



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011146244/04, 16.11.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.11.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.11.2011

(45) Опубликовано: 27.04.2013 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 4524134 A, 18.06.1985. US 4684610 A,
04.08.1987. US 5225335 A, 06.07.1993. US
4839282 A, 13.01.1989. RU 2236464 C2,
20.09.2004. RU 2156302 C1, 20.09.2000. FOKINA
V.F. et al // Steroids v 68 (2003), p.415-421.

Адрес для переписки:

142290, Московская обл., г. Пущино, мкр.В,
35, кв.1, В.В. Фокиной

(72) Автор(ы):

Фокина Виктория Валерьевна (RU),
Суходольская Галина Викторовна (RU),
Шутов Андрей Анатольевич (RU),
Николаева Вера Максимовна (RU),
Доновна Марина Викторовна (RU),
Савинова Татьяна Степановна (RU),
Лукашёв Николай Вадимович (RU),
Суровцев Виктор Васильевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой
выступает Министерство промышленности и
торговли Российской Федерации (RU)(54) МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ 21-АЦЕТОКСИПРЕГНА-1,4,9(11),16-
ТЕТРАЕН-3,20-ДИОНА ИЗ 21-АЦЕТОКСИПРЕГНА-4,9(11),16-ТРИЕН-3,20-ДИОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к
высокоэффективному микробиологическому
способу получения 21-
ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона
из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-
диона. Реакция 1,2-дегидрирования 21-
ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона
осуществляется с помощью клеток *Nocardioide*
simplex ВКМ Ас-2033Д при температуре 25°C в
среде буферного раствора с рН 5,0-5,5,

содержащей метил-β-циклодекстрин, полярный
растворитель, смешивающийся с водой, и
экзогенный акцептор электронов.
Использование растущей культуры или
осажденных клеток позволяет осуществлять
трансформацию при высокой нагрузке
субстрата (10-20 г/л) при полном селективном
превращении субстрата в 1,2-дегидрированный
продукт и высоких скоростях процесса. 6 з.п. ф-
лы, 7 прим., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 480 475** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C07J 5/00 (2006.01)

C12P 33/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011146244/04, 16.11.2011

(24) Effective date for property rights:
16.11.2011

Priority:

(22) Date of filing: 16.11.2011

(45) Date of publication: 27.04.2013 Bull. 12

Mail address:

142290, Moskovskaja obl., g. Pushchino, mkr.V,
35, kv.1, V.V. Fokinoj

(72) Inventor(s):

Fokina Viktorija Valer'evna (RU),
Sukhodol'skaja Galina Viktorovna (RU),
Shutov Andrej Anatol'evich (RU),
Nikolaeva Vera Maksimovna (RU),
Donova Marina Viktorovna (RU),
Savinova Tat'jana Stepanovna (RU),
Lukashev Nikolaj Vadimovich (RU),
Surovtsev Viktor Vasil'evich (RU)

(73) Proprietor(s):

Rossijskaja Federatsija, ot imeni katoroj
vystupaet Ministerstvo promyshlennosti i
torgovli Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) MICROBIOLOGICAL METHOD OF PRODUCING 21-ACETOXYPREGNA-1,4,9(11),16-TETRAENE-3,20-DIONE FROM 21-ACETOXYPREGNA-4,9(11)16-TRIENE-3,20-DIONE

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a highly efficient microbiological method of producing 21-acetoxypregna-1,4,9(11),16-tetraene-3,20-dione from 21-acetoxypregna-4,9(11),16-triene-3,20-dione. The 1,2-dehydrogenation of 21-acetoxypregna-4,9(11),16-triene-3,20-dione is carried out using *Nocardioides simplex* BKM Ac-2033D cells at temperature of 25°C in the medium of a buffer solution with pH 5.0-

5.5, which contains methyl-β-cyclodextrin, a water-miscible polar solvent and an exogenous electron acceptor.

EFFECT: use of a growing culture or deposited cells enables to conduct transformation with a high substrate load with complete selective conversion of the substrate to a 1,2-dehydrogenated product and high rate of the process.

7 cl, 7 ex, 2 tbl

RU 2 480 475 C1

RU 2 480 475 C1

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, конкретно касается получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона микробиологическим 1,2-дегидрированием 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с участием клеток микроорганизмов, обладающих 3-кетостероид-1-дегидрогеназной активностью (ЕС 1.3.99.4), и может быть использовано в микробиологической и фармацевтической отраслях промышленности.

21-Ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-дион является интермедиатом в синтезе ряда физиологически активных лекарственных препаратов, включая дексаметазон, бетаметазон, триамцинолон, флуоцинолон ацетонид и другие фторированные кортикоиды.

Исходным соединением в синтезе 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона методом 1,2-дегидрирования является 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-дион, который может быть получен из 3,17-дикетоандростанов методами, детально описанными в литературных источниках, например, в [Kataoka H., et al. *Chem. Lett.* 1990, v. 19(9), p. 1705-1708].

Реакцию 1,2-дегидрирования стероидных Δ^4 -3-кетосоединений проводят химическим или микробиологическим способом.

Совокупность известных недостатков химического способа получения 1,2-дегидрированных продуктов хорошо известна. Это использование дорогостоящих реагентов, многостадность химических реакций при введении двойной связи в кольцо А стероидного ядра и последующего выделения продукта, жесткие условия проведения реакций (высокая температура, использование токсичных соединений, некоторые из которых проявляют выраженные канцерогенные свойства и представляют реальную угрозу здоровью рабочего персонала), необходимость применения колоночной хроматографии для очистки продукта, и, как следствие, его низкий выход. Химическое производство требует решения многих экологических проблем.

Микробиологические способы проведения процесса 1,2-дегидрирования стероидов, включая стероиды прегнанового ряда, являются альтернативным вариантом.

Использование биокатализаторов позволяет в мягких условиях осуществить в одну технологическую стадию сложные полиферментные процессы с высоким выходом продукта. Высокая селективность ферментативных реакций, относительная дешевизна, экологическая чистота характеризуют процессы конверсии стероидных соединений с участием микроорганизмов.

В качестве биокатализаторов процесса 1,2-дегидрирования используют культуры с 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназой (3-КСД) (EC 1.3.99.4) родов: *Arthrobacter*, *Alternaria*, *Alcaligenes*, *Calonectria*, *Ophiobolus*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Bacterium*, *Mycobacterium*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Pseudomonas*, *Protaminobacter*, *Septomyxa*, *Didymella*, *Rhodococcus* и др. [Charney W., Herzog H. Microbial transformation of Steroids. Academic Press. Inc. New York. 1967, p. 236-261; Kaufmann G., Schumann G., Wollweber L., Huller E., Atrat. P. *J. Basic. Microbiol.* 1990, v. 30(6), p. 415-423; Fujui Ch., Morii S., Kadode M., Sawamoto S., Iwami M., Itagaki E. *J. Biochem.*, 1999, v. 126, p. 662-667]. Наиболее часто для проведения процесса 1,2-дегидрирования стероидных соединений ряда прегнана и андростана используются штаммы вида *Arthrobacter simplex*.

