

В. А. Андрияшина¹, Н. Е. Войшвилло¹, А. В. Дружинина¹, Т. С. Стыценко¹,
В. В. Ядерец¹, М. А. Петросян², О. А. Зейналов¹

14 α -ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ СТЕРОИДОВ МИЦЕЛИЕМ ПЛЕСНЕВОГО ГРИБА *CURVULARIA LUNATA* ВКПМ F-981 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БАЗОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДЛЯ СИНТЕЗА НОВЫХ СТЕРОИДНЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ

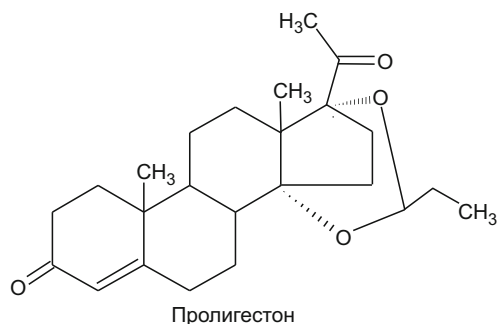
¹ Центр "Биоинженерия" РАН, Москва, Россия, e-mail: andryushina@rambler.ru;

² НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Россия

При помощи мицелия плесневого гриба *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 получены 5 14 α -гидроксипроизводных стероидов рядов андростана и прегнана. Определены условия трансформации андрост-4-ен-3,17-диона, позволяющие получать микробиологическим способом его 14 α -гидроксианалог с выходом до 60 % при нагрузке субстрата 6 г/л. Осуществлен синтез 21-ацетоксианалога пролигестона из 14 α -гидроксикортексолона, образующегося одновременно с гидрокортизоном при гидроксилировании кортексолона с помощью *C. lunata*. Полученные 14 α - и 14 α ,21-гидроксистероиды могут быть использованы как базовые соединения в синтезе новых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: 14 α -гидроксипроизводные стероидов; *C. lunata*, гидроксилирование.

14 α -Гидроксистероиды (14 α -ГС), получаемые рядом с 9-ГС, 11-ГС и 16-ГС преимущественно с помощью микроорганизмов, давно используются в качестве интермедиатов в синтезе многих лекарственных препаратов стероидной природы [1, 2]. Например, 14 α -гидроксипроизводные андростендиона (I) и кортексолона (II) служат базовыми соединениями для 2 альтернативных путей химического синтеза высокоактивного антигонадотропного препарата — пролигестона, широко используемого в ветеринарной практике в качестве контрацептивного и лечебного средства [3, 4]. Кроме контрацептивного и противовоспалительного действия, некоторые 14 α -ГС проявляют противоопухолевую активность [2, 5, 6]. 14 α -ГС являются в настоящее время доступными исходными структурами в синтезе новых физиологически активных соединений благодаря использованию на первой стадии их синтеза прямого микробиологического гидроксилирования в 14 α -положение, позволяющего значительно упростить сложный химический путь их получения. Более того, конфигурация 14 α -гидроксильной группы может быть обращена в 14 β -конфигурацию, которая является структурной особенностью кардиоактивных стероидов, что дает дополнительную возможность получения новых кардиотропных препаратов [2, 7].



Образование 14 α -ГС свойственно многим низшим грибам классов *Euascomycetes* и *Zygomycetes* [8]. В незначительном количестве образуют 14 α -ГС также не-

которые бактерии [9]. В зависимости от вида и даже штамма микроорганизма, от структуры стероидной молекулы и количества субстрата 14 α -ГС накапливаются в реакционной среде как основные моногидрокси- и дигидроксисоединения, либо как побочные продукты [1, 7, 8, 10 – 15]. В работах [13, 14] показана способность грибов *Curvularia lunata* и *Gongronella butleri* к трансформации таких 3,17-дикетостероидов, как I, 1,2-дегидро-I (III) и 9 α -гидрокси-I (IV), с образованием в качестве основных продуктов их 14 α -гидроксипроизводных.

Цель настоящей работы заключалась в определении условий получения представляющих интерес для медицины 14 α -гидроксипроизводных I – IV и 16 α -метил-II (16-CH₃-II) с помощью низшего гриба *Curvularia lunata* ВКПМ F-981 и в химическом синтезе 21-ацетоксианалога пролигестона из 14 α -гидрокси-II.

Экспериментальная химическая часть

Приборы и хроматография. Температуры плавления определяли на приборе "OptiMelt" MPA-100 (США). Спектры ПМР снимали на спектрометре XL-400 ("Varian" США), используя CDCl₃ как растворитель и CHCl₃ как внутренний стандарт. Для тонкослойной хроматографии использовали пластинки "Sorbfil" UV 254 (Россия).

