одинаковая направленность гидроксилирования  $\Delta^4$ -3-кетостероидов ряда прегнана (в-во «S»,) и андростана (АД). При наличии 11 $\alpha$ -/11 $\beta$ -гидроксилазной активности по отношению к в-ву «S», хотя и слабой, у культур *C. 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -гидроксигруппу в в-во «S» и АД не обнаружена, хотя согласно литературным данным [Hu S.-h. et al. 1995] этот вид образует 14 $\alpha$ -гидроксипроизводные из ТС, АД и прогестерона ( $\Delta^4$ ПГ).

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

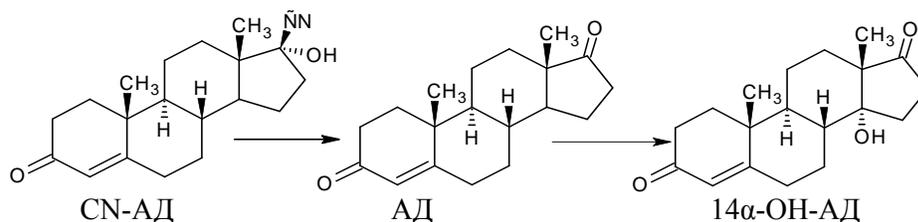
**2.2.1.2. Выбор субстрата для синтеза 14 $\alpha$ -гидроксилированных производных прегнана.** С целью выбора субстрата для синтеза гестагенов нового поколения был проведен анализ продуктов трансформации стероиднов андростанового, прегнанового и эстранового рядов. Идентификация продуктов гидроксилирования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



**Рис. 3.** Гидроксилирование  $\Delta^4$ -3-кетоандростенов *C.lunata*.

Установлено, что основными продуктами гидроксилирования  $\Delta^4$ -3-кето-прегнанов мицелием *C. lunata* являются 11 $\beta$ -гидроксистероиды. Гидроксилирование  $\Delta^4$ -3-кетоандростенов с кетогруппой при C<sub>17</sub> – андростадиендиона (АДД), АД и 9 $\alpha$ -гидрокси-АД (9 $\alpha$ -ОН-АД) происходило в основном в 14 $\alpha$ -положение. Гидроксилирование 17-гидрокси-андростенов – канренона и ТС происходило так же, как и гидроксилирование прегнанов, – в 11 $\beta$ -положение. А при трансформации 17 $\alpha$ -метил-тестостерона (17 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-ТС) помимо 11 $\beta$ -гидроксилирования, наблюдалось введение гидроксильной группы в 7 $\alpha$ - и 7 $\beta$ -положения.





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

На основании полученных результатов, для оптимизации условий микробиологического 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ОН-АД                        | 11 $\beta$ -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 $\alpha$ -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 $\beta$ /14 $\alpha$ -гидроксилазной активности *C. lunata*.** В связи со способностью выбранной культуры образовывать 11 $\beta$ - и 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ОН-АД |    | 11 $\beta$ -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**

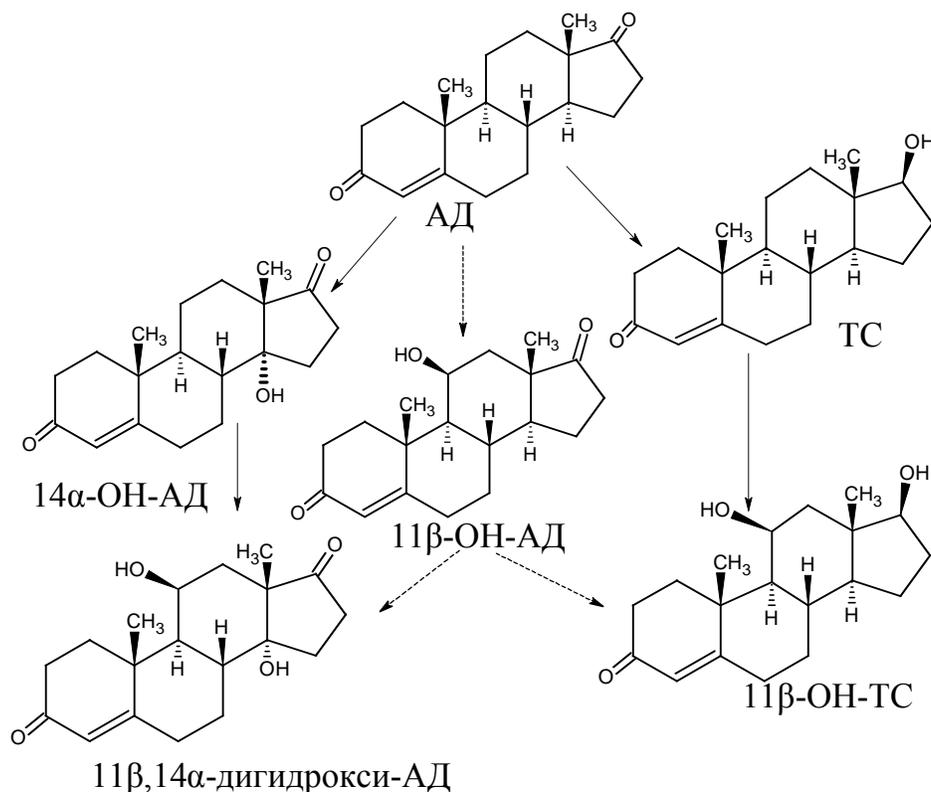
| Возраст мицелия, ч | Время тр-ии, ч | Содержание «S» и продуктов гидроксилирования, % |       |     |    |                   |    |
|--------------------|----------------|---|-------|-----|----|-------------------|----|
|                    |                | «S»   |       | «F» |    | 14 $\alpha$ -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 $\beta$ -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 $\alpha$ -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 светлорычневой 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.