Биоконверсию проводят, используя культуральную жидкость, природные и мутантные нативные клетки (60-85% влажности) [US2831876, 1958; US4749649, 1988; Falero A., Llanes N., Perez C., Hung B.R., Aguila B., Forseca M., Herve E. *Revista CENIC Ciencias Biologicas.* 2004, v. 35(1), p. 41-43; Fokina V.V., Donova M.V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, v. 87(4-5), p. 434-439], высушенные клетки, полученные при обработке ацетоном, высушенные в вакууме или на воздухе при нагревании [US3360439, 1967; US4749649, 1988; US4704358, 1987; US4524134, 1985], в условиях лиофилизации, а также используют бесклеточные экстракты, полученные при ультразвуковом разрушении или разрушенные при пропускании замороженных клеток через фильтры под давлением [WO 8807092, 1988], иммобилизованные в различные носители [US4546078, 1985].

Выращивание микроорганизмов проводят в питательной среде содержащей:

- источники углерода - сахара и их производные, масла, жирные кислоты и их эфирные производные, спирты, аминокислоты или органические кислоты,
- источники азота - нитратные или аммонийные соли, органические сложные соединения (дрожжевой экстракт, пептоны, кукурузный экстракт),
- ионы натрия, калия, фосфата, сульфата, Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Mo^{3+} и др.

Организмы выращивают в условиях аэрации при температуре 10-45 °С, с оптимумом 28-37 °С; pH среды для обеспечения роста поддерживают в нейтральной области.

3-КСД является индуцибельным ферментом, требующим наличие индуктора в ростовой питательной среде. В качестве индуктора 3-КСД в процессах 1,2-дегидрирования прегнанов чаще всего используют 1,2-насыщенные 3-кетостероиды, такие, как гидрокортизон или ацетат кортизона, в концентрации 0,005-0,05% вес/объем или выше [Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, v. 37(2), p. 97-102]. В присутствии индуктора культуру инкубируют не менее 6-15 часов до использования клеток в качестве биокатализатора. Индуктор добавляют в любой точке в течение роста культуры [US4524134, 1985].

Основной проблемой получения 1,2-дегидрированных структурно модифицированных стероидов ряда прегнана микробиологическим способом в водной среде является малая эффективность процесса, обусловленная низкой растворимостью субстратов, ограниченной доступностью субстрата ферментным системам микроорганизмов, низкой скоростью реакции, возможным ингибирующим влиянием субстрата или продукта на 3-КСД активность клеток микроорганизмов, деградацией продукта в случае использования нативных клеток микроорганизмов [Klibanov A.M. *Nature*, 2001, v. 409(11), p. 241-246; Донова М.В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пущино. ОНТИ ПНЦ РАН, 2010, с. 2-195].

При содержании стероида в среде, превышающем значение растворимости, основная масса субстрата и продукта находится в твердой фазе. В этом случае скорость процесса 1,2-дегидрирования лимитируется скоростью растворения частиц субстрата. Кроме этого происходит сокристаллизация накапливающегося в среде продукта с субстратом. В образующихся кристаллических структурах субстрат становится недоступным для ферментных систем микроорганизма [Kondo F., Masuo M. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1961, v. 7, p. 113-117]. В этом случае содержание остаточного субстрата в техническом целевом продукте может достигать 15-20%, что определяет значительные потери продукта в процессе его очистки от остаточного субстрата. Следует отметить, что в процессе 1,2-дегидрирования стероидных соединений ряда прегнана микробиологическим способом наблюдается образование побочных продуктов, в частности 20-гидроксипроизводных, что снижает также выход целевого 1,2-дегидрированного производного [US3360439, 1967; Готовцева В.А., Коровкина А.С., Гусакова Е.Г. *Микробиология*, 1973, т. 42(3), с. 434-440; Готовцева В.А., Коровкина А.С. *Микробиология*, 1974, т. 43(4), с. 618-623; RU2156302, 2000; Донова М.В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пущино. ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. с. 2-195].

Особенностью процесса 1,2-дегидрирования ацетилированных производных Δ^4 -3-кетостероидов микроорганизмами является сопровождение реакции 1,2-дегидрирования

дезацетилированием (гидролизом сложноэфирной группы) [Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Baskunov B.P., Turchin K.F., Grinenko G.S., Donova M.V. *Steroids*, 2003, v. 68(5), p. 415-421]. Деацетилирование протекает с участием эстераз, - как правило, конститутивных ферментов [Fokina V.V., Donova M.V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, v. 87(4-5), p. 434-439], функционирующих в широком диапазоне значений pH и температуры [Ахрем А.А, Титов Ю.А. Стероиды и микроорганизмы. М. Наука. 1970, с. 3-525]. Деацетилирование по 21-му положению протекает наиболее быстро при pH 6,8-7,1 и температуре 26-29 °С. Однако сохранение ацетатной группы в процессе микробиологической конверсии в молекуле стероидного соединения при C²¹ представляет хотя и трудно разрешимую, но вместе с тем приоритетную задачу, так как последующая модификация стероидной молекулы, как правило, требует защиты гидроксильной группы при атоме C²¹. Поэтому последующее необходимое ацетилирование гидроксильной группы при C²¹ у $\Delta^{1,4}$ -3-кетостероида прегнанового ряда проводят химическим путем.

Так, известен способ получения 1,4-прегнадиенов, который состоит в том, что Δ^4 -3-кетопрегнен подвергают действию культуры, выбранной из группы, состоящей из *Corinebacterim simplex* и *Corinebacterim hoagie* [US2837464, 1958]. Авторы отмечают, что при повышении температуры до 36 °С на стадии микробиологической трансформации происходит снижение активности эстераз. Трансформацию 21-ацетата кортизона (нагрузка 1,5 г/л) или 21-ацетата гидрокортизона (нагрузка 1,0 г/л) в 21-ацетат преднизона и 21-ацетат преднизолон (соответственно) действием культуры *Corinebacterim simplex* проводят в среде фосфатного буфера (pH 6,8-7,1) и температуре 36 °С. Однако из 1,0 г загруженного субстрата авторы получили всего 0,11 г 21-ацетата преднизона (пример 18) и 0,13 г 21-ацетата преднизолон (пример 17). Существенным недостатком данного способа является низкая исходная концентрация субстратов и крайне низкий выход продуктов.

С целью интенсификации процесса 1,2-дегидрирования используют органические растворители и экзогенные акцепторы электронов [Antonini E., Carrea G. and Cremonesi P. *Enzyme Microb. Tech.*, 1981, v. 3(4), p. 291-296; US4749649, 1988]. Известно, что экзогенные акцепторы электронов - феназинметосульфат (ФМС), менадион (2-метил-1,4-нафтохинон), 1,4-нафтохинон, менадион бисульфит - используют не только для стимулирования процесса 1,2-дегидрирования стероидных соединений, но также и для ингибирования деструктивной активности клеток микроорганизмов и побочных реакций восстановительного характера, протекающих в присутствии восстановленных кофакторов. Образование побочных продуктов, деструкция целевого продукта снижают

выход основного продукта.