Количественное содержание продуктов трансформации в реакционной жидкости определяли с помощью ВЭЖХ на колонке "Нуклеосил C₁₈" 250 × 4,0 мм. Качественный состав продуктов реакции анализировали в УФ-свете на приборе "Хроматоскоп" (Россия).

Используемые стероиды и циклодекстрины. Андрост-4-ен-3,17-дион (I, т. пл. 167 – 169 °С) и андроста-1,4-диен-3,17-дион (III, т. пл. 135 – 137 °С) получены из соевых стероидов с помощью бактерий *Mycobacterium neoaurum* ВКПМ Ас-1634 и *M. neoaurum* ВКПМ Ас-1656 соответственно, 9 α -андро-

стендион (IV, т. пл. 218 – 220 °С) — трансформацией I с помощью *Rhodococcus erythropolis* ВКПМ Ас-1740 [16]. CN-I получен по стандартной методике при взаимодействии I с синильной кислотой [17]. Прегн-4-ен-17 α ,21-диол-3,20-дион (II, 98 % чистоты, т. пл. 208 °С), метилированный по случайным (Randomly) положениям метилциклодекстрин (МЦД) и гидроксипропилциклодекстрин (ГПЦД) закуплены в КНР. 16-СН₃-II (т. пл. 186 – 189 °С) и его ацетат получены в лаборатории биотехнологии стероидов Центра “Биоинженерия” РАН.

Выделение продуктов трансформации. После завершения трансформации мицелий *C. lunata* отфильтровывали, промывали водой и проверяли с помощью ТСХ содержание в нем стероидов. При их наличии мицелий экстрагировали этилацетатом. Фильтрат (трансформационная среда) и промывную воду объединяли и экстрагировали этилацетатом до полного извлечения стероидов. Объединенный экстракт осветляли активированным углем и упаривали в роторном испарителе. Полученный остаток сушили до постоянной массы и анализировали с помощью ТСХ. Для получения индивидуальных соединений использовали метод кристаллизации в органическом растворителе (метаноле). Многокомпонентные смеси разделяли препаративной хроматографией на стеклянных пластинках Merck Kieselgel 40 F₂₅₄ или на колонке с SiO₂ 40 – 100 мк.

Выход выделенных целевых продуктов рассчитывали по формуле $Q = 100P/(S(M_p/M_s))$, где P — масса выделенного кристаллического продукта, S — количество взятого в реакцию субстрата, M_p — молекулярная масса продукта, M_s — молекулярная масса субстрата.

Выделение продуктов гидроксирования II при нагрузке 20 г/л. С помощью ТСХ устанавливали отсутствие на мицелии продуктов 48 ч трансформации 14 г II (13,3 г в 100 % исчислении). Водную фазу после отделения мицелия экстрагировали трижды этилацетатом. После упаривания получали сухой остаток в количестве 12 г, который обрабатывали при перемешивании 60 мл гексана. Гексан отделяли, остаток растворяли в 120 мл смеси СНCl₃:МеОН (7,5:1). К этому раствору по каплям при перемешивании добавляли 800 мл воды. Полученный осадок промывали небольшим количеством СНCl₃ и сушили при 60 °С. Выделено 7,84 г (55 % теор.) гидрокортизона (11 β -ОН-II), и 3,1 г 14 α -гидрокси-II (14-ОН-II) (21,5 % теор.), т. пл. 228 – 230 °С (лит. 230 – 231 °С [8]), идентичных по ИК- и ПМР-спектрам стандартным образцам.

14 α -ОН-16-СН₃-II. Фосфатный буфер в количестве 1,35 л, содержащий 4 г микрокристаллического 21-ацетата-16-СН₃-II и мицелий *C. lunata*, распределяли в 19 качалочных колб и инкубировали в условиях, указанных в биологической части. Через 25 ч инкубации реакционную жидкость экстрагировали этилацетатом. После упаривания экстракта получили 3 г кристаллизующегося масла, содержащего по данным ВЭЖХ 40 % 16 α -метилгидрокортизона, 13 % 14 α -ОН-16-СН₃-II и 20 % неидентифицированного продукта. Масло растворяли в 5 мл эфира и отделяли

кристаллический осадок 16 α -метилгидрокортизона в количестве 1,2 г. Из маточного раствора препаративной хроматографией на SiO₂ выделяли 14 α -ОН-16-СН₃-II. ПМР-спектр (CDCl₃), δ , м.д.: 0,75 (с, 3H, 18-СН₃), 1,15 (с, 3H, 16-СН₃), 1,18 (с, 3H, 19-СН₃), 2,97 (м, 1H, 16H), 3,7 (м, 1H, 14 α -ОН), 4,28 и 4,6 (д, 2H, 21-СН₂), 5,73 (д, 1H, 4-H).

