



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12P 33/10 (2018.08); C12N 1/14 (2018.08); A61K 31/57 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2017138536, 07.11.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 07.11.2017

Дата регистрации:
 28.06.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.11.2017

(43) Дата публикации заявки: 08.05.2019 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 28.06.2019 Бюл. № 19

Адрес для переписки:

119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1,
 Московский государственный университет
 имени М.В. Ломоносова, Фонд "Национальное
 интеллектуальное развитие"

(72) Автор(ы):

Савинова Татьяна Степановна (RU),
 Савинова Ольга Сергеевна (RU),
 Вавилова Екатерина Александровна (RU),
 Васина Дарья Владимировна (RU),
 Тяжелова Татьяна Владимировна (RU),
 Федорова Татьяна Васильевна (RU),
 Чулкин Андрей Михайлович (RU),
 Сольев Павел Николаевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Московский государственный
 университет имени М.В. Ломоносова" (МГУ)
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: А.Н. EI-RIFAI, К.М. CHANEM,
 Some physiological relations of progesterone
 conversion by *Aspergillus nidulans*, *Egyptian
 journal of microbiology*, 1987, v.22(2), p. 327-
 338. Т.К. DUTTA, Т.В. SAMANTA,
 Bioconversion of progesterone by the activated
 immobilized conidia of *Aspergillus ochraceus*
 TS, *Current Microbiology*, 1999, v.39 (6), p. 309-
 312. М.Ж. (см. прод.)

(54) БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ 11 α -АЦЕТОКСИПРОГЕСТЕРОНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и касается штаммов микроорганизмов, способных осуществлять биотрансформацию прогестерона. Описана новая способность известных штаммов мицелиальных грибов, а именно штамма дикого типа *Aspergillus nidulans* F-1069 (synonym FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194) и его ауксотрофа *Aspergillus nidulans* 031 (argB⁻; rugG⁻), трансформировать стероидный субстрат: не только конвертировать прогестерон в 11 α -гидроксипрогестерон, но и проводить

ацетилирование образованного 11 α -гидроксипрогестерона. Указанная способность подтверждена как с помощью физико-химических методов анализа структуры органических соединений (масс-спектрометрия высокого разрешения, ЯМР-спектроскопия ¹H, ¹³C и 2D ЯМР), так и встречным химическим синтезом. При этом общая селективность 11 α -гидроксилирования достигает 99%, а содержание 11 α -ацетоксипрогестерона в смеси продуктов превышает 47%. 21 ил., 2 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

HENRY, H.D. SISLER, Effects of sterol biosynthesis - inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi, *Pesticide Biochemistry and physiology*, 1984, v.22(3), p. 262-275. **P.SOMAL, C.L. CHOPRA**, Microbial conversion of steroids. III: 11a- hydroxylation by fungal mycelium, *Applied Microbiology*, 1985, v. 21(5), p. 267-269. RU 2524617 C2, 27.07.2014.

R U 2 6 9 2 9 3 2 C 2

R U 2 6 9 2 9 3 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12P 33/10 (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12P 33/10 (2018.08); C12N 1/14 (2018.08); A61K 31/57 (2018.08)

(21)(22) Application: 2017138536, 07.11.2017

(24) Effective date for property rights:
07.11.2017Registration date:
28.06.2019

Priority:

(22) Date of filing: 07.11.2017

(43) Application published: 08.05.2019 Bull. № 13

(45) Date of publication: 28.06.2019 Bull. № 19

Mail address:

119991, Moskva, GSP-1, Leninskie gory, 1,
Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni
M.V. Lomonosova, Fond "Natsionalnoe
intellektualnoe razvitie"

(72) Inventor(s):

Savinova Tatyana Stepanovna (RU),
Savinova Olga Sergeevna (RU),
Vavilova Ekaterina Aleksandrovna (RU),
Vasina Darya Vladimirovna (RU),
Tyazhelova Tatyana Vladimirovna (RU),
Fedorova Tatyana Vasilevna (RU),
Chulkin Andrej Mikhajlovich (RU),
Solev Pavel Nikolaevich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
universitet imeni M.V. Lomonosova" (MGU)
(RU)

(54) BIOCATALYST FOR PRODUCING 11 α -ACETOXYPROGESTERONE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and concerns strains of microorganisms able to perform biotransformation of progesterone. Described is a new ability of known micellial fungi strains, specifically, a strain of wild type *Aspergillus nidulans* F-1069 (synonym FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194) and its auxotroph *Aspergillus nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻), transform a steroid substrate: not only convert progesterone into 11 α -

hydroxyprogesterone, but also acetylated formed 11 α -hydroxyprogesterone. Said ability is confirmed both by physical and chemical analysis methods of structure of organic compounds (mass spectrometry of high resolution, NMR-spectroscopy ¹H, ¹³C and 2D NMR) and counter chemical synthesis.

EFFECT: total selectivity 11 α -hydroxylation reaches 99 %, and content of 11 α -acetoxyprogesterone in the products mixture exceeds 47 %.

1 cl, 21 dwg, 2 tbl, 4 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и касается применения известных штаммов мицелиальных грибов для гидроксирования и ацетилирования стероидных соединений, в частности, соединений ряда прегнана (производных прогестерона) и может быть использовано в промышленной биотехнологии, а также в фармацевтической промышленности, для производства стероидных медицинских препаратов.

Уровень техники

Введение гидроксильной группы в положение C¹¹ стероидной молекулы имеет большое промышленное значение, так как не только обеспечивает изменение биологической активности исходной молекулы в желаемом направлении, но и создает возможность для дальнейшей модификации молекулы, например, введения атома галогена в положение C⁹, с целью создания фармакологически более активных производных. Осуществление 11(α/β)-гидроксирования стероидов микроорганизмами, особенно прогестерона, является экономически важным для производства кортикостероидов, так как одной из основных проблем их синтеза является введение кислородной функции в 11 положение, трудно осуществимое химическими методами. Так, например, химический синтез кортизона из желчных кислот включает -30 стадий и общий выход составляет несколько десятых долей процента [Л. Физер, М. Физер. Стероиды. Пер. с англ. Под ред. д.х.н. Н.Н Суворова и д.х.н. И.В. Торгова. М: Мир, 1964, с. 673]. Напротив, синтез ацетата кортизона из 11 α -гидроксипрогестерона состоит из 10 стадий и общий выход достигает 14,6% [SU 106380, 1956].

Известно, что 11-гидроксирование стероидов в одну стадию с высокой степенью селективности возможно только биотехнологически с применением ферментной системы микроорганизмов, в основном, мицелиальных грибов, одним из которых является род *Aspergillus*. Однако этому роду присуща видовая специфичность трансформации стероидов ряда прегнана. Так, трансформация прогестерона у ряда видов (например, *A. terreus* [K.Yildirim, A.Uzuner, and E.Y. Gulcuoglu. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus terreus* MRC 200365. Collect. Czech. Chem. Commun. 2010, Vol. 75(6), 665-673], *A.tamarii* [K.Yildirim, A.Uzuner and E.Y. Gulcuoglu. Baeyer-Villiger oxidation of some steroids by *Aspergillus tamarii* MRC 72400. Collect. Czech. Chem. Commun. 2011, Vol. 76(6), 743-754], *A. versicolor* [H.Y. Yang, H.L. Su, G. Du, G.J. Shen, J.X. Sun, and H.Y. Chen. Progesterone side-chain cleavage by *Aspergillus versicolor*. Advanced Materials Research. Advances in Chemical Engineering III. 2013.Vols. 781-784, 1164-1167; Abed Nosrat M. Side chain degradation of progesterone by *Aspergillus versicolor* 79. Pakistan Journal of Biochemistry, 1972, Vol. 5(1), 5-7], *A. flavus* [M.E. Mostafa, and A.A.Zohri. Progesterone side-chain degradation by some species of *Aspergillus flavus* group. Folia Microbiol (Praha). 2000; Vol. 45(3), 243-7]) может протекать не в направлении гидроксирования, а в направлении элиминирования боковой прегнановой цепи с образованием соединений ряда андростана. Другие штаммы рода *Aspergillus* способны гидроксировать прогестерон, вводя гидроксильную группу в различные положения молекулы, в том числе в 11 α -положение. При этом направление гидроксирования может существенно зависеть не только от видовой принадлежности штамма, но и от условий проведения трансформации.

Биотрансформация прогестерона с образованием 11 α -гидроксипрогестерона наиболее изучена с применением грибов *Aspergillus ochraceus*, селективность 11 α -гидроксирования у которых может достигать 90% и более [Т.К. Dutta, and Т.В. Samanta. Bioconversion of progesterone by the activated immobilized conidia of *Aspergillus ochraceus* TS. Curr. Microbiol. 1999; Vol. 39(6), 309-312; P.Somal, and C.L. Chopra. Microbial conversion

of steroids. III: 11 α -hydroxylation by fungal mycelium. Applied Microbiology and Biotechnology, 1985, Vol. 21(5), 267-269]. Штаммы *A. ochraceus* нашли применение в качестве промышленных культур.

Мицелиальный гриб *Aspergillus nidulans* является одной из наиболее известных эукариотических генетических систем и широко используется в качестве модельной системы для расшифровки биологии клеточного цикла, патогенности, лекарственной устойчивости, болезней человека, первичного и вторичного метаболизма других микроорганизмов. Несмотря на это, штаммы гриба *A. nidulans* как стероид-трансформирующие микроорганизмы мало изучены. Однако имеются сообщения, что этот вид обладает 11 α -монооксигеназной активностью и способен трансформировать прогестерон с образованием преимущественно 11 α -гидрокси-производного. Так, М.Ж. Henry и Н.Д. Sisler [M.J. Henry, and H.D. Sisler. Effects of sterol biosynthesis-inhibiting (SBI) fungicides on cytochrome P-450 oxygenations in fungi. Pesticide Biochemistry and Physiology, 1984, Vol. 22(3), 262-275], изучая влияние фунгицидов, ингибирующих биосинтез эргостерина в грибах, на цитохром-Р450-зависимое гидроксилирование прогестерона, сообщили, что гриб *A. nidulans* (Eidam) Winter (штамм 003) гидроксилирует прогестерон при начальной концентрации 100 мкг/мл с образованием смеси, содержащей 11 α -гидроксипрогестерон (50%), 6 β -гидроксипрогестерон (5%), 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерон (14%) и неконвертированный прогестерон (31%). При этом лиазная активность (расщепление боковой цепи по связи C¹⁷-C²⁰) у этого штамма не наблюдалась.

Также известно, что культура гриба *A. nidulans* (из коллекции Центра культур лаборатории микробиологической химии, National Research Centre, Каир, местная среда обитания), обладая стероид-11 α -гидроксилирующей активностью, может трансформировать прогестерон не только в 11 α -гидроксипрогестерон, но и в 21-гидроксипрогестерон (он же 11-дезоксикортикостерон) [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987, Vol. 22(2), 327-338; А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Microbial response to steroids. Egyptian Journal of Microbiology, 1989, Vol. 23(1), 1-11]. Авторы вносили прогестерон в ростовую среду в растворе 96% этанола с финальной концентрацией растворителя 1%. Трансформацию прогестерона проводили с нагрузкой 1 г/л при температуре 30 \pm 2 $^{\circ}$ С на качалке (200 об/мин, амплитуда 7 см) в течение 48 ч, при этом наблюдалось образование дигидроксилизованного производного - 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерона. Был сделан вывод, что при значениях рН среды, близких к нейтральным, 6 β -гидроксилирование является вторичным процессом и 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерон образуется из первично образованного 11 α -гидроксипрогестерона [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987, Vol. 22(2), 327-338].