Так, в патенте [US3091575, 1963] описан метод усовершенствования процесса ферментации, содержащего 1,2-дегидрирующую микробную систему, для получения 1,2-дегидростероидов, в котором деструкция $\Delta^{1,4}$ -3-кетостероидов ингибирована, включающий добавление в качестве ингибитора вещества, выбранного из группы, содержащей хром, молибден и вольфрам, а также соединения, содержащего орто- и паракхиноидную структуру в окисленной или восстановленной форме, причем такое соединение может быть окисленной или восстановленной формой хинона, феназина, тиазина, оксазина и т.п. Согласно указанному способу трансформацию проводят в среде, содержащей метанол, в присутствии растущих клеток культуры *Nocardia corallina* и соединения хиноидной структуры, которым является феназина метасульфат, а $\Delta^{1,4}$ -3-кетостероидом - Δ^1 -гидрокортизон (п.7 формулы). При этом концентрация метанола составляла 2% от объема, и хотя через 24 ч трансформации степень превращения составила 94%, нагрузка субстрата была всего 2 г/л. Кроме того, в патенте не рассматриваются такие субстраты, как 21-ацетилованные Δ^4 -3-кетопрегнаны, в частности, 21-ацетоксипрегн-4,9(11),16-триен-3,20-дион.

Наиболее близким по сущности к предложенному способу является метод, описанный в патенте [US4524134, 1985, пример 4]. Авторы используют растущую культуру *Arthrobacter simplex* для 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегн-4,9(11),16-триен-3,20-диона с нагрузкой стероида 8 г/л в среде фосфатного буфера (pH 7,5) в присутствии менадиона, а стероидный субстрат вносят в среду для трансформации в растворе диметилформамида, концентрация которого в среде составляет 2% об./об. Однако 1,2-дегидропродукт получен лишь с выходом 18,1%, при этом содержание основного вещества составляет всего 59,1%. В продукте также содержится 40,9% нетрансформированного субстрата и значительное количество других нежелательных стероидных соединений. Авторы отмечают, что указанные недостатки, связаны с использованием растущей культуры и их можно избежать, если использовать высушенные клетки в тех же условиях трансформации. Способ получения 1,2-дегидро- Δ^4 -3-кетостероидов, включающий обработку соответствующего 1,2-насыщенного Δ^4 -3-кетостероида высушенными клетками *Arthrobacter simplex*, содержащими от 1 до 10% влаги, причем клетки высушены в отсутствии какого-либо органического растворителя, описан в этом же примере [US 4524134, 1985, пример 4]. При этом 1,2-дегидро- Δ^4 -3-кетостероид или 21-моноэфир выбраны из группы, включающей и 21-ацетоксипрегн-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-дион (п.2 формулы). Согласно этому способу процесс 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегн-4,9(11),16-триен-3,20-диона проводят в

фосфатном буфере (рН 7,5) высушенными клетками (10 г/л) с нагрузкой стероида 8 г/л в присутствии менадиона, а стероидный субстрат вносят в среду для трансформации в растворе диметилформамида, концентрация которого в среде составляет 2% об./об. Продолжительность инкубирования 24 часа при температуре 31 °С. Однако, как отмечено в примере 3, в результате биоконверсии 21-ацетилованных стероидов получают смеси, состоящие из 21-ацетокси- $\Delta^{1,4}$ -соединений и их 21-гидрокси-аналогов. Так, выход смеси продуктов - 21-ацетоксипрегн-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона и 21-гидроксипрегн-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона – с использованием высушенных клеток составил 79,6%, содержание основного вещества, имеющего $\Delta^{1,4}$ -структуру, - 97,8%, содержание остаточного субстрата – 2,1%.

Таким образом, основным недостатком указанного способа является необходимость проведения предварительного высушивания клеток до содержания влаги от 1 до 10% в отсутствие органического растворителя. Как описано в примере 2 патента [US 4524134, 1985] клетки культуры после инкубации подвергают центрифугированию, а затем высушиванию в вакууме при температуре 55 °С в течение 24 ч. После чего высушенный клеточный материал помещают в герметичный контейнер и хранят при 50 °С до использования в биоконверсии. Процесс высушивания клеток сложен и энергоемок. Кроме этого, несмотря на высокий выход продукта трансформации при использовании высушенных клеток (1,25 г клеток на 1 г стероидного субстрата), он содержит смесь 21-ацетоксипрегн-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона и его 21-дезацелированного аналога. Таким образом, анализ материалов, представленных в патенте, свидетельствует о том, что процесс 1,2-дегидрирования 21-ацетилованных производных Δ^4 -3-кето-стероидов ряда прегнана, как с применением высушенных клеток, так и растущей культурой, неселективен. 1,2-Дегидрирование сопровождается деацелированием. В проанализированном информационном материале отсутствуют данные о количественном выходе 1,2-дегидрированного ацелированного целевого продукта. Не указана степень гидролиза и соотношение дегидрированного 21-ацелированного и дегидрированного 21-дезацелированного продуктов, что является существенными недостатками данного способа.

Наиболее близким к заявляемому способу по техническому результату является способ получения 1,2-дегидро-3-кетостероида, который заключается в том, что 1,2-насыщенный 3-кетостероид подвергают взаимодействию с *A. simplex* или *Bacterium cyclooxydans* в присутствии экзогенного носителя электронов и несмешивающегося с водой растворителя, включая ароматические углеводороды [GB2131811, 1984]. Согласно

этому способу (пример 1) процесс трансформации 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с нагрузкой 8 г/л проводят клетками *A. simplex* в присутствии 1% вес. менадиона в среде фосфатного буферного раствора (pH 7.5), содержащей 10% об. толуола, в течение 25 часов при температуре 28±1 °С. Толуольная фаза содержит 94,3% 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона, 4,2% 21-гидроксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона и 1,5% исходного 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона. Однако в описании отсутствует информация о результате выделения продукта и, соответственно, о его выходе и качестве.

Этот же пример описан в патенте того же автора на способ превращения 1,2-насыщенного стероида в 1,2-дегидростероид, который включает взаимодействие 1,2-насыщенного стероида с *A. simplex* или *B. cyclooxydans* в присутствии экзогенного носителя электронов, несмешивающегося с водой ароматического углеводородного растворителя, где концентрация кислорода поддерживается на уровне минимальной концентрации кислорода, необходимой для окисления, или где реакция осуществляется ниже температуры вспышки смеси при условии, что 1,2-насыщенный стероид имеет растворимость в несмешивающемся с водой ароматическом углеводородном растворителе более, чем 5 г/л [US4684610, 1987, пример 1]. Процесс проводят в двухфазной системе, используя несмешивающиеся с водой органические растворители: бензол, толуол, ксилол в присутствии экзогенных акцепторов электронов, выбранных из группы, содержащей менадион, менадион бисульфит, 1,4-нафтохинон или другие соединения, подобные витамину К. Однако, как и в патенте [GB2131811, 1984], в описании также отсутствует информация о результате выделения продукта и, соответственно, о его выходе и качестве.