21-Ацетат 14 α ,17 α -пропилидендиоксипрегн-4-ен-21-ол-3,20-диона. К смеси 1,7 г 21-ацетата 14-ОН-II и 1,1 мл пропаналя прибавляли 3,5 мл уксусной кислоты, содержащей 0,1 мл 30 % H₂SO₄, и оставляли на 1 ч при комнатной температуре. После окончания реакции, определяемого с помощью ТСХ, к реакционной смеси приливали 5 мл воды и 0,03 мл 15 % NaOH и перемешивали в течение 0,5 ч. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой до нейтральной реакции и сушили при 50 – 60 °С до постоянной массы. Получено 1,6 г кристаллического вещества. После очистки его из метанола получено 1,1 г 21-ацетата 14 α ,17 α -пропилидендиоксипрегн-4-ен-21-ол-3,20-диона. Выход 55 % (теор.). Т. пл. 148 – 150 °С. ПМР-спектр (CDCl₃), δ , м.д.: 0,841 (с, 3H, 18-H), 0,925 (тр, 3H, СH₃-СH₂), 1,144 (с, 3H, 19H), 1,65 (кв, 2H, СH₃-СH₂), 2,13 (с, 3H, ОAc), 4,878 (кв, 2H, СH₂-ОAc), 5,697 (с, 1H, 4H), 4,863 (тр, 1H, H).

Экспериментальная биологическая часть

Культивирование, трансформация. Штаммы плесневых грибов рода *Curvularia*, *Helicostylum* и *Mortierella* хранили на агаровой среде при 4 °С, штаммы рода *Cunninghamella* — при комнатной температуре. Штамм *C. lunata* культивировали в жидкой среде аналогично [15], остальные грибы — в среде следующего состава (г/л): глюкоза — 20,0, пептон — 5,0, дрожжевой экстракт — 5,0, соевая мука — 10,0, рН 6,0 – 6,3. Среды для культивирования разливали по 100 мл, для трансформации — по 70 мл. Культивирование и трансформацию осуществляли в конических колбах вместимостью 750 мл при температуре 28 °С и перемешивании 220 об/мин. Культивирование 1-й генерации грибов в жидкой среде осуществляли 3 сут. Полученную биомассу использовали в качестве посевного материала, который вносили в свежую среду того же состава. Трансформацию стероидов грибами родов *Helicostylum*, *Mortierella* и *Cunninghamella* осуществляли с помощью растущих клеток. С этой целью через 16 – 18 ч роста вносили стероидный субстрат в виде раствора в метаноле (2 об. %) в количестве 0,5 – 1,0 г/л.

Для трансформации стероидов с помощью *C. lunata* мицелий в возрасте 22 – 24 ч отделяли от ростовой среды. Влажную биомассу в необходимом количестве суспендировали в 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,0 – 6,2), содержащем стероид в виде микрокристаллов, либо в виде раствора с МЦД или ГПЦД. Для определения веса биомассы, используемой для трансформации, соответствующее количество мицелия сушили до постоянной массы.

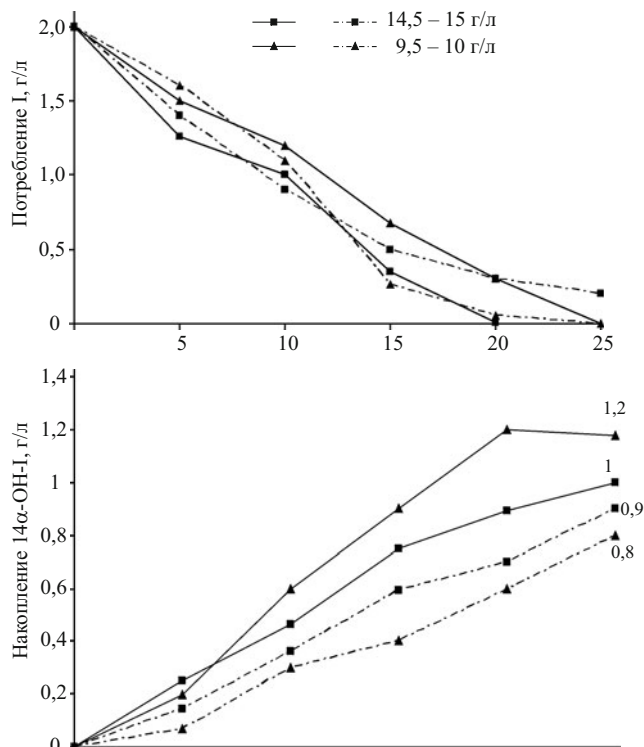


Рис. 1. Потребление I и накопление 14α-OH-I в зависимости от возраста и количества мицелия (сплошная линия — мицелий 24 ч, пунктирная линия — мицелий 48 ч).