Известно, что микроорганизмы способны ацетилировать стероидные вторичные спирты. Так, известна способность некоторых видов дрожжей и дрожжеподобных организмов (*Saccharomyces fragilis*, *S. lactis*, *Candida pseudotropicalis* и *Torulopsis sphaerica*) ацетилировать тестостерон [А. Сапек, М. Тадра, and J. Тума . Microbial transformations of steroids XXIV. Separation of androstane 17-hydroxy-epimers. Folia Microbiol. 1964, Vol. 9(6), 380-382]. При этом авторы отметили, что ацетилирование происходит только с 17 β -гидроксипроизводным, тогда как соответствующий 17 α -эпимер остается нетронутым. В этих условиях не происходит ацетилирования молекулы стероида с гидроксигруппой

в положениях 11 α , 11 β , 20 β и 21. Однако информация о способности мицелиальных грибов, к которым относится род *Aspergillus*, ацетилировать стероидные спирты, в литературных источниках отсутствует.

Из уровня техники известно, что ацетилирование 11 α -гидроксипрогестерона
5 осуществляют химически, используя в качестве ацетилирующего агента уксусный ангидрид. Так, известным химическим методом [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister, and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc, 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936] получают 11 α -ацетоксипрогестерон, ацетилируя 11 α -
10 гидроксипрогестерон (20 мг) действием уксусного ангидрида (0,6 мл) в среде пиридина (0,6 мл). Смесь выдерживают в течение 16 ч при комнатной температуре. По окончании реакции реакцию массу разбавляют 25 мл воды, выдерживают в течение 1 ч, охлаждают для начала кристаллизации. Кристаллы отделяют фильтрацией, промывают водой и сушат. Получают 16,1 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с т. пл. 176-177°C.

15 Таким образом, из уровня техники следует, что образование 11 α -ацетоксипрогестерона при трансформации прогестерона культурами мицелиальных грибов вообще, в частности, рода *Aspergillus*, конкретно *Aspergillus nidulans*, ранее не наблюдалось.

11 α -Гидроксипрогестерон (11 α -гидроксипрегн-4-ен-3,20-дион, CAS №80-75-1) является
20 физиологически активным производным прогестерона (прегн-4-ен-3, 20-диона, CAS №57-83-0) - нативного стероидного гормона, синтезируемого желтым телом яичника, корковым веществом (корой) надпочечников, семенными пузырьками и плацентой. Препараты на основе прогестерона применяются в качестве лекарственных средств в медицине и ветеринарии.

25 11 α -Гидроксипрогестерон, как и его 11 β -эпимер, обладает ингибирующей активностью в отношении фермента 11 β -гидроксистероид-дегидрогеназы, который окисляет 11-гидрокси-группу в 11-кето-группу, таким образом играя регулятивную роль в поддержании электролитного баланса [G.W. Souness, S.A. Latif, J.L. Laurenzo, D.J. Morris. 11 alpha- and 11 beta-hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid
30 dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. Endocrinology. 1995, Vol. 136(4), 1809-1812].

11 α -Ацетоксипрогестерон (11 α -гидроксипрогестерона ацетат, CAS №2268-98-6) обладает физиологической активностью, является активным фармацевтическим
ингредиентом и относится к средствам, снижающим риск преждевременных родов [<http://www.imcopharma.cz/ru/api/11-alfa-gidroksiprogesteron-acetat>].
35

11 α -Ацетоксипрогестерон и 11 α -гидроксипрогестерон, являясь производными прогестерона, обладающими гестагенной активностью, могут быть использованы в комбинации с природными или синтетическими эстрогенами в качестве активного
ингредиента как в препаратах для пероральной контрацепции, так и в препаратах для
40 гормональной заместительной терапии женщин в постклимактерический период.

Кроме того, 11 α -гидроксипрогестерон и его ацетат могут быть использованы не только в качестве прогестагенных средств, как указано выше, но и в качестве антиандрогенных агентов для снижения сальных выделений у пациентов, страдающих себореей, алопецией и другими заболеваниями кожи, связанными с
45 гиперандрогенизацией [RU 2432952, 2011], также известны косметические композиции для ухода за волосами и кожей головы, содержащие 11 α -гидроксипрогестерон или 11 α -ацетоксипрогестерон [DE 2757024, 1979], которые могут применяться для лечения выпадения волос, чрезмерной засаленности волос и кожи головы, вульгарных угрей и

т.п. При этом отмечено, что у этих соединений при местном применении гормональные побочные эффекты отсутствуют.

11 α -Гидроксипрогестерон и 11 α -ацетоксипрогестерон могут быть использованы как исходные продукты в синтезе других лекарственных средств для медицинского применения. Например, 11 α -гидроксипрогестерон может быть использован в синтезе 11-кетопрогестерона (кетогестина, CAS №516-15-4), который далее превращают в кортизон или 11 β -гидроксипрогестерон - предшественник нативного гидрокортизона - методами, известными из уровня техники. Химический метод перехода от 11 α -гидроксипрогестерона к 11-кетопрогестерону с выходом более 90% и далее в 11 β -гидроксипрогестерон описан в патенте [US 2015376225, 2015, примеры 1 и 7 соответственно]. Кроме того, 11 α -гидроксипрогестерон может быть использован в качестве исходного соединения в синтезе перспективных аналогов нейростероидного анестетика альфаксолона [P.Y. Savechenkov, D.C. Chiara, R. Desai, A.T. Stern, X.Zhou, A.M. Ziemba, A.L. Szabo, Y.Zhang, J.B. Cohen, S.A. Forman, K.W. Miller, K.S. Bruzik. Synthesis and pharmacological evaluation of neurosteroid photoaffinity ligands. European Journal of Medicinal Chemistry. 2017. Vol. 136, P. 334-347].

Однако о применении грибов *A. nidulans*, обладающих стероид-11 α -гидроксيليрующей активностью и способных конвертировать прогестерон в 11 α -гидроксипрогестерон, для получения 11 α -ацетоксипрогестерона из уровня техники не известно.

Раскрытие изобретения

Технической проблемой, решаемой с помощью настоящего изобретения, является расширение номенклатуры микроорганизмов, способных проводить 11 α -гидрокселирование прогестерона, а именно, применение известных штаммов аскомицета *A. nidulans* для 11 α -гидрокселирования прогестерона, а также расширение ассортимента методов ацелирования вторичной гидроксильной группы при атоме C¹¹ молекулы прогестерона, благодаря наличию способности штаммов по настоящему изобретению ацелировать вторичную гидроксильную группу при атоме C¹¹ молекулы прогестерона, как альтернативы химическому методу ацелирования.

Техническая проблема решалась путем использования следующих штаммов:

1. Штамм дикого типа *Aspergillus nidulans*, депонированный во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером F-1069 (synonym FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194).

2. Штамм *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) (synonym FP-308.1) - ауксотроф штамма *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069, несущий мутации argB2 и pyrG89 [U. Christensen, B.S. Gruben, S. Madrid, H. Mulder, I. Nikolaev, and R. P. de Vries. Unique Regulatory Mechanism for D-Galactose Utilization in *Aspergillus nidulans*. Appl Environ Microbiol. 2011, Vol. 77(19), 7084-7087].

Штамм *A. nidulans* ВКПМ F-1069

Штамм *A. nidulans* ВКПМ F-1069 ранее для биотрансформации прогестерона не применялся, его стероид-11 α -гидрокселирующая активность обнаружена впервые. Этот штамм впервые применен для биотрансформации прогестерона. Установлена способность этого штамма конвертировать прогестерон в 11 α -гидроксипрогестерон и 11 α -ацетоксипрогестерон.

Штамм *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻)

Штамм *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) - ауксотроф штамма *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069, несущий мутации argB2 (требующий аргинин) и pyrG89 (требующий уридин и урацил), ранее для биотрансформации прогестерона не применялся, его стероид-11 α -

гидроксигирующая активность обнаружена впервые. Этот штамм впервые применен для биотрансформации прогестерона. Установлена способность этого штамма конвертировать прогестерон в 11 α -гидроксипрогестерон и 11 α -ацетоксипрогестерон.

Было обнаружено, что наличие мутаций *argB2* и *rug89* у штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069 не изменяет его цитохром P450-зависимую монооксигеназную способность и направление гидроксигирования молекулы прогестерона, а также не приводит к изменению его ацетилирующей способности - компонентный состав продуктов одинаков.

Техническим результатом является биокаталитическое получение стероидных спиртов и их этерификация без применения химических методов. Получение 11 α -ацетоксипрогестерона биотрансформацией прогестерона в одну стадию имеет преимущества перед известным из уровня техники двухстадийным процессом, включающим следующие этапы: 1) микробиологическое 11 α -гидроксигирование прогестерона и 2) химическое ацетилирование вторичной 11 α -гидроксильной группы. Биотехнологическое 11 α -гидроксигирование прогестерона и ацетилирование образованного 11 α -гидроксипрогестерона с выделением или без выделения его из реакционной массы является экономически эффективным процессом, преимущества которого перед химическим методом ацетилирования состоят в следующем:

- процесс проводится без использования агрессивных химических реагентов, таких как уксусный ангидрид или хлорангидрид уксусной кислоты, без использования сильных минеральных кислот в качестве катализаторов ацетилирования, таких как 60% хлорная кислота;

- биокаталитическая этерификация 11 α -гидроксипрогестерона является альтернативой химическому методу ацетилирования, является экологически более чистым и безопасным методом;

- биокаталитическое ацетилирование протекает регионаправленно без образования побочного продукта енолацетилирования Δ^4 -3-кетогруппы молекулы 11 α -гидроксипрогестерона - 3, 11 α -диацетоксипрегна-3,5-диен-20-она, содержание которого при использовании химического метода ацетилирования может составлять 20-30%, что существенно осложняет очистку целевого 11 α -ацетоксипрогестерона и приводит к потерям его выхода.

Для достижения указанного выше технического результата по настоящему изобретению предлагается использовать известные штаммы *Aspergillus nidulans* в качестве биокатализаторов для биотехнологических процессов 11 α -гидроксигирования и 11 α -ацетоксилирования прогестерона, а также биокаталитической этерификации 11 α -гидроксипрогестерона.

11 α -Ацетоксипрогестерон при необходимости может быть гидролизован любым удобным способом с образованием 11 α -гидроксипрогестерона, известным из уровня техники. Так, например, известен химический метод получения 11 α -гидроксипрогестерона сольволизом 11 α -ацетоксипрогестерона действием (бистрибутиллово)оксида [M.G. Perez, and M.S. Maier. Mild deprotection of steroid esters by bis(tributyltin)oxide. *Tetrahedron Letters*, 1995. Vol. 36(19), 3311-3314] или традиционным способом химического сольволиза в условиях основного катализа: в среде метанола в присутствии КОН [T. Kubota, and F. Hayashi. *Studies on A-norsteroids - VI. Directing effects of C₁₁ substituents on the addition of osmium tetroxide to steroidal $\Delta^{1,4}$ -3-ketones.* *Tetrahedron*, 1967. Vol. 23, 995-1006].

Культуралыго-морфологические особенности заявляемых штаммов.

Штамм *A. nidulans* ВКПМ F1069

На агаризованной среде образует круглые колонии диаметром 30-35 мм через 7 суток роста. Поверхность ровная, выпуклая, пушистая. Текстура средней плотности. Край колоний плотный, ровный. Цвет колоний в зоне спороношения зеленовато-белый. Обратная сторона палево-коричневая. Эксудат отсутствует. Характеризуется интенсивным спороношением. Цвет спор зеленый.

Штамм *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻)

На агаризованной среде образует круглые колонии диаметром 30-35 мм через 10 суток роста (растет медленнее). Поверхность ровная, выпуклая, пушистая. Текстура средней плотности. Край колоний плотный, ровный. Цвет колоний в зоне спороношения зеленовато-белый. Обратная сторона палево-коричневая. Эксудат отсутствует. Характеризуется умеренным спороношением. Цвет спор зеленый.

Основным свойством штаммов по настоящему изобретению является наличие стероид-11 α -гидроксилирующей активности и способности конвертировать прогестерон в 11 α -ацетоксипрогестерон, а также ацетилирующей активности и способности этерифицировать 11 α -гидроксипрогестерон.