Также известен способ превращения 1,2-насыщенных 3-кетостероидов в 1,2-дегидро-3-кетостероиды, который заключается в том, что 1,2-насыщенные 3-кетостероиды подвергают взаимодействию со средством, имеющим стероид-1,2-дегидрогеназную активность *A. simplex* или *B. cyclooxydans*, в присутствии экзогенного носителя электронов и одного или более дополнительного поглотителя токсичного кислорода, выбранного из группы, содержащей каталазу, супероксиддисмутазу или платину [US4749649, 1988]. При этом 1,2-насыщенный 3-кетостероид является 1,2-насыщенным 3-кетопреганом (п.9 формулы), выбранным из группы, включающей и 21-ацетокси-прегн-4,9(11),16-триен-3,20-дион. Согласно этому способу процесс проводят в буферной водной системе, имеющей молярность от 0,01 М до 2,0 М, и содержащей несмешиваемый с водой растворитель (толуол, ксилол или бензол) и препарат, обладающий стероид-1-дегидрогеназной активностью, каковым

может быть культуральная жидкость, влажная паста клеток с содержанием влаги от 60% до 85%, или сухая клеточная масса с содержанием влаги от 1 до 30%. Рассматриваемый способ [US4749649, 1988] предлагает также использование экзогенного фермента - каталазы. Однако способ проиллюстрирован единственным примером трансформации соединения ряда прегнана – гидрокортизона (пример 3), - в среде фосфатного буфера (50 mM) с применением сухих клеток и нагрузкой субстрата 0,5 г/л. При этом после 23 часов инкубации в присутствии каталазы конверсия гидрокортизона в преднизолон составляет 69%, а без каталазы - на 27% ниже. Удорожание технологии, обусловленное необходимостью добавления в среду поглотителя (фермента каталазы, или супероксиддисмутазы, или платины), устраняющего ингибирующее влияние синглетного кислорода на активность дегидрогеназы, определяет основной недостаток данного способа, что ограничивает применение данного способа в промышленном масштабе. Кроме того, несмотря на упоминание возможности 1,2-дегидрирования 21-ацетокси-прегн-4,9(11),16-триен-3,20-диона известным способом, описание получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона отсутствует.

Таким образом, общими недостатками способов получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона 1,2-дегидрированием его Δ^4 -3-кетопредшественника в двухфазной среде с применением несмешивающихся с водой органических растворителей являются:

- низкая концентрация субстрата (до 8 г/л), большая продолжительность процесса трансформации (не менее 24 часов) и отсутствие информации о способе выделения, а также о выходе и качестве выделенного продукта;
- использование больших объемов легко воспламеняющихся органических растворителей на этапе трансформации, что требует специального ферментационного оборудования и соблюдения особых правил противопожарной безопасности; требование применения специального технологического оборудования фактически исключает практическую реализацию этих способов в условиях промышленного производства;
- сложность проведения технологического процесса в условиях необходимого регулирования состава газовой смеси, подаваемой в реакционную среду: необходимость создания и строгого поддержания минимально допустимой концентрации растворенного кислорода в среде, чтобы избежать вспышки паров газо-воздушной смеси и в то же время обеспечить оптимальные условия для процесса окисления субстрата;

- использование токсичных органических соединений создает угрозу здоровью специалистов, занятых в производстве. Применяемые ароматические углеводороды (бензол, толуол, ксилол) являются сильнодействующими ядами, влияющими на функцию кроветворения организма. Так, например, толуол вызывает цианоз, гипоксию, поражение центральной нервной системы, а также толуольную токсикоманию, которая имеет и канцерогенное действие;
- необходимость решения экологических проблем.

Известно, что для повышения растворимости стероидных субстратов в водной среде используют α , β или γ -циклодекстрины, а также производные β -циклодекстрина (β -ЦД) - метил- β ЦД (МЦД) и гидроксипропил- β -ЦД - в концентрации 1-50 г/л [Szejtli J. The use of cyclodextrins in biotechnological operations. Ed. D. Duchene, Published in France by Editions de Sante. 1991, p. 1-625; Wang M., Zhang L., Shen Y., Ma Y., Zheng Y., Luo J. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 2009, v. 59(1-3), p. 58-63; Zhang L., Wang M., Shen Y., Ma Y., Luo J. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, v. 159(3), p. 642-654]. Растворимость стероидов в различных водных циклодекстриновых растворах может быть увеличена в 2-1200 раз по сравнению с водой [Habon I., Stadler-Szoke A., Szejtli J. *Acta Biochim. Biophys. Hung.*, 1984, v. 19(1/2), p. 86; Донова М.В. Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пущино. ОНТИ ПНЦ РАН. 2010, с. 2-195].

В частности, известен способ получения 1,2-дегидропроизводных 4-дельта-3-кетостероидов путем трансформации 4-дельта-3-кетостероидов с помощью микроорганизма *Arthrobacter globiformis* 193 в присутствии циклодекстрина, отличающийся тем, что в качестве циклодекстрина используют водорастворимые химически модифицированные производные β -циклодекстрина [RU2156302, 2000]. Согласно способу (пример 1) трансформацию гидрокортизона с нагрузкой 10 г/л проводят в течение 5 ч в 0,01 М Na-фосфатном буфере (pH 7,0-7,2) в присутствии метил- β -циклодекстрина с использованием суспензии клеток в буферном растворе, предварительно отделенных от ростовой среды центрифугованием при 5000 g и дважды отмытых фосфатным буфером. По данным ВЭЖХ выход преднизолона (конверсия субстрата) составляет 95%. В примерах 3, 5 и 7 описаны биопроцессы с нагрузками исходного гидрокортизона 20, 50 и 70 г/л, соответственно, с высокой степенью конверсии в преднизолон (95-97%). В примере 11 описана трансформация вещества «S» Рейхштейна с нагрузкой 20 г/л. Во всех примерах использовано одинаковое количество биомассы – 0,2 г (сухая масса) на 1 г субстрата при весовом соотношении

метил- β -ЦД/субстрат (г/г) от 5,67/1 до 7/1, что обеспечивает полное превращение субстрата за 6 часов. Однако известный способ не предусматривает трансформацию 21-ацетилованных производных указанных субстратов с сохранением сложноэфирной группы, конкретно в нем не описано получение 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона 1,2-дегидрированием 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона.