Сравнение контрацептивной активности пролигестона и его 21-ацетоксианалога. Исследование контрацептивной активности (КА) пролигестона и его 21-ацетоксианалога выполнено в НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН (НИИАГ) по ранее разработанной в лаборатории фармакологии этого института методике. Указанные соединения исследовали в комбинации с этинилэстрадиолом в соотношении 1:20. Количество гестагенного и эстрогенного компонента соответствовало ранее определенному оптимальному количеству для производных 17α-гидроксипрогестерона с целью получения стойкого контрацептивного эффекта [18]. Опыты осуществляли на половозрелых белых крысах-самках линии “Вистар” массой 200 – 250 и 180 – 200 г. Животные получены из

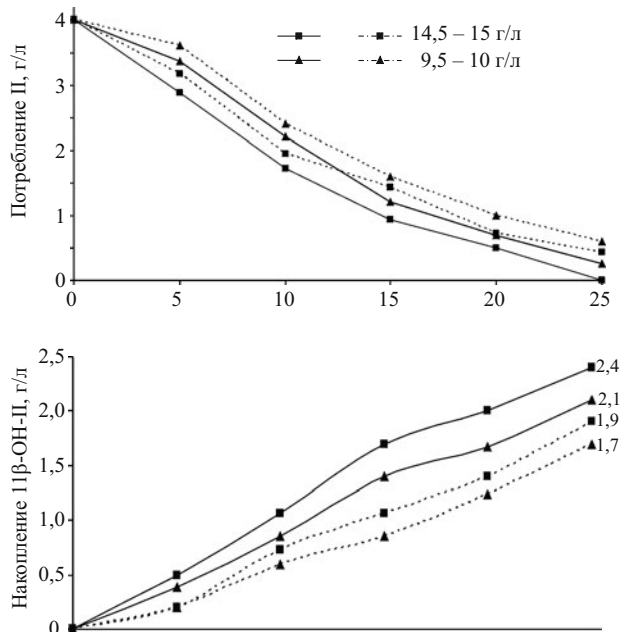


Рис. 2. Потребление II и накопление 11β-OH-II в зависимости от возраста и количества мицелия (сплошная линия — мицелий 24 ч, пунктирная линия — 48 ч).

питомника “Рапполово” и содержались в регламентированных условиях вивария НИИАГ.

Пролигестон и его 21-ацетоксианалог в разных комбинациях вводили в виде масляного раствора (растворитель — растительное масло) в желудок (перорально) в объеме 0,3 мл с использованием зонда в течение 14 дней. Доза этинилэстрадиола и гестагена во всех исследованиях была одинаковой и составила 0,04 и 0,8 мг/кг соответственно. Животные контрольной группы получали растительное масло в том же объеме и в те же сроки, что и животные подопытных групп. КА определяли по формуле:

$$КА(\%) = \frac{БК_0 \cdot ПК_к}{1 - БК_к \cdot ПК_0} \cdot 100,$$

где БК₀ и БК_к — число беременных крыс в опыте и контроле соответственно; ПК₀ и ПК_к — число покрытых крыс в опыте и контроле соответственно.

Таблица 1

Гидроксилирование I (2 г/л) и II (4 г/л) плесневыми грибами

Культура	Трансформируемые субстраты			
	I		II	
	Гидроксипродукты			
	основной	побочный	основной	побочный
<i>Curvularia lunata</i> ВКПМ F-981	14α-OH-I	11β-OH-II	11β-OH-II	14α-OH-II
<i>Cunninghamella blakesleeana</i> ВКМ F-993	н/идент.*		11α-OH-II	11β-OH-II
<i>Cunninghamella echinulata</i> ВКМ F-1059	н/идент.		11α-OH-II	11β-OH-II
<i>Helicostylum piriforme</i> ВКМ F-1068	н/идент.		н/идент.	
<i>Mortierella isabellina</i> ВКМ F-1626	н/идент.		11α-OH-II	11β-OH-II

* н/идент. — смесь неидентифицированных продуктов.