На фиг. 1 представлена схема трансформации прогестерона известными штаммами *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻).

Трансформация прогестерона протекает с первичным образованием 11 α -гидроксипрогестерона. Процессы ацетилирования гидроксильной группы образованного 11 α -гидроксипрогестерона и его 6 β -гидроксилирования с образованием 6 β ,11 α -дигидроксипрогестерона являются вторичными, конкурентными процессами трансформации, причем процесс биокаталитической этерификации имеет преимущества. Этот вывод подтвержден экспериментально. При продолжительности трансформации 14 ч штаммами *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) в культуральной среде определено наличие только 11 α -ацетоксипрогестерона и нетрансформированного исходного субстрата. Кроме того, используя 11 α -гидроксипрогестерон вместо прогестерона в качестве исходного субстрата в аналогичных условиях трансформации штаммами *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻), было отмечено, что в течение 23 ч имеет место образование исключительно 11 α -ацетоксипрогестерона.

Таким образом, сущность заявленного изобретения заключается в применении известных штаммов *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) по новому назначению, а именно для 11 α -гидроксилирования прогестерона и ацетилирования 11 α -гидроксипрогестерона с выделением или без выделения из культуральной жидкости.

Преимущества применения штаммов по настоящему изобретению состоят в способности конвертировать прогестерон в 11 α -гидроксипрогестерон и ацетилировать гидроксильную группу в молекуле 11 α -гидроксипрогестерона с образованием 11 α -ацетоксипрогестерона как с выделением 11 α -гидроксипрогестерона из культуральной среды, так и без выделения, *in situ*.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена схема трансформации прогестерона штаммами *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻).

На фиг. 2, 5 и 13 представлены хроматограммы хромато-масс-спектрометрического анализа 11 α -гидроксипрогестерона, 11 α -ацетоксипрогестерона и 6 β , 11 α -дигидроксипрогестерона соответственно.

На фиг. 3 и 4 представлены ¹H ЯМР-спектры 11 α -гидроксипрогестерона.

На фиг. 6-12 представлены ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, DEPT-ЯМР-, HSQC-ЯМР- и HMBC-ЯМР- спектры 11α -ацетоксипрогестерона.

На фиг. 14-21 представлены ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-, DEPT-ЯМР-, HSQC-ЯМР- и HMBC-ЯМР - спектры $6\beta,11\alpha$ -дигидроксипрогестерона.

Осуществление изобретения

Штамм дикого типа *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 (synonym FGSC A4; ATCC 3863, 12996, 26451; CBS 112.46; NRRL 194) был получен из Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ).

Прогестерон (I) (CAS №57-83-0, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$), 11α -гидроксипрогестерон (II) (CAS №80-75-1, $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$) и 11α -ацетоксипрогестерон ($\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$, M.w. 372.5 являются коммерчески доступными и могут быть приобретены, например, у компании Steraloids Inc. (USA) или у других производителей.

Неорганические соли были приобретены у компании Fluka (Germany). Дрожжевой экстракт и агар - Difco Vестon Dickinson and company (Sparks, USA).

Другие реагенты, растворители, и инертные газы являются коммерчески доступными, были приобретены у российских производителей.

Для приготовления сред для культивирования и трансформации, водных растворов кислот, солей и щелочей использовали дистиллированную воду. Для промывки экстрактов в органических растворителях использовали питьевую водопроводную воду, если не оговорено особо.

Все процедуры, если не оговорено особо, осуществляли при комнатной температуре или температуре окружающей среды, то есть в диапазоне от 20 до 25°C . Для процессов, требующих более низкие температуры, чем комнатная, охлаждение обеспечивали холодной водопроводной водой (в диапазоне от 10 до 20°C), или смесью колотого льда и холодной воды (в диапазоне от 5 до 10°C), или смесью колотого льда и хлорида кальция (при температуре ниже 5°C).

Культивирование микроорганизмов осуществляли на качалке New Brunswick™ Innova® 44/44R в термостатированном помещении при температуре 37°C (240-250 об/мин., амплитуда 5 см).

Упаривание растворителей в вакууме осуществляли с использованием ротационного вакуумного испарителя Rotavapor (Büchi Labortechnik AG), при остаточном давлении $0,35\pm 0,05$ кгс/см² (35 ± 5 кПа) и температуре воды в бане в диапазоне от 35 - 50°C в зависимости от природы упариваемого растворителя.

Высушивание кристаллов продуктов до постоянного веса осуществляли при температуре 35 - 45°C при атмосферном давлении или с использованием вакуум-сушильного шкафа при остаточном давлении $0,35\pm 0,05$ кгс/см² (35 ± 5 кПа).

Для определения рН промывных вод использовали универсальную индикаторную бумагу с диапазоном значений от 0 до 12 (Ляхема, Чехия).

Колоночную хроматографию осуществляли на колонке (16×650 мм), используя силикагель марки Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck, Germany).

Контроль за ходом элюирования осуществляли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), используя пластины Silica gel 60 F254 (Merck, Germany) и хроматографические системы растворителей: дихлорметан-ацетон 9:1 (v/v) или дихлорметан-ацетон 4:1 (v/v). Пластины просматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм, затем опрыскивали 1% раствором ванилина в 10% водном растворе HClO_4 , проявляли при температуре 100 - 120°C .

Структуру и чистоту всех выделенных соединений подтверждали, по меньшей мере, одним из следующих методов: ТСХ (пластины для ТСХ Silica gel 60 F254 (Merck, Germany)), масс-спектрометрия, элементный анализ, ядерный магнитный резонанс (ЯМР), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

5 Температуру плавления выделенных соединений определяли на приборе для определения точки плавления М-565 (Büchi Labortechnik AG).

¹H- и ¹³C- ЯМР спектры были определены на спектрометре Bruker Avance-400 (Bruker BioSpin GmbH) с рабочей частотой 400 МГц и 100.6 МГц соответственно, используя дейтерированный хлороформ (99,8% D, Sigma-Aldrich), или дейтерированный диметилсульфоксид (99,9% D, Sigma-Aldrich) в качестве растворителя относительно тетраметилсилана (TMS NMR grade ≥99,9%, Sigma-Aldrich) в качестве внутреннего стандарта, в миллионных долях (м.д.).

15 Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на приборе Bruker Daltonics micrOTOF-Q II, используя электрораспылительную ионизацию (ESI). Измерения были получены в режиме положительных ионов со следующими параметрами: граничное напряжение капилляра 4500 В; диапазон масс от m/z 50 до 3000; внешняя калибровка (Electricpray Calibrant Solution, Fluka); давление распылителя 0,4 бар; скорость потока 3 мкл/мин; азот применяли в виде сухого газа (6 л/мин); температура интерфейса была
20 установлена при 180°C. Образец вводили в камеру масс-спектрометра из системы HPLC Agilent 1260, снабженной колонкой Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0×50 μm; 2,7 urn) и защитой, используя автосамплер. Образец вводили в растворе 50% ацетонитрила (квалификация LC-MS) в воде (ультрачистая вода MilliQ, Merck Millipore KGaA, Germany), и колонку элюировали смесью ацетонитрила (А) и воды (В) в градиенте концентраций
25 со скоростью потока 400 мкл/мин в следующих параметрах градиента: 0-15% А в течение 6 мин, 15% -85% А в течение 1,5 мин, 85% -0% А в течение 0,1 мин, 0% А в течение 2,4 мин. Время удерживания было следующим: 11α-гидроксипрогестерон - 5,2 мин; прогестерон - 6,7 мин; 11α-ацетоксипрогестерон - 6,0 мин; 6β, 11α дигидроксипрогестерон - 4,2 мин.

30 Образование 11α-ацетоксипрогестерона в результате трансформации прогестерона или 11α-гидроксипрогестерона культурами *A. nidulans* ВКПМ F-1069 и *A. nidulans* 031 (argB⁻; purG⁻) подтверждено данными спектров ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР, 2DЯМР, хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения. На фиг. №№5,6,7-14 и 16-21 приведены спектры и на фиг. №№4,7 и 15 - хроматограммы полученных соединений.

35 Для подтверждения образования 11α-ацетоксипрогестерона в процессе трансформации прогестерона или 11α-гидроксипрогестерона культурами *A. nidulans* 11α-ацетоксипрогестерон был получен химическим синтезом из 11α-гидроксипрогестерона с применением метода ацетилирования.

40 При осуществлении изобретения помимо методов, подробно раскрытых в нижеследующих примерах, использовали хорошо известные специалистам методики, описанные в руководствах по молекулярной биологии и генетической инженерии [J. Sambrook, T. Maniatis, and E.F. Fritsch. Molecular cloning a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989; F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Current Protocols in Molecular Biology,
45 John Wiley and Sons, N.Y., 1997)].

Выходы 11α-гидроксипрогестерона и 11α-ацетоксипрогестерона, полученные биотрансформацией прогестерона и 11α-гидроксипрогестерона штаммами по настоящему изобретению и приведенные в примерах заявляемого изобретения,

безусловно, ниже тех, которые необходимы для эффективного промышленного процесса. Однако примеры даны лишь для иллюстрации биокаталитической способности заявляемых штаммов конвертировать прогестерон не только в 11 α -гидроксипрогестерон, но и в ацетат 11 α -гидроксипрогестерона. Следует отметить, что указанная

5 ацетилирующая способность выявлена впервые. Выходы могут быть значительно улучшены за счет оптимизации условий проведения биотрансформации с целью минимизации образования 6 β , 11 α -дигидроксипрогестерона и сдвига направления вторичной модификации 11 α -гидроксипрогестерона в сторону ацетилирования. Известно, что состав продуктов зависит от состава среды, рН среды, возраста культуры,

10 от индукции исходным субстратом или продуктом [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987. Vol. 22(2), 327-338]. Поэтому для снижения активности вторичного энзима 6 β -гидроксилазы и уменьшения количества, образованного 6 β , 11 α -дигидроксипрогестерона необходимо оптимизировать параметры проведения процесса

15 трансформации, например, значение рН среды, возраст культуры, способ внесения субстрата, состав среды для трансформации, температурный режим и другие, известные из уровня техники. Для примера в таблице 1 приведено влияние состава среды на конверсию прогестерона заявляемыми штаммами и на их 11 α -монооксигеназную активность (суммарно), а в таблице 2 - на относительную селективность образования

20 11 α -гидроксипрогестерона и 11 α -ацетоксипрогестерона, при прочих одинаковых условиях.

Для трансформации мы использовали 2 варианта сред следующего состава: 1 - среда СМ, использованная А. Čapek et al [А. Čapek, М. Tadra, J. Tůma. Microbial transformations of steroids XXIV. Separation of androstane 17-hydroxy-epimers. Folia Microbiologica. 1964.

25 Vol. 9(6), 380-382] для ацетилирования тестостерона дрожжами и описанная в статье А.Н. El-Refai и К.М. Ghanem [А.Н. El-Refai, and К.М. Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987. Vol. 22(2), 327-338] (среда II, рН 6,5), как наиболее благоприятная для конверсии прогестерона в 11 α -гидрокси-производное культурой *A. nidulans*. Состав среды, г/л:

30 глюкоза - 40; MgSO₄ × 7H₂O - 1; KH₂PO₄ - 0,74; пептон - 1; дрожжевой экстракт - 1; L-аспарагин - 0,7.

2 - минимальная синтетическая среда ММ. Состав среды, г/л: глюкоза - 20; MgSO₄ × 7H₂O

35 - 0,52; KH₂PO₄ - 1,52; NaNO₃ - 0,85; CuSO₄ × 5H₂O - 0,13; CaCl₂ - 0,11; KCl - 0,52, H₃BO₃ - 5 × 10⁻⁶; MnSO₄ × 5H₂O - 1 × 10⁻³; ZnSO₄ × 7H₂O - 0,8 × 10⁻³; Na₂MoO₄ × 4H₂O - 0,8 × 10⁻³; FeSO₄ × 5H₂O - 0,8 × 10⁻³; 0,5 М фосфатно-цитратный буфер (рН 6.6) - 200 мл/л.