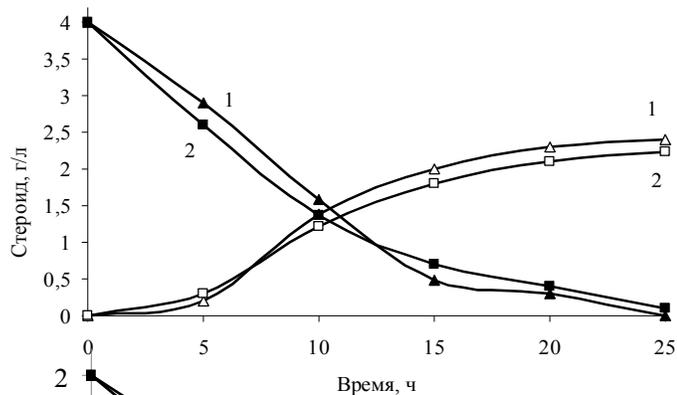
**Рис. 6.** Продукты трансформации АД *S. lunata* ВКПМ F-981

Не привело к увеличению активности мицелия и выращивание его в среде, содержащей индукторы, в качестве которых мы использовали АД, в-во «S», Δ<sup>4</sup>ПГ и ДЭА в количестве 0.2 г/л. Литературные данные также подтверждают конститутивную природу 11β-гидроксилазы [Smith K. E et. al. 1994.]

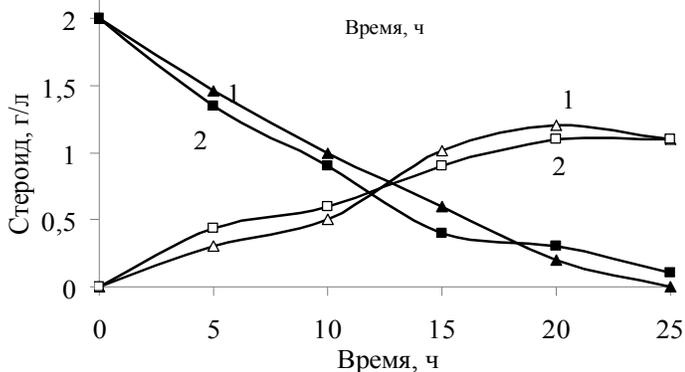
Конверсия в-ва «S» (4.0 г/л) и АД (2.0 г/л) в буферах разного состава не выявила существенных различий в накоплении в-ва «F» и 14α-OH-АД соответственно или соотношении основных реакций к побочным. (рис. 7 и 8)

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».