Выход 14 α -гидроксипроизводных I – IV, 21-Ас- II, 16-СН₃-II и Ас-16-СН₃-II, полученных с помощью *C. lunata* ВКПМ F-981

Стероид	Нагрузка, г/л	Способ внесения	Биомасса/стероид	Время, ч	Выход 14 α -, %	Отношение 11 β -/14 α -
I	2,0	М/кр	5/1	20	58	1*/4
	3,0	М/кр	3/1	40	42	-
	4,0	М/кр	2,5/1	40	25	-
		МЦД	2,5/1	30	62	1*/6
	6,0	МЦД	2,5/1	40	58	1*/6
II	4,0	М/кр	3,5/1	25	10 – 15	4/1
	10	М/кр	1,4/1	46	20	2/1,5**
		МЦД	1,4/1	30	21	3/1
	20	МЦД	1/1	48	20 – 21	2,5/1
21-Ас-II	10	МЦД	1,5/1	46	21	2,6/1
16 α -СН ₃ -II	2,0	М/кр	7,5/1	24	13	3/1
	10	МЦД	1,5/1	48	15	3/1
21-Ас-16 α -СН ₃ -II	3,0	М/кр	2,5/1	25	13	4/1
III	1,0	М/кр	10/1	24	70	-
	3,0	ГПЦД	3/1	22	69	-
IV	0,5	М/кр	20/1	20	75 – 80	-
	2,0	М/кр	5/1	40	70	-
		ГПЦД	5/1	24	50	-

Примечание: М/кр — стероид внесен в виде микрокристаллов, МЦД или ГПЦД — стероид внесен в виде комплекса с циклодекстрином. (-) — отсутствие 11 β -гидроксипроизводных; * — 11 β -гидрокси-V; ** — смесь 14-ОН-II и 11 β ,14 α -дигидрокси-II.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведены данные гидроксилазной активности по отношению к I и II штамма *C. lunata* ВКПМ F-981, используемого ранее для трансформации Δ^5 -3 β -гидрокси- и Δ^4 -3-кето-стероидов [15], и грибов из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) *Cunninghamella blakesleeana*, *Cunninghamella echinulata*, *Helicostylum piriforme* и *Mortierella isabellina*. Грибы этих видов, согласно [1, 7, 8, 10 – 15], способны к образованию 11 α /11 β - и/или 14 α -ГС.

Максимальную 14 α -гидроксилазную активность по отношению к I проявил штамм *C. lunata* ВКПМ F-981, а в случае трансформации II он накапливал до 20 % 14 α -ОН-II (наряду с 11 β -гидрокси-II). Культуры *C. blakesleeana* ВКМ F-993 и *C. echinulata* ВКМ F-1059 превращали I в смесь гидроксипродуктов, содержащую незначительное количество 14 α -гидрокси-I (14-ОН-I), а трансформация ими II протекала с образованием 11 β -ОН-II только как побочного продукта. В работе [19] сообщалось, что культура *C. blakesleeana* NCIM 687 способна превращать прогестерон в 11 β ,14 α -дигидроксигестерон с выходом 46 %.

Трансформация I и II с помощью *H. piriforme* ВКМ F-1068 заканчивалась накоплением сложной смеси неидентифицированных продуктов, тогда как в работе

[7] трансформация I с помощью *H. piriforme* ATCC 8992 проходила с образованием 14-ОН-I, хотя и с низким выходом. Однако трансформация прогестерона этим грибом заканчивалась 85 % выходом 14 α -гидроксипрогестерона. Показано [20], что иммобилизованный мицелий *M. isabellina* ATCC 42613 способен к образованию 14 α -гидроксипродуктов из дезоксикортикостерона и прогестерона с выходом до 70 %, но штамм *M. isabellina* ВКМ F-1626 проявил по отношению к II лишь слабую 11 α /11 β -гидроксилазную активность.

Полученные результаты подтверждают исключительность грибов рода *Curvularia*, которые вводят в стероидную молекулу в зависимости от ее структуры преимущественно 11 β - либо 14 α -гидрокси группу (см. схему). Следует отметить, что образование в качестве основных продуктов трансформации 11 β - и 14 α -гидроксистероидов ряда андростана и прегнана характерно еще для 10 видов рода *Curvularia*, и в зависимости от вида и штамма, основные реакции сопровождаются образованием 6 β -, или 7 α -, 7 β -, 11 α - и 20 β -гидроксисоединений [1, 8 – 15, 21]. Исключение составляет штамм *C. lunata* (TSY-0721), который вместо 11 β -гидроксилирования осуществлял дегидрирование I в III, восстанавливал 17-кетогруппу, образуя тестостерон

Таблица 3

Контрацептивная активность пролигестона (0,8 мг/кг) в комбинации с этинилэстрадиолом (0,04 мг/кг)