40 При культивировании штамма *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) в среды ММ и СМ добавляли аргинин - 0,21 г/л, уридин - 1,1 г/л и урацил - 1,2 г/л.

Известно, что минеральные соли, добавленные в среду для культивирования, в частности, CuSO₄, могут быть ингибиторами стероид-С21-монооксигеназы (ЕС №1.14.99.10 [Springer Handbook of Enzymes, Vol. 27, Class 1. Oxidoreductases XII. ЕС 1.14.15-1.97. Second edition. Springer. 2006, p.302]). Однако результаты показывают, что на среде

45 СМ образование 21-гидроксипрогестерона как продукта трансформации не наблюдается. Следует отметить, что 21-гидроксипрогестерон наряду с 11 α -гидроксипрогестероном является одним из продуктов трансформации прогестерона в

этой среде штаммом *A. nidulans* известным способом [А.Н. El-Refai, and K.M.Ghanem. Some physiological relations of progesterone conversion by *Aspergillus nidulans*. Egyptian Journal of Microbiology, 1987, Vol. 22(2), 327-338].

Заявленное изобретение иллюстрируется следующими примерами.

5 Пример 1. Общий метод биотрансформации прогестерона штаммами *Aspergillus nidulans* на средах ММ и СМ в течение 66 ч

Для получения споровой суспензии штаммы выращивали при температуре 37°C в течение 7-10 дней на агаризованной среде МПА (мальт-экстракт - 3 г/л, пептон - 1 г/л, агар - 20 г/л). При культивировании штамма *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) в среду добавляли аргинин - 0,21 г/л, уридин - 1,1 г/л и урацил - 1,2 г/л. Споровую суспензию высевали в качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл ростовой среды (ММ или СМ), выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37°C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили прогестерон в виде раствора в диметилсульфоксиде до финальной концентрации 1 г/л, при этом концентрация растворителя не превышала 6% (об.). Трансформацию проводили в течение 66 ч в тех же условиях, параллельно культивируя штаммы без прогестерона в качестве контроля. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях.

Для извлечения продуктов трансформации прогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре. Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили Na₂SO₄, осветляли активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания (фиг. 2). В качестве элюэнта использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 25 об.% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Результаты биотрансформации прогестерона штаммами *A. nidulans* по настоящему изобретению приведены в таблицах 1 и 2.

Пример 2. Биотрансформация прогестерона штаммами *A. nidulans* в течение 14 ч

35 Вариант 1. Споровую суспензию штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069 высевали в 4 качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл среды ММ для культивирования, выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37°C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили прогестерон в растворе диметилсульфоксида до финальной концентрации 1 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 4% (об.). Трансформацию проводили в течение 14 ч в тех же условиях.

45 Для извлечения продуктов трансформации прогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре. Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили Na₂SO₄, осветляли

активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания. В качестве элюэнта использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 25 об.% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Одинаковые по составу стероидов фракции элюата объединяли и упаривали досуха. Кристаллизирующийся остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, сушили до постоянного веса в вакуум-сушильном шкафу. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Из 400 мг прогестерона, загруженного на трансформацию, получили 394 мг прогестерона (98,5%) и 3,8 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с выходом 0,8% на загруженный субстрат (53,5% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

Вариант 2. Биотрансформацию прогестерона штаммом *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻) проводили в условиях варианта 1.

Из 400 мг прогестерона, загруженного на трансформацию, получили 390 мг прогестерона (97,5%) и 7,4 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с выходом 1,6% на загруженный субстрат (62,5% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

Пример 3. Биокаталитическое ацетилирование 11 α -гидроксипрогестерона штаммами *A. nidulans*

Вариант 1. Споровую суспензию штамма *A. nidulans* ВКПМ F-1069 высевали в 4 качалочные колбы вместимостью 750 мл, содержащие по 100 мл среды MM для культивирования, выращивали на качалке (240-250 об/мин, амплитуда 5 см) при температуре 37 $^{\circ}$ C в течение 4 дней. Затем в ростовую среду вносили 11 α -гидроксипрогестерон в растворе диметилсульфоксида до финальной концентрации 0,5 г/л, при этом концентрация растворителя составляла 2% (об.). Трансформацию проводили в течение 23 ч в тех же условиях.

Для извлечения продуктов трансформации 11 α -гидроксипрогестерона по окончании инкубации мицелий отфильтровывали, промывали дихлорметаном на фильтре.

Культуральную жидкость экстрагировали трижды порциями дихлорметана равного объема. Стероиды, адсорбированные на мицелии, извлекали ре-мацерацией (трижды), используя метанол и выдерживая без перемешивания в течение 4 ч. Метанол упаривали, остаток, содержащий воду, экстрагировали дихлорметаном трижды. Объединенные экстракты культуральной жидкости и мицелия промывали водой, сушили Na₂SO₄,

осветляли активированным углем и упаривали до прекращения погона. Остаток растворяли в 5 мл смеси этилацетата и дихлорметана (1:2) и хроматографировали на колонке, используя 30-кратное количество силикагеля к весу остатка после упаривания.

В качестве элюэнта использовали смесь дихлорметана и ацетона (от 0 до 20 об.% ацетона), для контроля элюции использовали ТСХ. Одинаковые по составу стероидов фракции элюата объединяли и упаривали досуха. Кристаллизирующийся остаток растирали с эфиром, осадок отфильтровывали, сушили до постоянного веса в вакуум-сушильном шкафу. Хроматографическую чистоту соединений подтверждали с помощью ТСХ и ЯМР-спектроскопии.

Из 200 мг 11 α -гидроксипрогестерона, загруженного на трансформацию, получили 178 мг 11 α -гидроксипрогестерона (88%) и 19,75 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с выходом 8,76% на загруженный субстрат (79,64% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

Вариант 2. Битрансформацию 11 α -гидроксипрогестерона штаммом *A. nidulans* 031 (argB⁻, pyrG⁻) проводили в условиях варианта 1.

Из 200 мг 11 α -гидроксипрогестерона, загруженного на трансформацию, получили 170 мг 11 α -гидроксипрогестерона (85%) и 31,6 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с выходом 14,02% на загруженный субстрат (93,45% на конвертированный субстрат). По данным ТСХ анализа другие продукты трансформации отсутствуют.

ЯМР-спектры полученных образцов 11 α -ацетоксипрогестерона идентичны спектрам стандартного образца и спектрам образца, полученного химическим методом ацетилирования 11 α -гидроксипрогестерона.

Пример 4. Получение 11 α -ацетоксипрогестерона химическим методом

К раствору 34 мг 11 α -гидроксипрогестерона в 0,2 мл уксусного ангидрида добавили 1 каплю 60% хлорной кислоты. Реакционную массу выдерживали при комнатной температуре в течение 1 ч. По окончании реакции реакцию массу добавляли по каплям в 5 мл воды, содержащей 1 мл 25% раствора аммиака (рН ~7.5). Перемешивали 30 мин., затем реакцию массу экстрагировали дихлорметаном трижды, экстракт промыли водой до нейтральной реакции, упарили досуха. Получили 39 мг остатка, из которого препаративной хроматографией извлекли 27 мг 11 α -ацетоксипрогестерона с выходом 70,45%. Т.пл. 173-174°C (лит.Т.пл. 176-177°C [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister, and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc, 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936])

Характеристика продуктов биотрансформации 11 α -Гидроксипрогестерон, полученный в условиях общего метода биотрансформации прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 Т.пл. 164-166°C (лит.Т.пл. 164-165°C [K. Yildirim, and A. Kuru. Biotransformation of some steroids by *Aspergillus candidus*. Journal of Chemical Research, 2015. Vol. 39(9), 546-549]). М.в. 330.46.

Масс-спектр высокого разрешения C₂₁H₃₀O₃ (m/z): рассчитано для [M+H]⁺331.2268, найдено 331.2264; рассчитано для [M+Na]⁺353.2087, найдено 353.2088.

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): 5.73 (с, 1H CH-4), 4.04 (дд (псевдо-дт), 1H, ³J_{11,9}=10.3 Гц, ³J_{11,12 α} 4.8 Гц, ³J_{11,12 β} 4.6 Гц, CH-11), 2.66 (дт, 1H, ²J_{1 β ,1 α} 13.7 Гц, ³J_{1 β ,2} 4.4 Гц, CH-1 β), 2,55 (дд (псевдо-т), 1H, ³J_{17,16 α} 8.7 Гц, ³J_{17,16 β} 9.1 Гц, CH-17), 2.48-2.26 (м, 5H, CH₂-2 & CH₂-6 & CH-12 β), 2.22-2.10 (м, 1H, CH-16 β), 2.13 (с, 3H, CH₃-21), 2.02 (тд, 1H, ²J_{1 α ,1 β} 13.7 Гц, ³J_{1 α ,2} 4.5 Гц, CH-1 α), 1.87-1.81 (м, 1H, CH-7 β), 1.78-1.64 (м, 3H, CH-8 & CH-15 α & CH-16 α), 1.58-1.47 (2H (т, 1H, ³J_{12 α ,12 β} 11.3 Гц, CH-12 α), 1.31 (с, 3H, CH₃-19), 1.29-1.20 (м, 2H, CH-12 α & CH-14), 1.14 (т, 1H, ³J_{9,8} 10.3 Гц, CH-9), 1.14-1.04 (2хддд, 2H, ³J_{7 α ,7 β} 13.1 Гц, ³J_{7,6} 13.0 Гц, ³J_{7 α ,8} 3.8 Гц, CH₂-7 α), 0.69 (с, 3H, CH₃-18) (фиг. 3).

Спектры идентичны спектрам стандартного образца и образца, полученного в условиях общего метода биотрансформации прогестерона штаммом *A. nidulans* 031 (argB⁻; pyrG⁻).

11 α -Ацетоксипрогестерон. полученный в условиях общего метода биотрансформации прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 Т.пл. 172-174°C (лит.Т.пл. 176-177°C [D.H. Peterson, H.C. Murray, S.H. Eppstein, L.M. Reineke, A. Weintraub, P.D. Meister,

and H.M. Leigh. Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J. Am. Chem. Soc, 1952, Vol. 74 (23), 5933-5936]. М.в. 372.5;

Масс-спектр высокого разрешения $C_{23}H_{32}O_4$ (m/z): рассчитано для $[M+H]^+373.2373$,
 5 найдено 373.2361; рассчитано для $[M+Na]^+395.2193$, найдено 395.2183.

1H -ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): 5.67 (с, 1H CH-4), 5.14 (дт, 1H, $^3J_{11,9}=10.6$ Гц, $^3J_{11,10}$
 5.0 Гц, CH-11), 2,62 (дд (псевдо-т), 1H, $^3J_{17,16\alpha}$ 8.9 Гц, $^3J_{17,16\beta}$ 9.1 Гц, CH-17), 2.47-2.35
 (м, 2H, CH-2 β & CH-6 β), 2.29-2.12 (м, 3H, CH-6 α & CH-12 β & CH-2 α), 2.10-1.96 (м, 1H,
 10 CH-16 β), 2.05 (с, 3H, CH₃-21), 2.01 (с, 3H, CH₃-23), 1.91-1.78 (м, 3H, CH₂-1 & CH-7 α),
 1.72-1.60 (м, 3H, CH-16 α & CH-15 α & CH-8), 1.50 (т, 1H, $^3J_{12\alpha,12\beta}$ 11.6 Гц, CH-12 α), 1.44
 (т, 1H, $^3J_{9,8}$ 10.6 Гц, CH-9), 1.39-1.29 (ддд, 1H, $^3J_{14,8}$ 10.7 Гц, $^3J_{14,15\beta}$ 6.4 Гц, $^3J_{14,15\alpha}$ 5.6
 15 Гц, CH-14) 1.29 (уш.с, 4H, CH₃-19 & CH-15 β), 1.17-1.00 (2 \times ддд, 2H, $^3J_{7\alpha,7\beta}$ 12.6 Гц, $^3J_{7,6\alpha}$
 $^3J_{7,6\beta}$ 12.2 Гц, $^3J_{7\alpha,8}$ 3.1 Гц, CH₂-7), 0.64 (с, 3H, CH₃-18).