Описан также способ конверсии 21-ацетата прегна-4,9(11)-диен-17 α ,21-диол-3,20-диона (нагрузка 5 г/л) клетками *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033 в присутствии МЦД [Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Baskunov B.P., Turchin K.F., Grinenko G.S., Donova M.V. *Steroids*, 2003, v. 68(5), p. 415-421]. Авторы используют индуцированные ацетатом кортизона или гидрокортизоном клетки *N. simplex*, осажденные центрифугированием при 7000 g и отмытые от питательной среды 0.01 М натрий-фосфатным буферным раствором (рН 7,2). Субстрат вносят в среду для трансформации в виде микронизированного порошка. Трансформацию проводят в течение 6 часов при 28 °С в среде фосфатного буферного раствора (рН 7,4-8,1) при весовом соотношении биомасса:стероид, равном 1:1, и мольном соотношении стероид:МЦД – 1:2. Однако в результате трансформации помимо ожидаемого 21-ацетата прегна-1,4,9(11)-триен-17 α ,21-диол-3,20-диона получены дезацетилованный субстрат, дезацетилованный 1,2-дегидропродукт, а также дезацетилованное 20 β -восстановленное 1,2-дегидропроизводное субстрата - прегна-1,4,9(11)-триен-17 α ,20 β ,21-триол-3-он. Селективность образования основного продукта - 21-ацетата прегна-1,4,9(11)-триен-17 α ,21-диол-3,20-диона - 90-92%, выход выделенного соединения – 83-87%.

Основным недостатком описанного выше способа является низкая концентрация исходного субстрата, которая и обеспечивает высокую селективность процесса. Кроме того, в нем не описано использование 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегн-4,9(11),16-триен-3,20-диона.

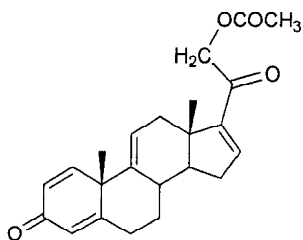
Другим близким по сущности и техническому результату к предложенному способу является метод, включающий трансформацию 21-ацетоксипрегн-4,9(11),16-триен-3,20-диона [Fokina V.V., Donova M.V. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2003, v. 87(4-5), p. 434-439]. Биоконверсию проводят в среде 0.01 М натрий-фосфатного буферного раствора (рН 7,4-8,1) при температуре 30 °С. Исходный субстрат (нагрузка 1,0 г/л) добавляют в виде микронизированного порошка. При конверсии субстрата нативными клетками при содержании биомассы 330 мг/л и мольном соотношении стероид:МЦД, равном 1:2, в присутствии ФМС (0.4 мг/мл) максимальное накопление 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона наблюдается через 1 час инкубации и составляет 75%. Последующее снижение его содержания до нулевого значения

коррелирует с накоплением дезацетилированного 1,2-дегидрированного продукта - прегна-1,4,9(11),16-тетраен-21-ол-3,20-диона, достигающим 90% за 5 часов. При этом содержание дезацетилированного субстрата - прегна-4,9(11),16-триен-21-ол-3,20-диона - не превышает 10% (субстрат трансформируется полностью за 5 часов инкубации). В
 5
 отсутствии МЦД в тех же условиях наблюдается активное дезацетилирование, сопровождающееся последующим 1,2-дегидрированием. Через 20 часов трансформации
 10
 при полной конверсии загруженного субстрата происходит накопление 70% дезацетилированного 1,2-дегидрированного продукта 21-гидроксипрегн-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона, при этом содержание дезацетилированного субстрата составляет 30%. Для уменьшения дезацетилирования в начальные часы конверсии авторы
 15
 используют низкую концентрацию биомассы, равную 33 мг/мл. При этом конверсия субстрата (1,0 г/л) при мольном соотношении стероид:МЦД, равном 1:2, в присутствии ФМС (0,4 мг/мл) завершается за 5,5 часов и содержание 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона составляет 92%, а содержание его дезацетилированного аналога - не
 20
 более 5-7%.

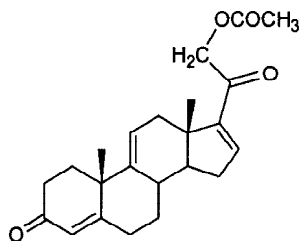
Основным недостатком этого процесса является низкая концентрация исходного
 25
 субстрата (1 г/л). Кроме того, в описании также отсутствует информация о результате выделения продукта и, соответственно, о его выходе и качестве.

Технической задачей заявляемого изобретения является повышение
 30
 эффективности, технологичности и безопасности проведения 1,2-дегидрирования и создание эффективного микробиологического способа получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона,
 35
 лишённого указанных недостатков.

Техническая задача решается микробиологическим способом получения
 40
 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона формулы (I)



из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона формулы (II)



II

в водной среде, содержащей экзогенный акцептор электронов менадион в эффективном количестве и метил- β -циклодекстрин в количестве не более 2 молей на 1 моль исходного субстрата, с применением клеток микроорганизма *Nocardioideis simplex* ВКМ Ас-2033Д, обладающих 3-кетостероид-1-дегидрогеназной активностью, с использованием полярного растворителя, смешивающегося с водой, при концентрации указанного растворителя в водной среде от 4 до 8 об.%, в среде буферного раствора с рН от 5,0 до 5,5, преимущественно $5,1 \pm 0,1$ при температуре 25 °С в течение от 6 до 14 часов, при этом менадион вносят в среду для трансформации одновременно со стероидным субстратом в виде раствора в полярном растворителе с последующим выделением целевого продукта из культуральной жидкости.

Применение трансформационных водных или буферных растворов со значением рН от 5,0 до 5,5 в качестве среды для проведения процесса 1,2-дегидрирования 21-ацетилованного стероидного субстрата не является очевидным. Ранее Na-ацетатный и Na-цитратный буферные растворы не использовались в процессах 1,2-дегидрирования стероидов, в частности, для 1,2-дегидрирования 21-ацетилованных стероидных субстратов. Кроме того, ранее 1,2-дегидрирование Δ^4 -3-кетостероидных субстратов в буферных растворах (включая раствор NaH_2PO_4 , подкисленный до рН 5,0) не проводилось в диапазоне значений рН от 5,0 до 5,5.

Таким образом, сущность заявленного изобретения заключается в том, что введение 1,2-двойной связи в кольцо А стероидного ядра 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с сохранением сложноэфирной группы у атома C^{21} осуществляют микробиологической реакцией 1,2-дегидрирования в среде буферного раствора с рН от 5,0 до 5,5, содержащей метил- β -циклодекстрин в количестве не более 2 молей на 1 моль исходного субстрата и экзогенный акцептор электронов менадион в эффективном количестве, с участием клеток *Nocardioideis simplex* ВКМ Ас-2033Д, обладающих 3-кетостероид-1-дегидрогеназной активностью; стероидный субстрат и менадион вносят в среду для трансформации в виде раствора в полярном растворителе, смешивающимся с водой.

Кроме того, проведение 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с целью получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона

осуществляют с использованием либо растущей культуры, либо осажденных клеток *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д в эффективном количестве, предпочтительно от 0,1 до 0,17 г на 1 г загруженного субстрата в пересчете на сухой вес.