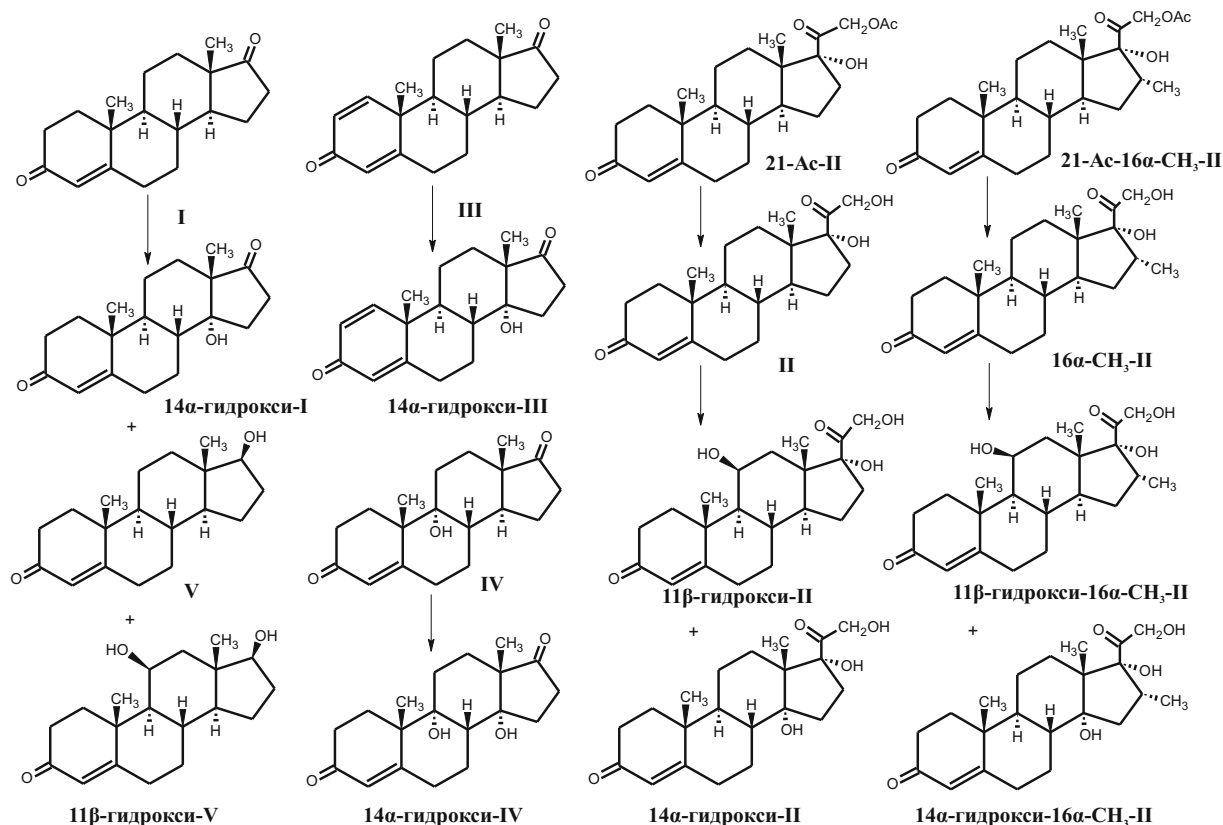
Группа животных	Количество крыс в группе				КА, %
	всего	покрытых	беременных	небеременных	
Контрольная	15	14	14	0	0
Подопытная	17	11	0	11	100

Таблица 4

Контрацептивная активность ацетата 14,17-пропилендиоксипрегн-4-ен-21-ол-3,20-диона (0,8 мг/кг) в комбинации с этинилэстрадиолом (0,04 мг/кг)

Группа животных	Количество крыс в группе				КА, %
	всего	покрытых	беременных	небеременных	
Контрольная	15	12	12	0	0
Подопытная	11	7	0	7	100

Схема. Трансформация стероидов I,II,III,IV,21-Ас-II,21-Ас-16 α -СН₃-II мицелием *S. lunata* ВКПМ F-981.



(V) и вводил в указанные соединения гидроксигруппу в 11 α -положение [22].

Дальнейшее исследование условий гидроксилирования I и II мицелием *S. lunata* F-981 показало, что существенными факторами, влияющими на выход и соотношение 11 β -/14 α -гидроксипродуктов, являются возраст мицелия, плотность используемой биомассы (рис. 1, 2), а также структура трансформируемого стероида, его количество и способ внесения в реакционную среду (табл. 2).

Состав сред для трансформации (фосфатный, либо цитратный буфер и присутствие в них 1 % глюкозы или сахарозы) не влиял на направление гидроксилирования и соотношение 11 β - и 14 α -гидроксипроизводных.