^{13}C -ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): 208.61 (с, CO-20), 199.40 (с, CO-3), 170.14 (с, C-5),
 170.10 (с, CO-22) 124.48 (с, CH-4), 70.58 (с, CHOH-11), 62.30 (с, CH-17), 55.34 (с, CH-9),
 20 54.39 (с, CH-14), 45.02 (с, CH₂-12), 43.54 (с, C-13), 39.75 (с, C-10), 36.79 (с, CH₂-1), 34.72
 (с, CH-8) 34.19 (с, CH₂-2), 33.03 (с, CH₂-6), 31.67 (с, CH₂-7), 31.37 (с, CH₃-21) 30.92 (с,
 CH₃-21), 24.16 (с, CH₂-15), 22.96 (с, CH₂-16), 22.02 (с, CH₃-21), 18.20 (с, CH₃-19), 14.24
 (с, CH₃-18).

25 Спектры идентичны спектрам стандартного образца, образца, полученного в условиях
 общего метода биотрансформации прогестерона штаммом *A. nidulans* 031 ($argB^-$; $purG^-$),
 а также спектрам образцов, полученных методом биокаталитического ацетилирования
 11 α -гидроксипрогестерона штаммом *A. nidulans* 031 ($argB^-$; $purG^-$) и химическим методом
 ацетилирования 11 α -гидроксипрогестерона.

30 6 β , 11 α -Дигидроксипрогестерон, полученный в условиях общего метода
 биотрансформации прогестерона штаммом *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069 Т.пл. 242-
 244 $^{\circ}C$ (лит.т.пл. 244-246 $^{\circ}C$ [Z. Habibi, M. Yousefi, Sh. Ghanian, M. Mohammadi, S. Ghasemi.
 Biotransformation of progesterone by *Absidia griseolla* var. *igachii* and *Rhizomucor pusillus*.
 Steroids, 2012, Vol. 77, p.1446-1449].М.в. 346.46;

35 Масс-спектр высокого разрешения $C_{23}H_{32}O_4$ (m/z): рассчитано для $[M+H]^+373.2373$,
 найдено 373.2361; рассчитано для $[M+Na]^+395.2193$, найдено 395.2183.

1H -ЯМР (300 МГц, DMSO- d_6): 5.67 (с, 1H CH-4), 5.14 (дт, 1H, $^3J_{11,9}=10.6$ Гц, $^3J_{11,10}$
 40 5.0 Гц, CH-11), 2,62 (дд (псевдо-т), 1H, $^3J_{17,16\alpha}$ 8.9 Гц, $^3J_{17,16\beta}$ 9.1 Гц, CH-17), 2.47-2.35
 (м, 2H, CH-2 β & CH-6 β), 2.29-2.12 (м, 3H, CH-6 α & CH-12 β & CH-2 α), 2.10-1.96 (м, 1H,
 CH-16 β), 2.05 (с, 3H, CH₃-21), 2.01 (с, 3H, CH₃-23), 1.91-1.78 (м, 3H, CH₂-1 & CH-7 α),
 1.72-1.60 (м, 3H, CH-16 α & CH-15 α & CH-8), 1.50 (т, 1H, $^3J_{12\alpha,12\beta}$ 11.6 Гц, CH-12 α), 1.44
 45 (т, 1H, $^3J_{9,8}$ 10.6 Гц, CH-9), 1.39-1.29 (ддд, 1H, $^3J_{14,8}$ 10.7 Гц, $^3J_{14,15\beta}$ 6.4 Гц, $^3J_{14,15\alpha}$ 5.6
 Гц, CH-14) 1.29 (уш.с, 4H, CH₃-19 & CH-15 β), 1.17-1.00 (2 \times ддд, 2H, $^3J_{7\alpha,7\beta}$ 12.6 Гц, $^3J_{7,6\alpha}$
 $^3J_{7,6\beta}$ 12.2 Гц, $^3J_{7\alpha,8}$ 3.1 Гц, CH₂-7), 0.64 (с, 3H, CH₃-18).

$6\alpha\text{-}^3\text{J}_{7,6\beta}$ 12.2 Гц, $^3\text{J}_{7\alpha,8}$ 3.1 Гц, $\text{CH}_2\text{-}7$), 0.64 (с, 3H, $\text{CH}_3\text{-}18$).

^{13}C -ЯМР (300 МГц, DMSO-d_6): 208.61 (с, CO-20), 199.40 (с, CO-3), 170.14 (с, C-5), 170.10 (с, CO-22) 124.48 (с, CH-4), 70.58 (с, CHOH-11), 62.30 (с, CH-17), 55.34 (с, CH-9), 54.39 (с, CH-14), 45.02 (с, $\text{CH}_2\text{-}12$), 43.54 (с, C-13), 39.75 (с, C-10), 36.79 (с, $\text{CH}_2\text{-}1$), 34.72 (с, CH-8) 34.19 (с, $\text{CH}_2\text{-}2$), 33.03 (с, $\text{CH}_2\text{-}6$), 31.67 (с, $\text{CH}_2\text{-}7$), 31.37 (с, $\text{CH}_3\text{-}21$) 30.92 (с, $\text{CH}_3\text{-}21$), 24.16 (с, $\text{CH}_2\text{-}15$), 22.96 (с, $\text{CH}_2\text{-}16$), 22.02 (с, $\text{CH}_3\text{-}21$), 18.20 (с, $\text{CH}_3\text{-}19$), 14.24 (с, $\text{CH}_3\text{-}18$).

Спектры идентичны спектрам образцов, полученных в условиях общего метода биотрансформации прогестерона штаммом *A. nidulans* 031 (argB^- ; pyrG^-).

Таблица 1. Влияние состава среды на конверсию прогестерона заявляемыми штаммами *Aspergillus nidulans* и их 11α -монооксигеназную активность

Штамм	<i>A. nidulans</i> ВКПМ F-1069		<i>A. nidulans</i> 031 (argB^- ; pyrG^-)	
	ММ	СМ	ММ	СМ
Среда для культивирования	ММ	СМ	ММ	СМ
Конверсия прогестерона, %	65,62	85,39	72,98	80,52
11α -монооксигеназная активность, % mol	54.33	80.12	59,44	99,4

Таблица 2. Влияние состава среды на относительную селективность (% mol) образования продуктов трансформации прогестерона заявляемыми штаммами *Aspergillus nidulans*

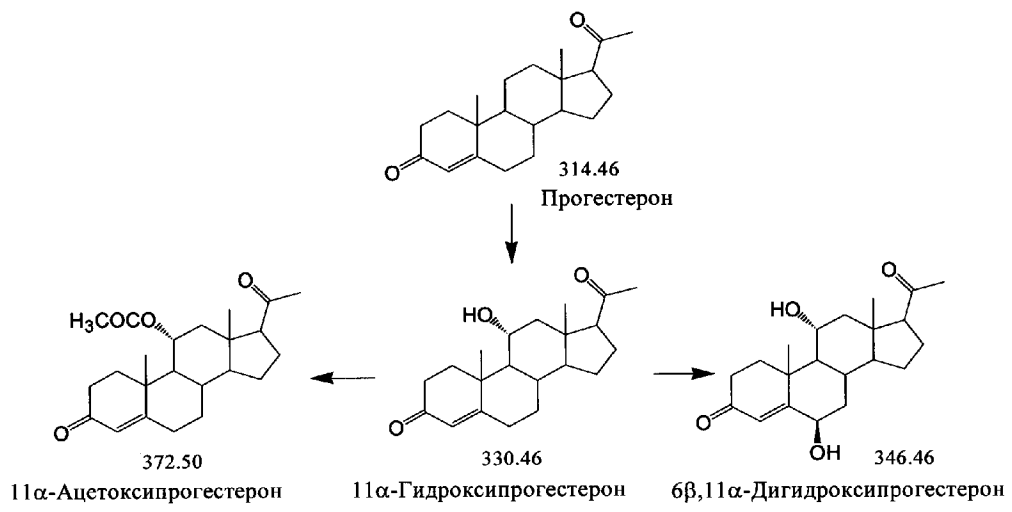
Штамм	<i>A. nidulans</i> ВКПМ F-1069		<i>A. nidulans</i> 031 (argB^- ; pyrG^-)	
	ММ	СМ	ММ	СМ
Среда для культивирования	ММ	СМ	ММ	СМ
11α -Ацетоксипрогестерон	7.7	29.53	14.2	47,4
11α -Гидроксипрогестерон	53.9	17.05	51.4	13.8
$6\beta,11\alpha$ -Дигидроксипрогестерон	38.4	53.42	34.4	38.8

Таким образом, раскрыто применение грибов *A. nidulans*, обладающих стероид- 11α -гидроксилирующей активностью и способных конвертировать прогестерон в 11α -гидроксипрогестерон, для получения 11α -ацетоксипрогестерона из уровня техники не известно. При этом этерификация 11α -гидроксипрогестерона грибом *A. nidulans* с образованием 11α -ацетоксипрогестерона является вторым этапом процесса трансформации прогестерона и может быть осуществлена как с выделением, так и без выделения 11α -гидроксипрогестерона из культуральной жидкости, образованного на первом этапе биотрансформации.

(57) Формула изобретения

Применение штамма *Aspergillus nidulans*, депонированного во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером F-1069 или штамма *Aspergillus nidulans* 031 (argB^- ; pyrG^-), являющегося ауксотрофом штамма *Aspergillus nidulans* ВКПМ F-1069, несущего мутации $\text{argB}2$ и $\text{pyrG}89$, в качестве биокатализатора для получения 11α -ацетоксипрогестерона.