Кроме того, в качестве полярного растворителя, смешивающегося с водой, используют апротонные растворители (предпочтительно диметилсульфоксид), или протонные растворители, например, алифатические спирты (предпочтительно этанол). При этом концентрация растворителя в водной среде составляет от 4% до 8% об.

Кроме того, процесс продолжительностью от 6 до 14 часов проводят с концентрацией исходного субстрата от 10 до 20 г/л соответственно.

Кроме того, трансформацию проводят в среде буферного раствора в диапазоне значений pH от 5,0 до 5,5, в качестве которого используют Na-ацетатный буфер, или Na-цитратный буфер, или раствор NaH_2PO_4 (предпочтительно Na-ацетатный буфер).

Кроме того, трансформацию проводят в диапазоне значений температуры от 20 до 30 °C (предпочтительно 25 °C).

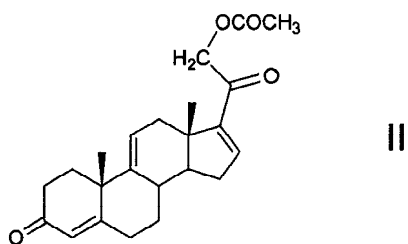
Технический результат заявляемого микробиологического способа получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона состоит в следующем:

- Процесс проводится при высокой нагрузке субстрата (до 20 г/л) и продолжительности не более 14 часов в мягких условиях;
- В процессе не используются легко воспламеняющиеся и токсичные органические растворители;
- В процессе используется либо растущая культура, либо осажденные клетки в эффективном количестве, что исключает дорогостоящие процедуры, такие, как высушивание клеток растворителем или теплом; иммобилизация клеток на носителе; кроме того, осажденные клетки используются без дополнительной процедуры их отмывки от ростовой среды;
- В процессе могут быть использованы как свежеприготовленные клетки микроорганизма, так и хранившиеся в замороженном виде;
- Способ экологически безопасен, так как в качестве предпочтительных смешивающихся с водой растворителей предлагаются диметилсульфоксид и этанол;
- Способ исключает применение каких-либо синтетических полимерных материалов, включая полимеры класса N-виниламида;

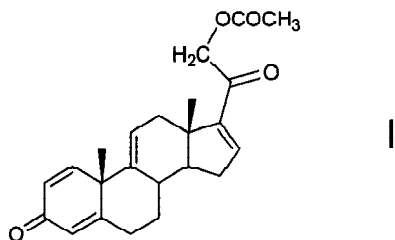
- Способ исключает применение фермента каталазы и каких-либо других поглотителей синглетного кислорода;
- Селективность процесса составляет 92-95% при конверсии субстрата 98-100%;
- Способ может быть реализован на стандартном технологическом оборудовании.

Ниже приводится в качестве примера подробное описание сущности изобретения.

21-Ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-дион формулы (II)



превращают в 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-дион формулы (I)



введением 1,2-двойной связи методом микробиологического дегидрирования с участием клеток *N. simplex* ВКМ Ас-2033Д, обладающих 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназной активностью, при этом нагрузка исходного субстрата составляет от 10 до 20 г/л, а продолжительность ферментации - от 6 до 14 часов и процесс проводят при температуре 25 °С в среде буферного раствора при pH ~5, содержащей до 8 об.% полярного растворителя (предпочтительно диметилсульфоксид или этанол), смешивающегося с водой, МЦД в количестве не более 2 молей на 1 моль исходного субстрата и экзогенный акцептор электронов менадион в эффективном количестве.

Таким образом, высокая эффективность микробиологического способа 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с сохранением сложноэфирной группы при атоме C²¹ с нагрузкой исходного субстрата до 20 г/л и продолжительностью не более 14 часов (конверсия субстрата 99-100%, селективность образования продукта до 95%) по предлагаемому изобретению обеспечивается оптимальным сочетанием следующих параметров проведения процесса: применением в качестве среды буферного раствора с pH 5,0 - 5,5, концентрацией полярного

растворителя до 8% об., содержанием метил-β-циклодекстрина не более 2 молей на 1 моль исходного стероида и использованием минимально необходимого количества клеток *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д (не более 0,17 г сухого веса на 1 г стероидного субстрата), экзогенного акцептора электронов менадиона в эффективном количестве и температуры среды конверсии 25 °С. При этом может быть использована как растущая культура в разбавленной питательной среде, так и осажденные клетки в голодной среде.

Выделение 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона из культуральной жидкости может быть осуществлено экстракцией несмешивающимся с водой растворителем или экстракцией стероида из пасты биомассы любым подходящим растворителем после её предварительного отделения от водной фазы. Для извлечения стероида может быть также применен, например, сорбционный способ извлечения, а также любой другой эффективный метод. Селективность образования 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона (I) из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона (II) составляет 92-95%. Выход кристаллического 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона (I) после выделения составляет 83,5-84%.

Заявленная группа изобретений иллюстрируется нижеследующими примерами, не ограничивающими её.

Анализ продуктов трансформации при осуществлении изобретения - способа получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в процессе и по окончании трансформации проводят методами ТСХ и ВЭЖХ.

ТСХ проводят на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ (Россия), отбирая через равные промежутки времени (1 ч) пробу культуральной жидкости (1 мл) и экстрагируя продукты этилацетатом.

Анализ содержания стероидов методом ВЭЖХ проводят в следующих условиях:

- Колонка обращеннофазная C18 - Octadecyl-Daltosil Si-100, 250 x 4.6 мм (Serva), предколонка (4.6 x 10 мм) того же типа;
- Детекция - по ультрафиолетовой абсорбции при длине волны 240 нм;
- Элюент (мобильная фаза) - ацетонитрил:H₂O (40:60 об/об);
- Скорость потока - 1 мл/мин
- Объем петли - 20 мкл;
- Температура колонки 30 °С;
- Расчет концентраций производится с использованием значений площадей пиков;

Стероидное соединение	Время удержания, мин
21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-дион	11,7
21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-дион	8,9
21-гидроксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-дион	6,7
21-гидроксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-дион	5,36

Аликвоты супернатанта разведенных проб (не менее 50 мкл) отбирают инъекционным микрошприцем и вводят в систему. Время регистрации хроматограмм составляет не менее 15 мин.

Основные параметры процесса микробиологического 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона приведены в таблице 1. Использован субстрат с содержанием массовой доли 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона от 80% до 95%. Нагрузка исходного субстрата дана в пересчете на содержание основного вещества.

Примеры.

В работе используют штамм *Nocardioideis simplex* ВКМ Ас-2033Д, который поддерживают на скошенной агаризованной кукурузно-глюкозной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт – 10,0; глюкоза – 10,0; водопроводная вода до литра, pH 7,0-7,2. Выращивание проводят в течение 3-5 суток при температуре 30 °С. Культуру, выросшую на скошенной агаризованной среде, используют для приготовления смыва для получения первого инокулята или хранят в течение 1-2 месяцев в холодильнике при 4 °С.