При трансформации 3,17-дикетоандростанов (I, III, IV) основными продуктами были соответствующие 14 α -гидроксистероиды (схема), причем в случае трансформации I при нагрузках 2 – 6 г/л — с примесью V и его 11 β -гидроксианалога (11 β -гидрокси-V). Последние наблюдались при избыточной биомассе и, как следствие, недостаточной аэрации. Трансформация 0,5 – 3,0 г/л III и IV в аналогичных условиях протекала без образования 11 β -гидроксипроизводных (табл. 2) и с примесью в незначительном количестве неидентифицированных побочных соединений.

Ранее в работе [15] было показано существенное преимущество МЦД как солюбилизатора гидрофобных стероидов в водной среде, в частности в процессах 7 α -, 14 α - и 11 β -гидроксилирования. Однако для промышленного применения предпочтителен менее дорогой ГПЦД, который дает возможность уменьшить

соотношение биомасса/стероид и увеличить скорость гидроксилирования (табл. 2).

Как следует из схемы и рис. 1, наиболее высокую гидроксилазную активность мицелий *S. lunata* проявил в возрасте 24 – 30 ч, т.е. в конце логарифмической фазы роста. Но его количество, необходимое для полной конверсии I и II, было различно. Полная конверсия I, внесенного в буфер в виде суспензии микрокристаллов, имела место при нагрузке стероида не более 2 г/л и мицелия в количестве 9,5 – 10 г/л (в пересчете на сухую биомассу) (табл. 2). Полная конверсия I при нагрузке 6 г/л происходила только в присутствии МЦД и увеличении количества мицелия до 15 г/л. Адсорбция продуктов гидроксилирования I на мицелии не позволила поднять его содержание в среде выше 6 г/л.

В отличие от I, трансформация II даже при нагрузке 10 – 20 г/л в комплексе с МЦД протекала с накоплением продуктов гидроксилирования в жидкой фазе в соотношении 11 β -ОН-II/14 α -ОН-II, равном 2,5 – 3/1. Такое же соотношение гидроксипродуктов наблюдалось при трансформации 2 – 10 г/л 16-СН₃-II. Однако вне зависимости от условий трансформации II, 16-СН₃-II и его ацетата, 14 α -гидроксилирование всегда происходило после появления 11 β -гидроксипроизводных и с меньшей скоростью. При низкой нагрузке трансформируемых прегнанов (1,0 г/л) 14-ОН-II и 14-ОН-16-СН₃-II не накапливались. Увеличение времени трансформации II, внесенного в среду в виде микрокристаллов, приводило к образованию 11 β ,14 α -дигидрокси-II.

Следует заметить, что при выборе приоритетного объекта для 14 α -гидроксилирования особый интерес представлял CN-I, поскольку метод построения прегнановой боковой цепи у данного соединения хорошо известен и легко осуществим [17]. Однако вместо 14 α -гидрокси-CN-I был получен 14-ОН-I с выходом не более 30 %, причем при концентрации субстрата не выше 0,5 г/л. По-видимому, ингибирующее влияние токсичной циангидринной группировки не способствовало образованию нужного продукта, к тому же сама эта группировка оказалась лабильной в условиях гидроксилирования.

Известно, что 14-ОН-I и 14-ОН-II (рассматриваемый при получении гидрокортизона как побочный продукт), служат альтернативными исходными соединениями в синтезе пролигестона (14 α ,17 α -пропилендиокси-прегн-4-ен-3,20-диона) — контрацептивного соединения, обладающего антигонадотропной активностью, слабой прогестагенной активностью и отличающегося отсутствием андрогенной активности [23]. При использовании 14-ОН-II в синтезе пролигестона авторы патента [6] предварительно осуществляли восстановительное удаление 21-гидроксигруппы. Нас интересовало наличие КА активности у 21-ацетоксианалога пролигестона при замене метильной группы на 21-гидроксигруппу, которая есть в кортикостероидах.

Результаты табл. 3 и 4 показывают, что полученное новое соединение — ацетат 14,17-пропилендиокси-II (ацетат 14 α ,17 α -пропилендиокси-прегн-4-ен-21-ол-3,20-диона), так же как и пролигестон в комбинации с этинилэстрадиолом, обладает 100 % контрацептивной активностью. Но, поскольку пролигестон по химическому строению относится к производным прогестерона, а его аналог пропилендиокси-II — к кортикостероидам, то не исключено, что последний будет также проявлять свойственную им физиологическую активность.