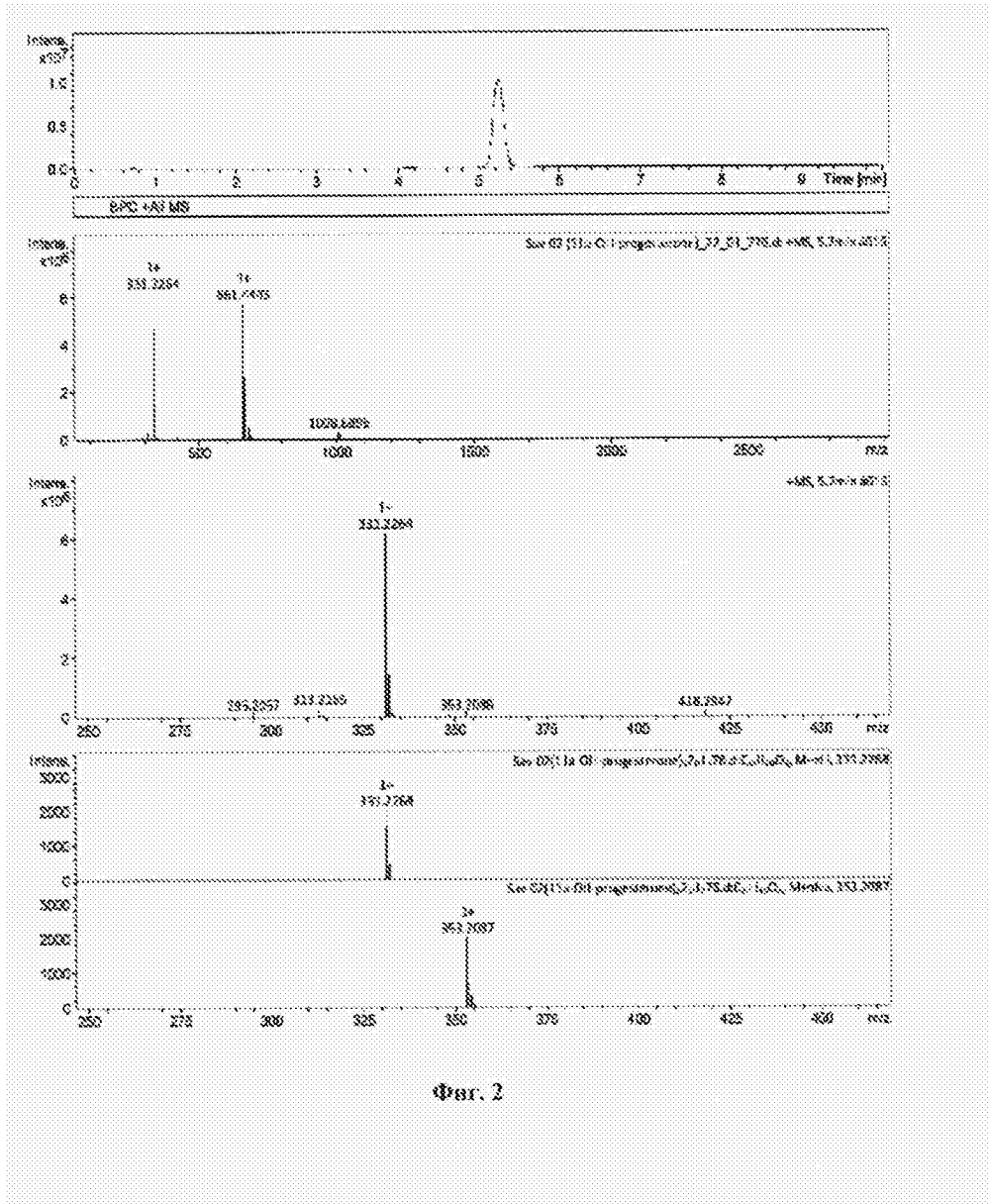
1



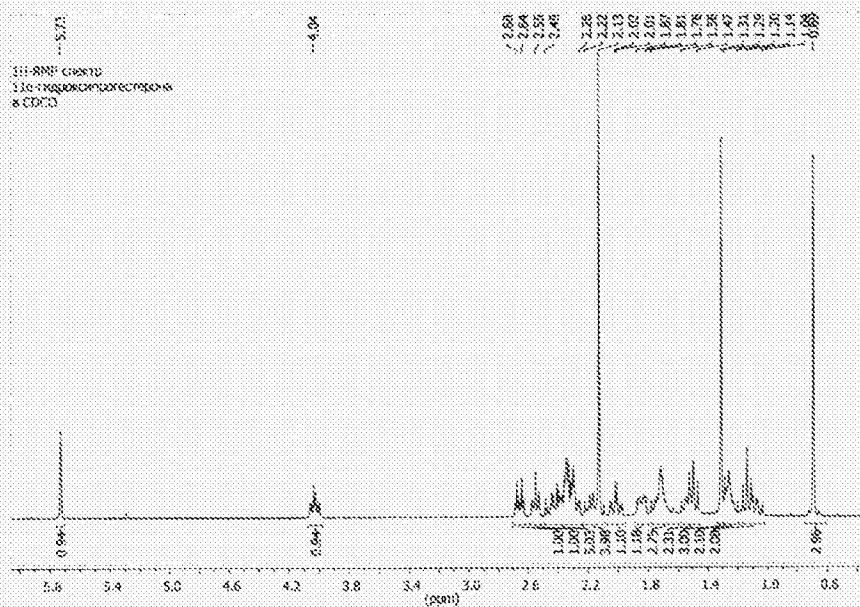
Фиг. 1

1

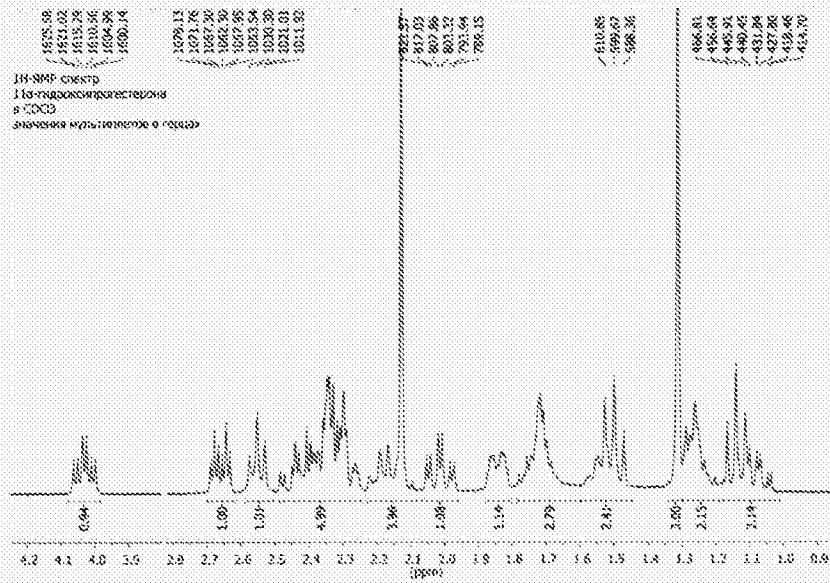
2



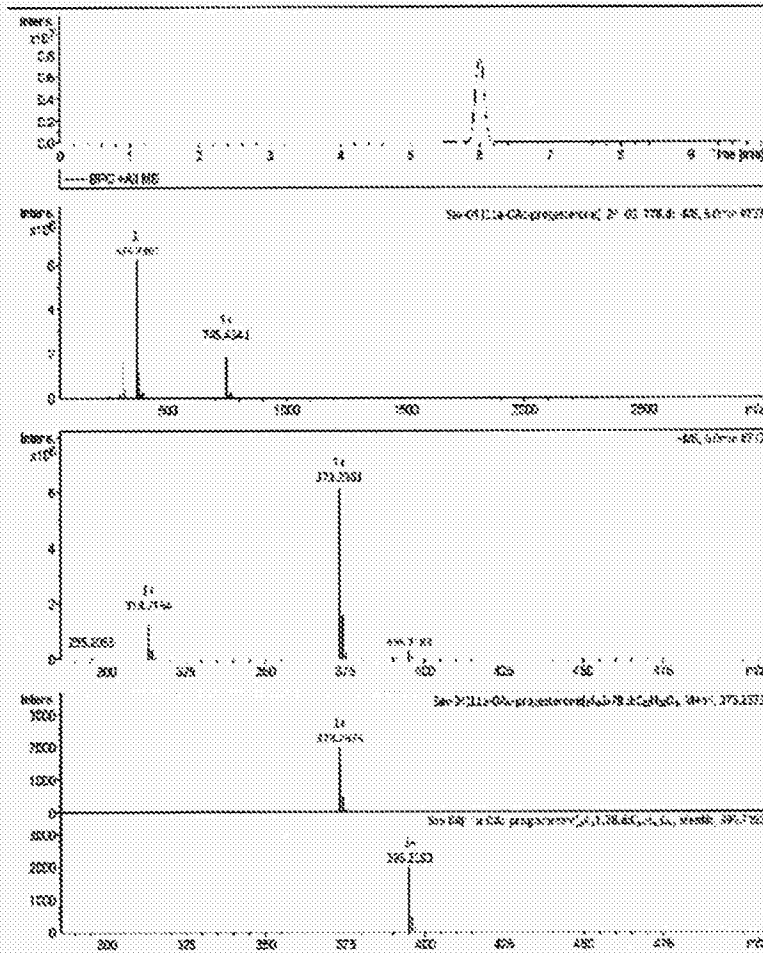
Фиг. 2



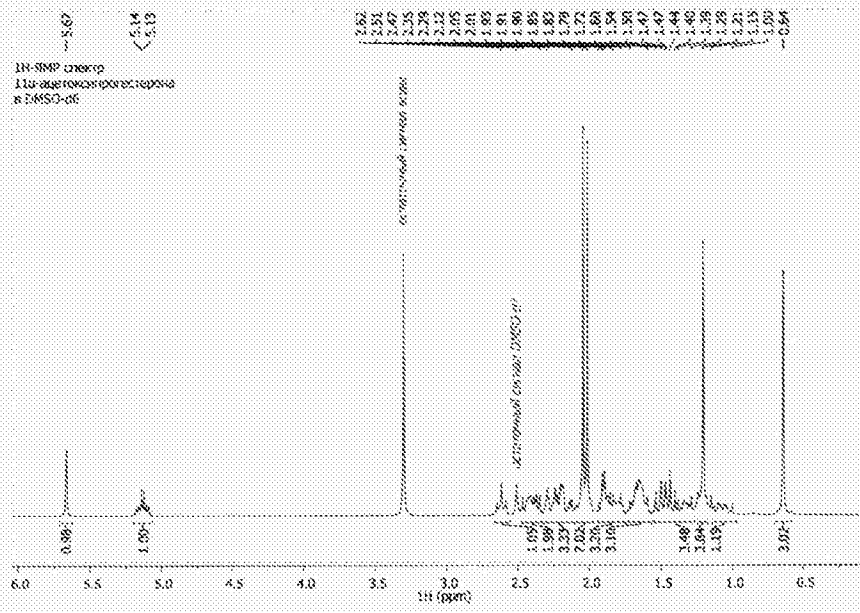
Фиг. 3



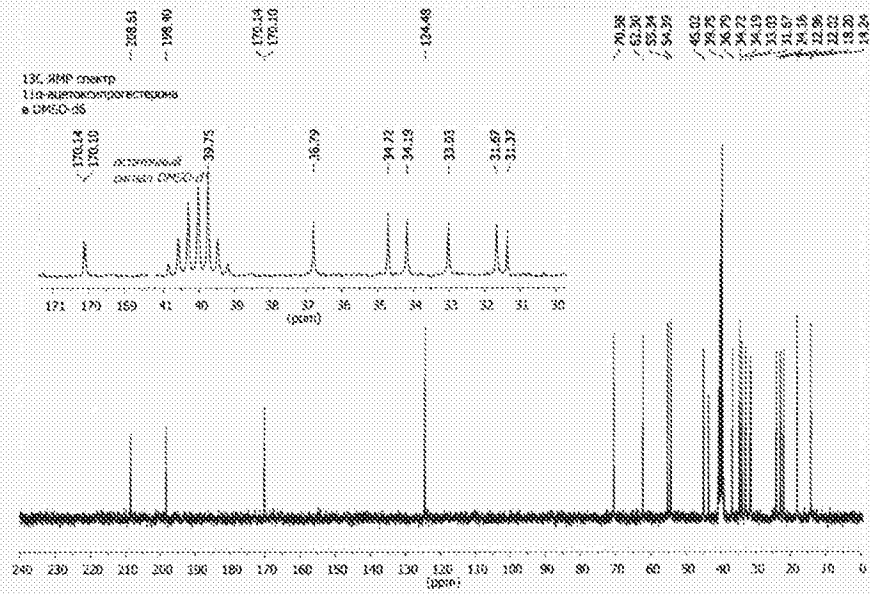
Фиг. 4



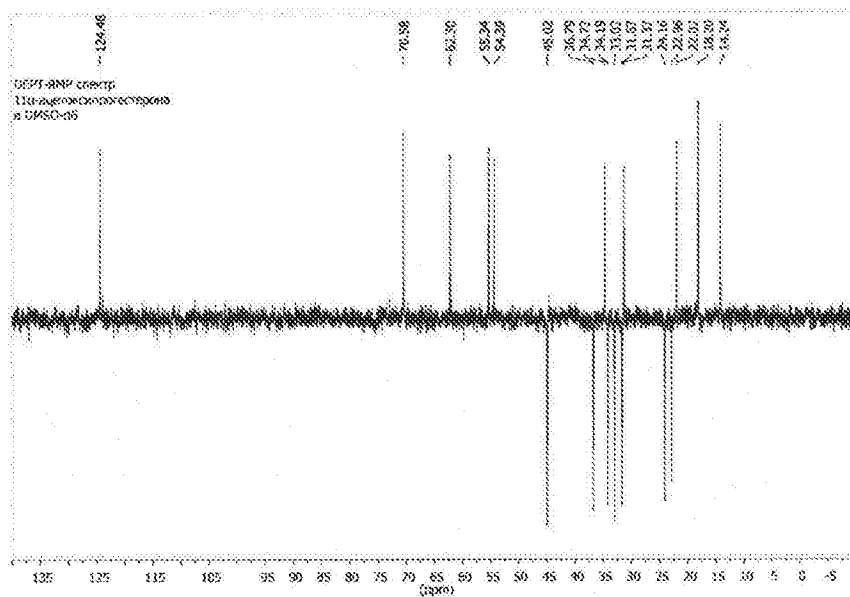
Фиг. 5



Фиг. 6