Выращивание 1-го инокулята

Смыв культуры *N. simplex* с поверхности агаризованной среды проводят стерильной водопроводной водой; при этом при разведении в 10 раз значение оптической плотности полученной суспензии клеток должно составлять 0,35-0,40 (длина кюветы 0,5 см, длина волны 536 нм, Spesord (Германия)). Полученную суспензию клеток (2-3 мл) вносят в колбы Эрленмейера вместимостью 750 мл, содержащие 50 мл среды (г/л): глюкоза-10, соевый пептон-4, дрожжевой экстракт-4, MgSO₄-0,5, KН₂PO₄-2, K₂HPO₄-4, pH 7,0-7,2. Инкубируют на качалке (220 об/мин) при температуре 30 °С в течение 42-48 часов.

Выращивание 2-го инокулята

В свежую среду того же состава вносят 5 об.% выросшего первого инокулята и инкубируют в течение 24-26 часов в тех же условиях.

Выращивание трансформирующей культуры

Для получения культуры с 1,2-дегидрогеназной активностью клетки *N. simplex* выращивают в ферментере АНКУМ-2М (Россия) с рабочим объемом 5 л в условиях

периодического культивирования с подпиткой. Посевной материал – 2 инокулят – вносят в количестве 5 об.% в среду следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт-10, соевый пептон-20, глюкоза-20, $MgSO_4$ -0,5, KH_2PO_4 -2, K_2HPO_4 -4, pH 7,0. Среду без глюкозы стерилизуют в колбе при избыточном давлении в 1 атм в течение 30 минут. Раствор глюкозы (30 г в 150 мл воды) стерилизуют отдельно (0,5 атм, 30 мин). Индуктор синтеза стероид-1-дегидрогеназы вносят на 6-8 часов культивирования (раствор 1 г ацетата кортизона в 100 мл этанола). Режим выращивания культуры в ферментере: температура 29 °С; pH 6,5-7,5; скорость вращения вала мешалки от 350 до 800 об/мин; исходный расход воздуха от 0,25 до 4 л/мин. Продолжительность выращивания 36-38 часов.

После окончания выращивания культуральную жидкость используют сразу, либо замораживают и хранят при температуре минус 18 °С для последующего использования. Концентрация клеток в культуральной жидкости (сухой вес) составляет 13,4 г /л.

Клетки микроорганизма осаждают центрифугированием при 5000 g в течение 30 мин. и используют для проведения процесса 1-дегидрирования или хранят при минус 18 °С в течение месяца до использования.

Пример 1.

Среда для биоконверсии 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона с концентрацией 10,0 г/л представляет собой раствор МЦД в 0,05 М Na-ацетатном буфере (pH 5). Стероидный субстрат (0,5 г в 100% исчислении) вносят в 46,25 мл среды в виде раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО), содержащего также 20 мг менадиона (4% от массы субстрата), при этом мольное соотношение МЦД: субстрат составляет 1.5:1, а концентрация ДМСО составляет 4 об.%, считая на конечный объем трансформационной среды (50 мл). Затем добавляют 3,75 мл культуральной жидкости, весовое соотношение биомасса:субстрат составляет 1:10. Инкубирование проводят в аэрируемых условиях на роторной качалке (220 об/мин) при температуре 25 °С в течение 6 ч. Результаты (по данным ТСХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 2.

Биоконверсию 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (1,0 г стероидного субстрата в 100% исчислении) осуществляют, как описано в примере 1, используя 38,34 мл раствора МЦД в 0,02 М растворе NaH_2PO_4 (подкислен до pH 5,0) и 10,66 мл культуральной жидкости, при этом мольное соотношение МЦД: субстрат составляет 2:1, весовое соотношение биомасса:субстрат составляет 1:7. Стероидный субстрат и менадион вносят в растворе этанола. Инкубирование проводят в течение 14 ч. Результаты (по данным ТСХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 3.

Биоконверсию 21-ацетоксипрегна-1(2),4(5),9(11),16(17)-тетраен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (1 г стероидного субстрата в 100% исчислении) осуществляют, как описано в примере 2, используя 38,34 мл раствора МЦД в 0,05 М Na-ацетатном буфере (рН 5,0) и 10,66 мл культуральной жидкости. При этом мольное соотношение МЦД: субстрат составляет 2:1, а весовое соотношение биомасса: субстрат равно 1:7, концентрация этанола - 8% из расчета на конечный объем трансформационной среды (50 мл). Инкубирование проводят в течение 9 ч. Результаты (по данным ВЭЖХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 4.

Трансформацию 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (24 г стероидного субстрата в 100% исчислении) в ферментере АНКУМ-2М с рабочим объемом 1,2 л проводят в условиях примера 3, используя 901,5 мл раствора МЦД в 0,05 М Na-ацетатном буфере (рН 5,0) и 298,5 мл культуральной жидкости. При этом мольное соотношение МЦД: субстрат составляет 2:1, а весовое соотношение биомасса: субстрат равно 1:6. Инкубирование проводят в течение 14 ч при оборотах вала мешалки 800 об/мин, температуре 25 °С, уровень растворенного кислорода поддерживают выше 30% от уровня насыщения. Результаты (по данным ВЭЖХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 5.

Биоконверсию 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (1 г стероидного субстрата в 100% исчислении) осуществляют, как описано в примере 2, используя раствор МЦД в 0,02 М Na-цитратном буфере (рН 5,0) и 670 мг влажной пасты биомассы, хранившейся в замороженном виде при температуре минус 18 °С в течение 1 месяца (что соответствует 142,8 мг сухого веса биомассы). При этом мольное соотношение МЦД: субстрат составляет 2:1, весовое соотношение биомасса: субстрат равно 1:7, а концентрация этанола - 8% из расчета на конечный объем трансформационной среды (50 мл). Инкубирование проводят в течение 11 ч. Результаты (по данным ТСХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 6.

Биоконверсию 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (1 г стероидного субстрата в 100% исчислении) осуществляют, как описано в примере 5, используя раствор МЦД в 0,02 М растворе NaH_2PO_4 (подкислен до рН 5,0). Инкубирование проводят в течение 14 ч. Результаты (по данным ТСХ-анализа) представлены в таблице 1.

Пример 7.

Биоконверсию 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона в концентрации 20,0 г/л (1 г стероидного субстрата в 100% исчислении) осуществляют, как описано в примере 5, используя раствор МЦД в 0,05 М Na-ацетатном буфере (pH 5,0). Инкубирование проводят в течение 9 ч. Результаты (по данным ТСХ-анализа) представлены в таблице 1.

Выделение 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона из трансформационной среды проводят экстракцией этилацетатом. Основные параметры процесса и содержание стероидных соединений в экстракте в сравнении с известными аналогами представлены в таблице 1. Выход и параметры качества продукта (по данным ВЭЖХ), полученного после выделения без дополнительной очистки в сравнении с известным аналогом представлены в таблице 2.