Таким образом, полученные результаты могут послужить основой для расширения спектра контрацептивных препаратов нового поколения, обладающих такими преимуществами как высокая пролонгированная активность и отсутствие побочных эффектов. Можно ожидать, что полученные нами 14 α - и 14 α ,21-гидроксистероиды или их химические модификации найдут достойное применение в медицине и ветеринарии.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. B. Mahato, S. Garai, *Steroids*, **62**, 332 – 345 (1997).
2. A. Shafiq, K. Henderson, G. Dumsday, M. Zachariou, *Australian Biotechnology*, **11**(2), 26 – 28 (2001).
3. V. Parez, D. Sulton, *J. Reproduction Fertil Suppl.*, **47**, 544 – 545 (1993).
4. M. Kutzler, A. Wood, *Theriogenology*, **66**, 514 – 525 (2006).
5. M. Yoshihama, K. Tamura, N. Miata, et al., *Novel androst-4-ene-3-dione derivatives and process their preparation*, Eur. Patent Appl. 0 300 062 A1 (1988).
6. P. M. Smid, W. J. Van Zoest, P. G. Weber, A. F. Marx, *14 α ,17 α -Dihydroxy-17 β -substituted steroids*. US Patent 5 093 502 (1992).
7. S-h. Hu, G. Genain, R. Azerad, *Steroids*, **60**, 337 – 352 (1995).
8. W. Charney, H. H. Herzog, *Microbial transformation of steroids*. Academic Press, New York & London (1967).
9. Schaaf, K. J. Dettner, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **67**, 451 – 456 (1998).
10. A. Capek, O. Hanc, M. Tadra, *Microbial transformation of steroids*, Akademia, Publishing House of the Czechoslovak Acad. Sci., Prague (1966).
11. А. А. Ахрем, Ю. А. Титов, *Стероиды и микроорганизмы*, Наука, Москва (1970).
12. L. L. Smith, *Terpenoids and Steroids*, **4**, Overton K. H., Acad. Press, New York (1975), pp. 394 – 530.
13. V. V. Kollerov, A. A. Shutov, V. V. Fokina, et al., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **55**, 61 – 68 (2008).
14. В. В. Колеров, А. А. Шутов, В. В. Фокина и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **46**(2), 212 – 220 (2010).
15. В. А. Андрияшина, А. В. Дружинина, В. В. Ядерец и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **47**(1), 50 – 57 (2011).
16. В. А. Андрияшина, Н. В. Родина, Т. С. Стыщенко и др., *Приклад. биохим. микробиол.*, **47**(1), 297 – 301 (2011).
17. В. А. Андрияшина, Т. С. Савинова, К. Г. Скрыбин, *Способ получения прегнанов*, Патент РФ 2156253, *Бюл. изобрет.*, № 26 (2000).
18. Г. С. Гриненко, В. А. Андрияшина, В. В. Корхов и др., *Контрацептивное средство для животных и способ контрацепции животных*, Патент РФ № 2048149, *Бюл. изобрет.*, № 32 (1995).
19. S. B. Chincholkar, R. S. Laxman, R. D. Wakharkar, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 367 – 358 (1995).
20. H. L. Holland, S. Poddar, B. Triplet, *J. Ind. Microbiol.*, **10**, 195 – 197 (1992).
21. S. B. Mahato, S. Banerjee, S. Podder, *Phytochemistry*, **28**, 7 – 40 (1989).
22. M. L. Choudhary, S. Sultan, M. T. H. Khan, et al., *Nat. Prod. Res.*, **18**(6), 519 – 535 (2004).
23. В. В. Ядерец, В. А. Андрияшина, Н. Е. Войшвилло и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(1), 37 – 40 (2009).

Поступила 07.12.11

14 α -HYDROXYLATION OF STEROIDS BY MYCELIUM OF MOLD FUNGUS *CURVULARIA LUNATA* (VKPM F-981) FOR OBTAINING PRECURSORS FOR THE SYNTHESIS OF NEW STEROIDAL DRUGS

V. A. Andryushina^{1*}, N. E. Voishvillo¹, A. V. Druzhinina¹, T. S. Stytsenko¹, V. V. Yaderets¹, M. A. Petrosyan², and O. A. Zeinalov¹,

¹ Bioengineering Centre, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia

² Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 199034 Russia

* e-mail: andryushina@biengi.ac.ru

Five 14 α -hydroxylated derivatives of androstane and pregnane steroids have been obtained using mycelium of the filamentous fungus *Curvularia lunata* (VKPM F-981), which is capable of simultaneously producing 11 β - and 14 α -hydroxylation of cortexolone. The best conditions for microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione, which allowed its 14 α -hydroxyderivative to be obtained with a yield of up to 60% at a substrate load of 6 g/L, were determined. The synthesis of 21-acetoxy analog of proligestone from 14 α -hydroxycortexolone (formed simultaneously with hydrocortisone during hydroxylation of cortexolone by *C. lunata*) was carried out. The resulting 14 α - and 14 α ,21-hydroxysteroids can be used as base compounds for the synthesis of new drugs.

Key words: 14 α -Hydroxylation of steroids; *Curvularia lunata*; hydroxylation