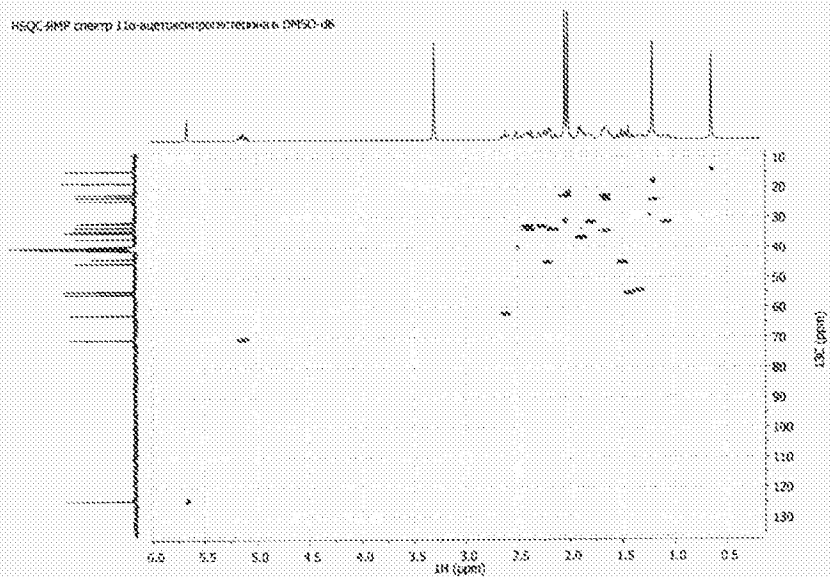


Фиг. 7

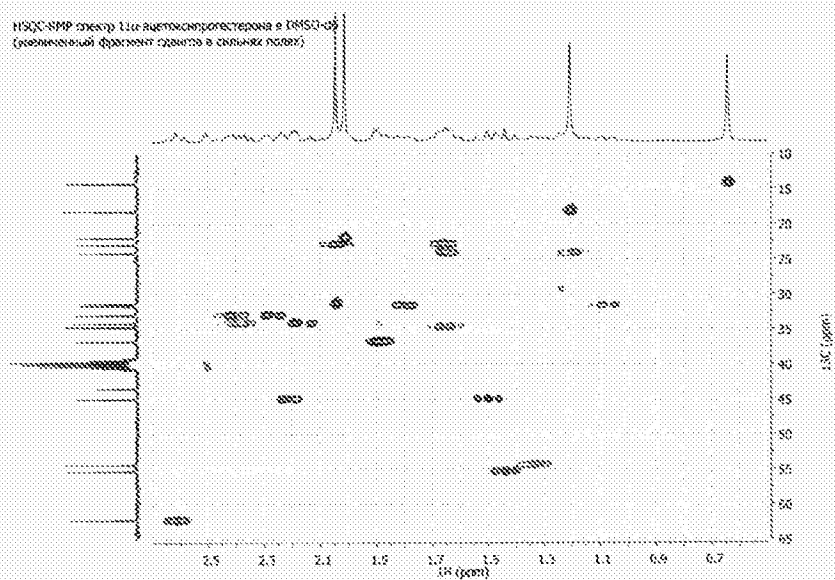


Фиг. 8

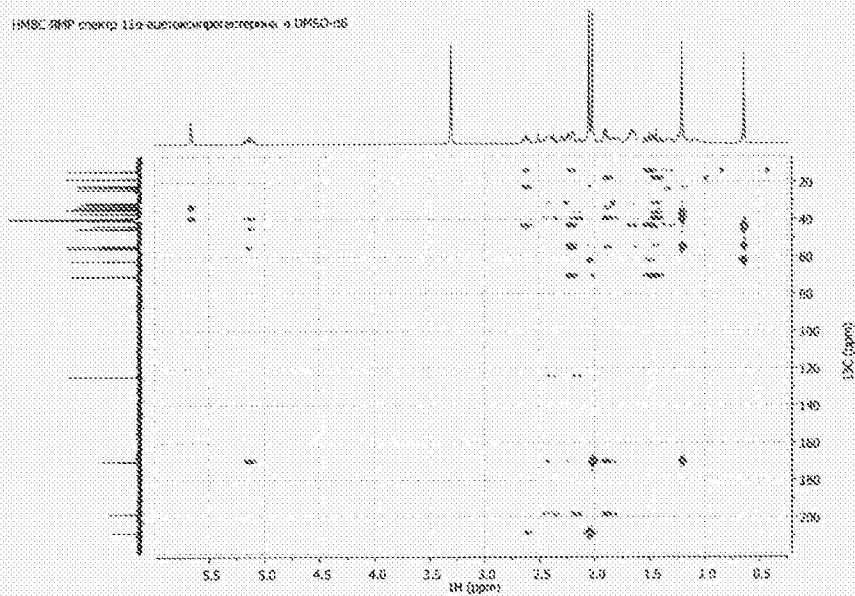
96



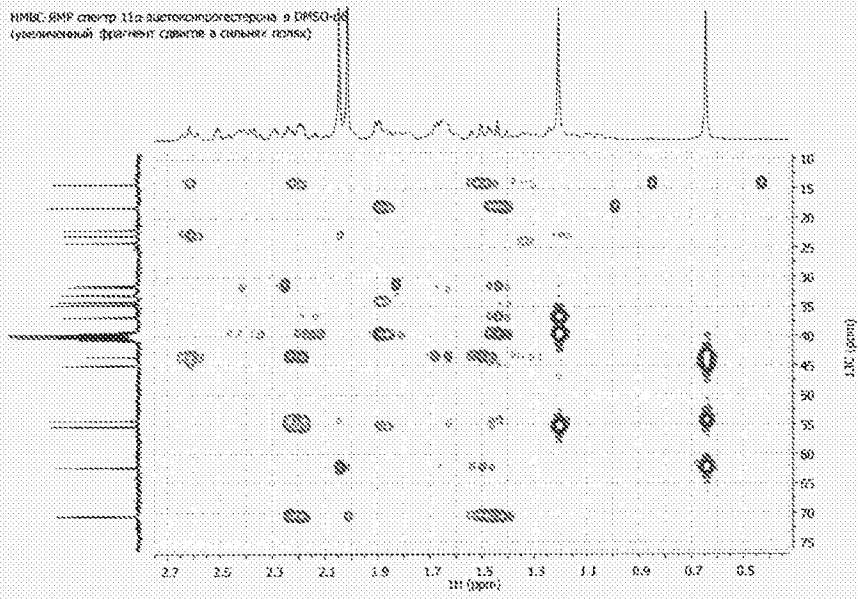
Фиг. 9



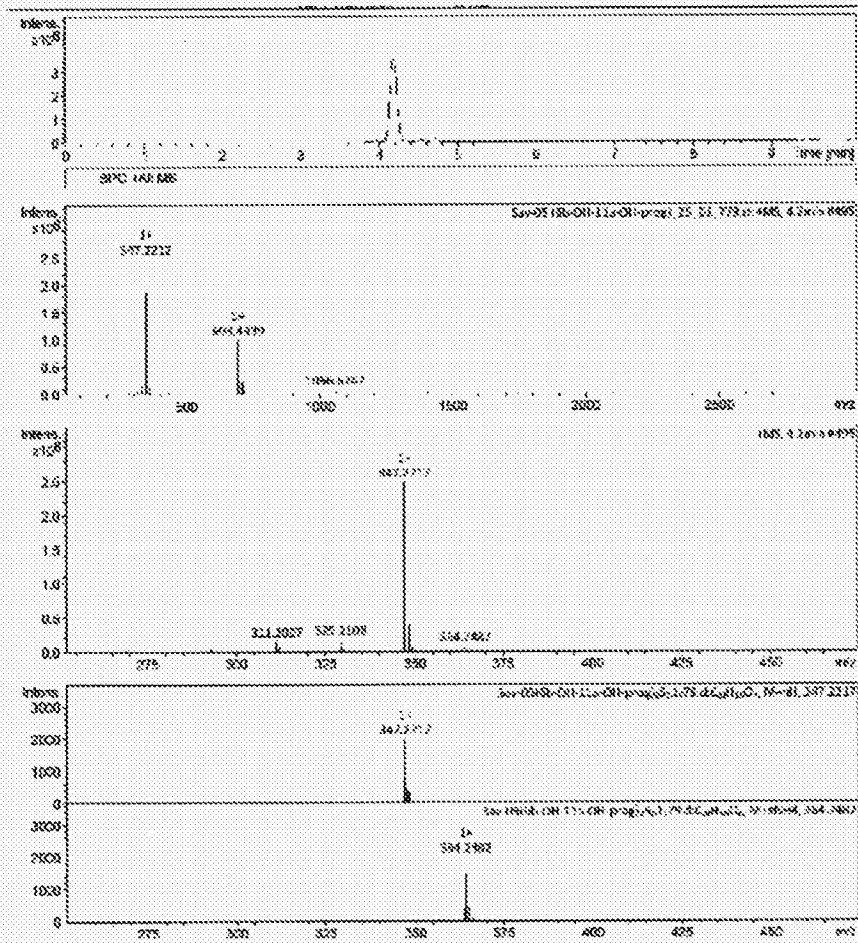
Фиг. 10



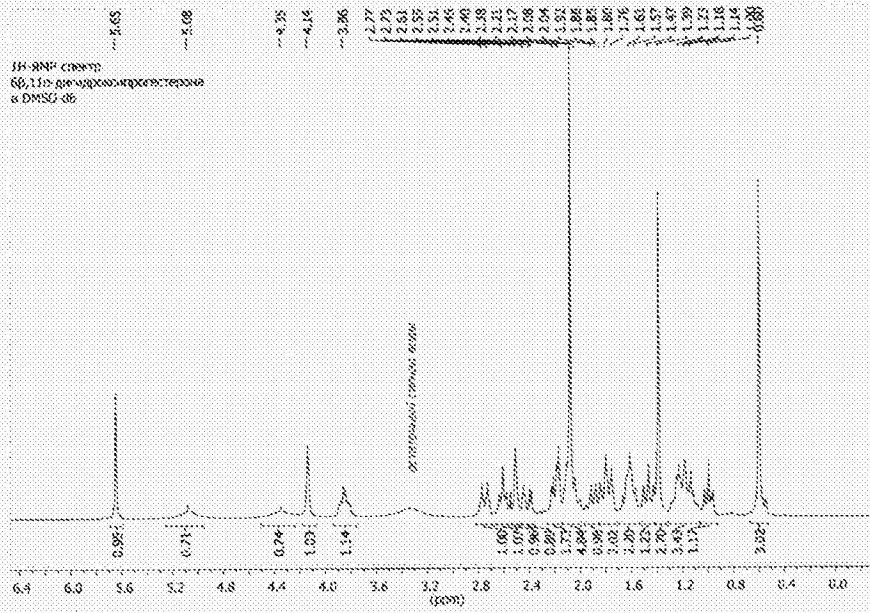
Фиг. 11



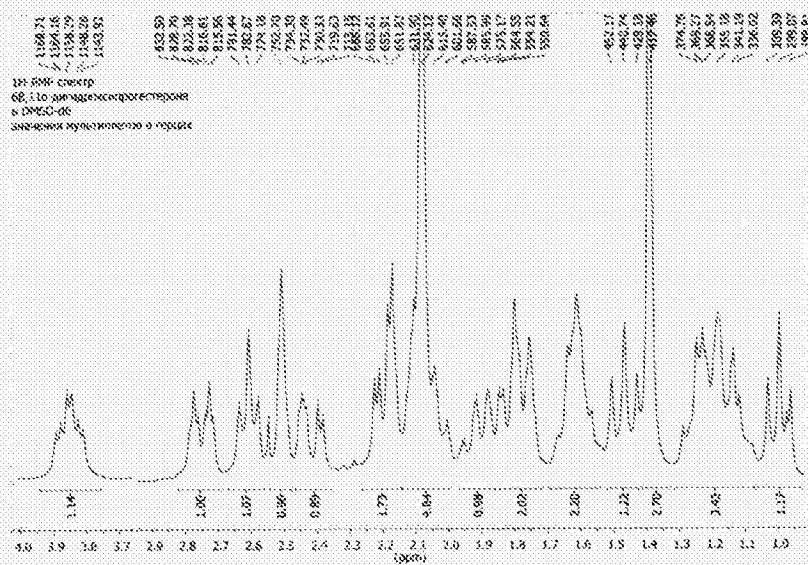
Фиг. 12