Таблица 1

Основные параметры процесса микробиологического 1,2-дегидрирования 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона заявляемым способом и известными аналогами

Изобретение	Буфер, pH	Количество биомассы (сухой), г/г субстрата	Нагрузка субстрата, г/л	Соотношение МЦД/субстрат, моль/моль	Продолжительность процесса, ч	Степень конверсии субстрата, %	Селективность образования 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона, %	Содержание примесей, %	
1	2	3	4	5	6	7	8	21-гидрокси-4,9(11),16-триен-3,20-диона	21-гидрокси-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона
GB 2131811 (пример 1)	Калий-фосфатный, 7,5	0,457 Сухие клетки	8	-	25	98,5	94,3	отсутствует	4,2
US 4524134 (пример 4)	Калий-фосфатный, 7,5	0,457 Сухие клетки	8	-	24	Не указана	Не указана	Не указано	Не указано
US 4524134 (пример 4)	Калий-фосфатный, 7,5	0,457 Растущая культура	8	-	24	Не указана	Не указана	Не указано	Не указано
Фокина с соавт., 2003	Na-фосфатный, 7,2	0,033 Осажденные клетки	1	2:1	5,5	99	92	Отсутствует	5-7
Заявляемый способ									
пример 1	Na-ацетатный, ~5	0,1 Растущая культура	10	1,5:1	6	98	95	отсутствует	3,0
пример 2	p-p NaH ₂ PO ₄ , ~5	0,143 Растущая культура	20	2:1	14	99	92	отсутствует	7,0
пример 3	Na-ацетатный, ~5	0,143 Растущая культура	20	2:1	9	99,19	93,03	0,01	6,15

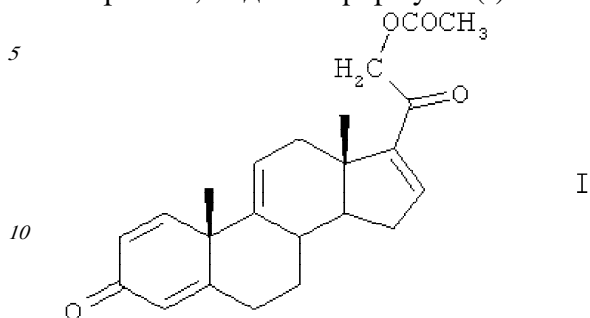
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
пример 4 (ферментер)	Na- ацетатный, ~5	0,167 Растущая культура	20	2:1	14	98	93,97	0,07	3,96
пример 5	Na- цитратный, ~5	0,143 Осажденные клетки	20	2:1	11	99	92	следы	6
пример 6	p-p NaH ₂ PO ₄ , ~5	0,143 Осажденные клетки	20	2:1	14	98-99	92	следы.	6
пример 7	Na- ацетатный, ~5	0,143 Осажденные клетки	20	2:1	9	~100	93	следы	6

Таблица 2
Выход и параметры качества выделенного 21-ацетокси-прегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона по заявляемому способу и известному аналогу

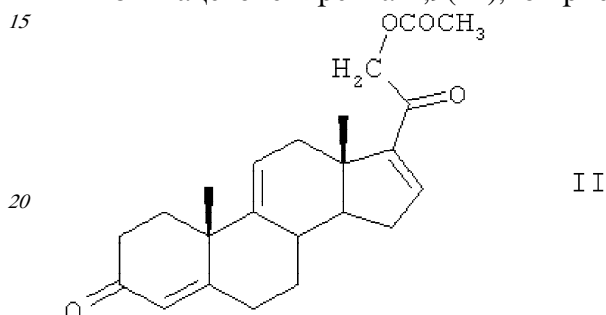
Пример №	Выход 21-ацетокси-прегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона, %	Массовая доля примесей, %		
		Массовая доля 21-ацетокси-прегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона, %	21-гидрокси-1,4,9(11),16-тетраен-21-ол-3,20-диона	21-гидрокси-4,9(11),16-триен-3,20-диона
Заявляемый способ (пример 3) Растущая культура	83,5	95,6	3,77	0,02
		99,37 (суммарно)		
Заявляемый способ (пример 4) Растущая культура	83,8	96,03	3,11	0,02
		99,14 (суммарно)		
US 4524134 (пример 4) Растущая культура	18,1	59,1 (суммарно)		-
US 4524134 (пример 4) сухие клетки	79,6	97,8 (суммарно)		-

Формула изобретения

1. Микробиологический способ получения 21-ацетоксипрегна-1,4,9(11),16-тетраен-3,20-диона формулы (I)



из 21-ацетоксипрегна-4,9(11),16-триен-3,20-диона формулы (II)



25 в водной среде, содержащей экзогенный акцептор электронов менадион в эффективном количестве и метил-β-циклодекстрин в количестве не более 2 молей на 1 моль исходного субстрата, с применением клеток микроорганизма *Nocardioide simplex* ВКМ Ас-2033Д, обладающих 3-кетостероид-1-дегидрогеназной активностью, с использованием полярного растворителя, смешивающегося с водой, при концентрации

30 указанного растворителя в водной среде от 4 до 8 об.%, в среде буферного раствора с pH от 5,0 до 5,5, преимущественно 5,1+0,1 при температуре 25°C в течение от 6 до 14 ч, при этом менадион вносят в среду для трансформации одновременно со стероидным субстратом в виде раствора в полярном растворителе с последующим

35 выделением целевого продукта из культуральной жидкости.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что процесс продолжительностью от 6 до 14 ч проводят с концентрацией исходного субстрата от 10 до 20 г/л соответственно.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве полярного растворителя, смешивающегося с водой, используют апротонные растворители (предпочтительно диметилсульфоксид), или протонные растворители, например алифатические спирты

40 (предпочтительно этанол), при этом концентрация растворителя в водной среде составляет от 4 до 8 об.%.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве буферного раствора с диапазоном значений pH от 5,0 до 5,5 используют Na-ацетатный буфер, или Na-цитратный буфер, или раствор NaH_2PO_4 , подкисленный до pH 5,0 (предпочтительно Na-ацетатный буфер).

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что трансформацию проводят в водной среде, содержащей метил-β-циклодекстрин, взятый в количестве от 1,5 до 2 молей на 1 моль

50 загруженного субстрата.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что в трансформации используют растущую культуру бактерий *Nocardioide simplex* ВКМ Ас-2033Д, взятую в эффективном

количестве, предпочтительно от 0,1 до 0,17 г на 1 г загруженного субстрата в пересчете на сухой вес.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что в трансформации используют осажденные клетки *Nocardioides simplex* ВКМ Ас-2033Д, взятые в эффективном количестве, предпочтительно от 0,1 до 0,17 г на 1 г загруженного субстрата в пересчете на сухой вес.

10

15

20

25

30

35

40

45

50