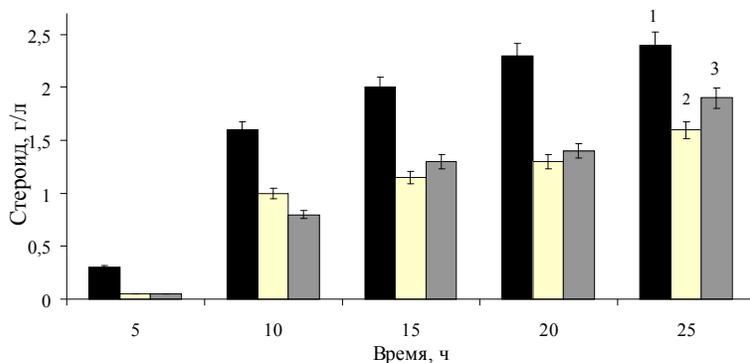


**Рис. 8.** Потребление АД и накопление 14α-ОН-АД

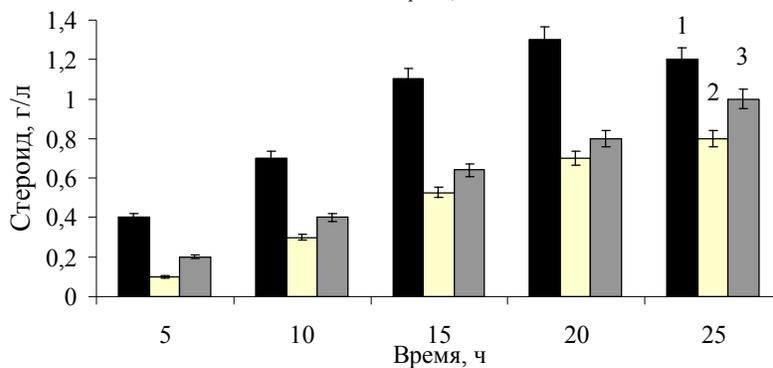
Согласно литературным данным, некоторые растворители, солюбилизаторы и поверхностно активные вещества позволяют регулировать как скорость реакции, так и выход, и соотношение основных продуктов трансформации. [Horhold C. et al. 1999]

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-ОН-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-ОН-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  $6\beta$ - и  $14\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ОН-АД для разработки метода синтеза пролигестона и его аналогов.

**Таблица 6.**

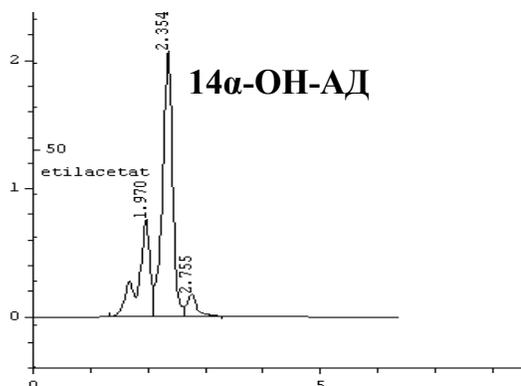
**Трансформация АД мицелием *S. lunata* ВКПМ F-981 в присутствии МЦД\***

| Время тр-ии,<br>ч | Субстрат и продукты трансформации           |                    |      |                   |
|-------------------|---|--------------------|------|-------------------|
|                   | АД  | 14 $\alpha$ -ОН-АД | ТС   | 11 $\beta$ -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 $\alpha$ -гидроксилирования с помощью культуры *S. lunata* ВКПМ F-981 была подтверждена на примерах получения 14 $\alpha$ -гидроксипроизводных  $\Delta^4$ -3,17-дикетоандростенов (АД, АДД и 9 $\alpha$ -ОН-АД). Помимо оптимизации условий микробиологической трансформации, были

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



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

## 2.2.2. Разработка способа 11 $\beta$ -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 14 $\alpha$ -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 14 $\alpha$ -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 - 14 $\alpha$ -ОН-«S».

Одним из способов увеличения гидроксилазной активности микроорганизмов является получение мутантов, устойчивых к воздействию различных экзогенных факторов. [Paraszkiewicz 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 11 $\beta$ -гидроксилированию в-ва «S» при нагрузках 4.0-20.0 г/л. Результаты представлены в табл. 7.

Подобранные условия 11 $\beta$ -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 11 $\beta$ -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 $\alpha$ -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 $\beta$ -гидроксилазной активностью, был депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером F-988.

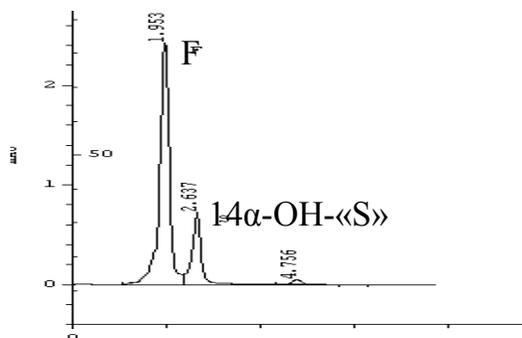


Рис. 12. Состав реакционной среды при трансформации «S» 20 г/л. (48 ч, ВЭЖХ)

**2.2.2.2. 11 $\beta$ -гидроксилирование 16 $\alpha$ -метил-кортексолона (16 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«S») с помощью *C. lunata* ВКПМ F-988.** Высокая 11 $\beta$ -гидроксилазная активность нового штамма была подтверждена на примере получения 11 $\beta$ -гидроксипроизводного основного предшественника дексаметазона - 16 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«S», полученного нами ранее из АД серией химических реакций.