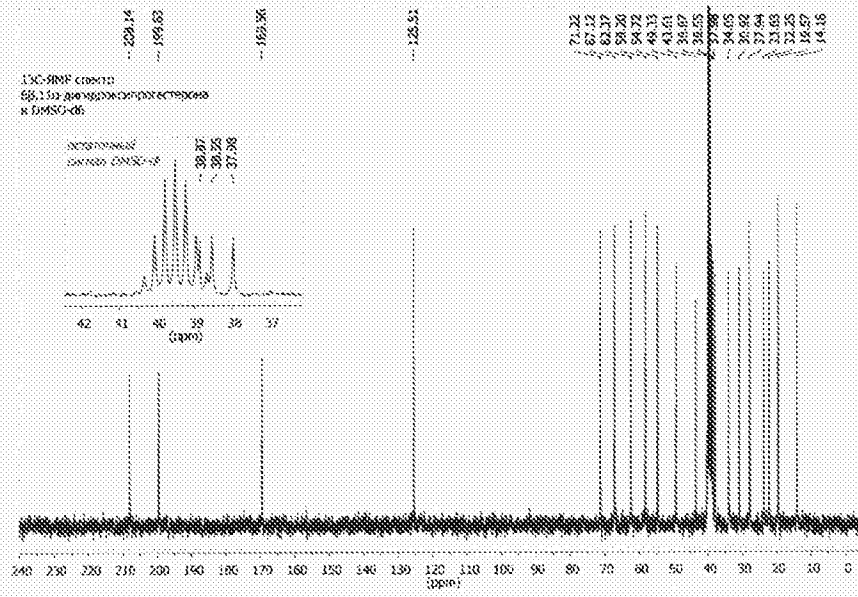
Фиг. 13



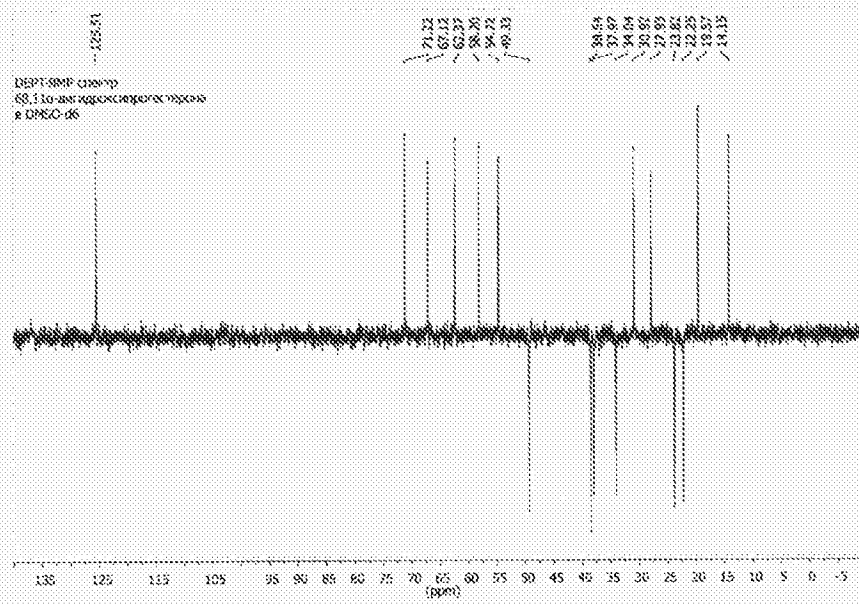
Фиг. 14



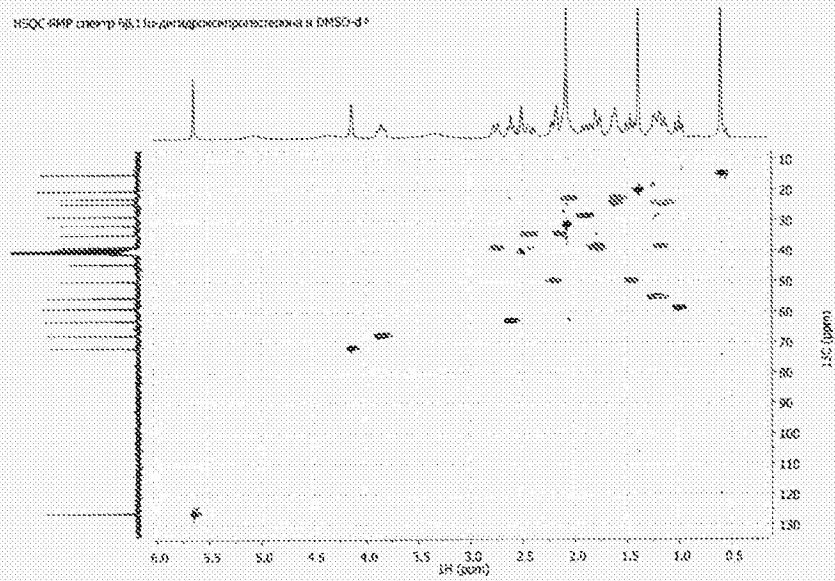
Фиг. 15



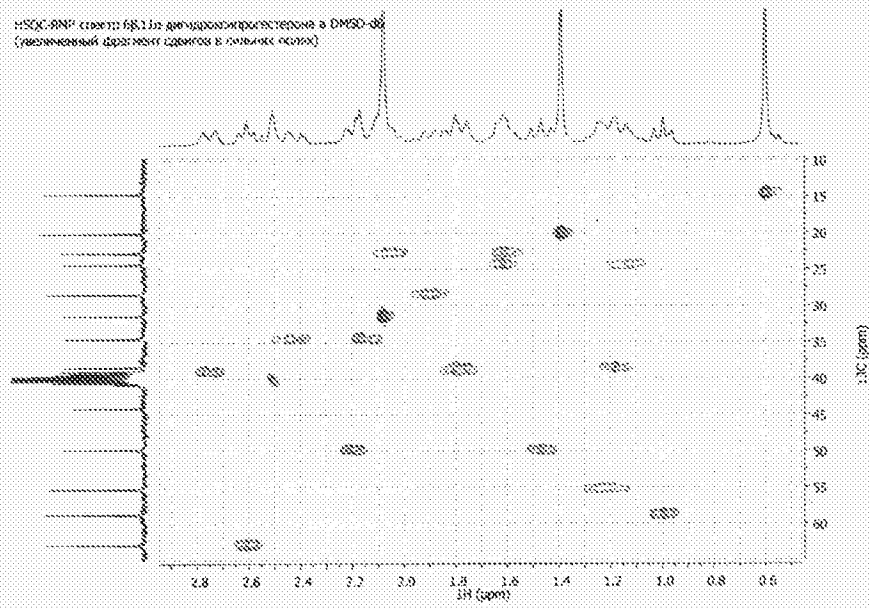
Фиг. 16



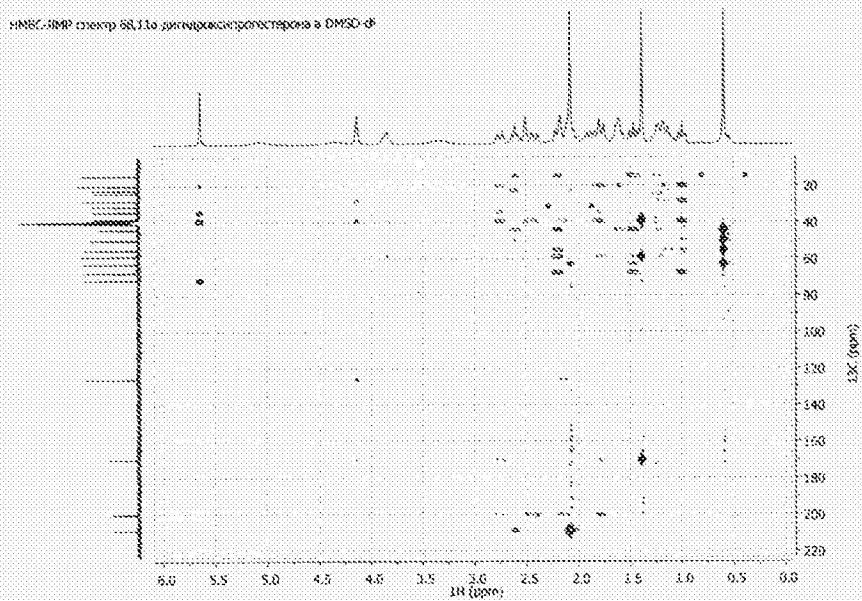
Фиг. 17



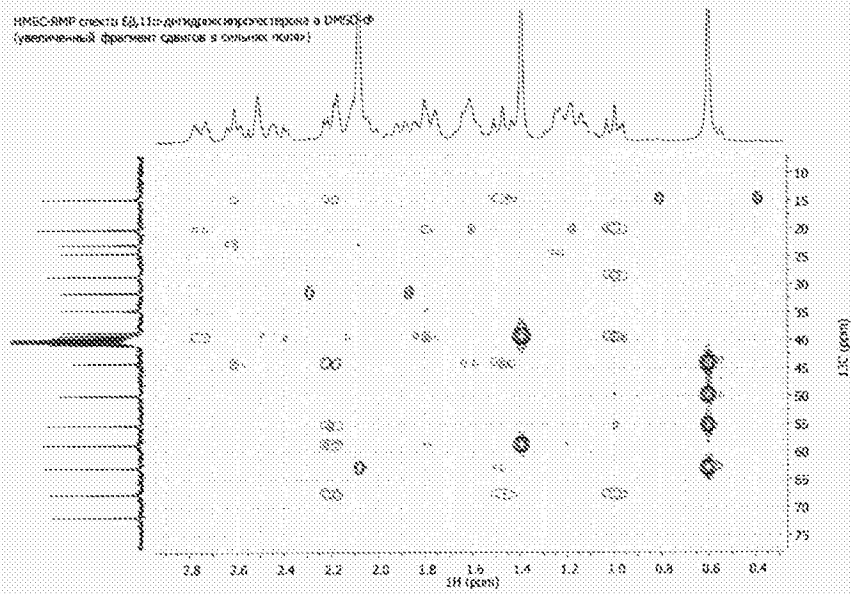
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21