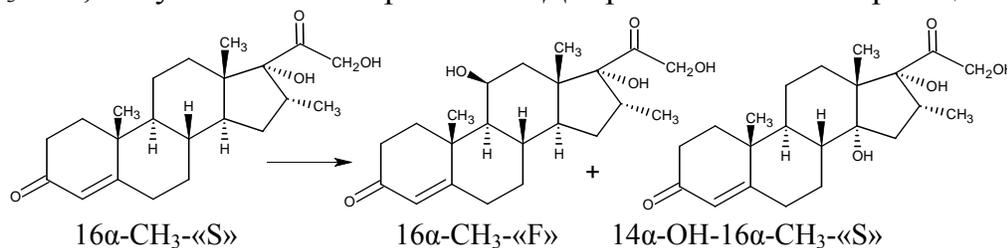


Рис. 13. Гидроксилирование 16 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«S» с помощью мицелия *C. lunata* ВКПМ F-988.

Как следует из табл. 8, концентрация 2.0 г/л для 11 $\beta$ -гидроксилирования 16 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«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 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«F» не ниже 50% (см. табл. 8).

Таблица 8.

**Гидроксилирование 16 $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-«S» *C. lunata* ВКПМ F-988**

| Нагрузка, г/л | Способ внесения | Время тр-ции, ч | Степень конверсии исходного субстрата, % | Содержание основных продуктов гидроксилирования, % |   |
|---------------|-----------------|-----------------|--|--|---|
|               |                 |                 |  | 16 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> -F                    | 14 $\alpha$ -OH-16 $\alpha$ -CH <sub>3</sub> -«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  |

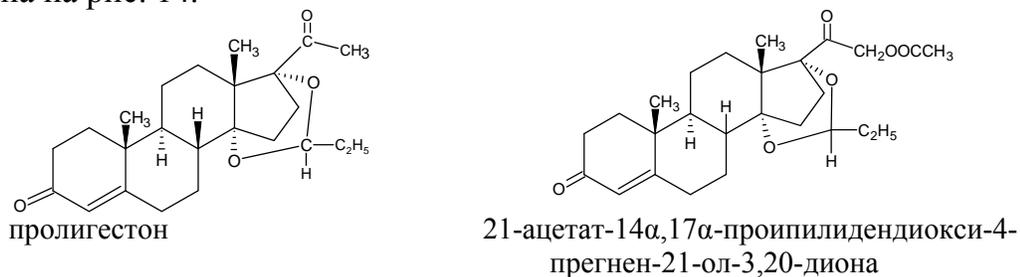
Помимо оптимизации условий процесса 11 $\beta$ -гидроксилирования  $\Delta^4$ -3-кетостероидов новым штаммом, были подобраны оптимальные условия выделения и очистки гидроксипродуктов. На способ 11 $\beta$ -гидроксилирования с помощью *C. lunata* ВКПМ F-988 получен патент РФ № 2399674 от 20.09.2010.

**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  $\alpha$ -стороны стероидной молекулы, которая стерически блокирована гидроксильной группой при C<sub>14</sub>. При ацетиленовом синтезе атака с  $\alpha$ -стороны стероидной молекулы также является предпочтительной, а образующийся 17 $\beta$ -гидрокси-17 $\alpha$ -замещенный стероид с помощью химических реакций превращается в нужный изомер.

Но существует ряд работ [EU Pat 0189951], в которых показана возможность образования 14 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -дигидрокси-17 $\beta$ -замещенных стероидов. Основным способом получения данного изомера является реакция взаимодействия 14 $\alpha$ -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 $\beta$ -этинил,17 $\alpha$ -гидроксипроизводного.

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

Помимо 14 $\alpha$ -ОН-АД в синтезе пролигестона и его аналогов может быть использован и 14 $\alpha$ -ОН-«S» после предварительного удаления гидроксильной группы при C<sub>21</sub>. Однако в своей работе мы использовали непосредственно 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -ОН-АД 60%. На способ получен Патент РФ №2 407 800 (Бюл. Изобр. №36 от 27.12.2010)

3. Разработан способ направленного 11 $\beta$ -гидроксирования стероидов с помощью нового штамма *C. lunata* ВКПМ F-988. Способ позволяет проводить 11 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\alpha$ -ОН-АД) - полупродуктов синтеза стероидных лекарственных препаратов из растительного сырья.

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

7. Получен ранее не описанный в литературе аналог пролигестона - 21-ацетат-14 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -пропилидендиокси-4-прегнен-21-ол-3,20-диона - из 14 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\beta$ -гидроксилирования  $\Delta^4$ -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 $\alpha$ -гидроксипроизводных  $\Delta^4$ -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 $\alpha$ /11 $\beta$ -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.