

УДК 547.92;542.98;579.61

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5α -Н-СТЕРОИДОВ*Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.В.*

Обобщены литературные данные об использовании микроорганизмов для гидроксилирования 5α -Н-стероидов 5α -Н-андростанового и 5α -Н-прегнанового рядов и 5α -Н-сапогенинов. Представлена систематизированная картина о влиянии замещения в стероидной молекуле на направленность гидроксилирования и активность микробных ферментов в рамках модели фермент-субстратного взаимодействия.

Библиография — 124 ссылки.

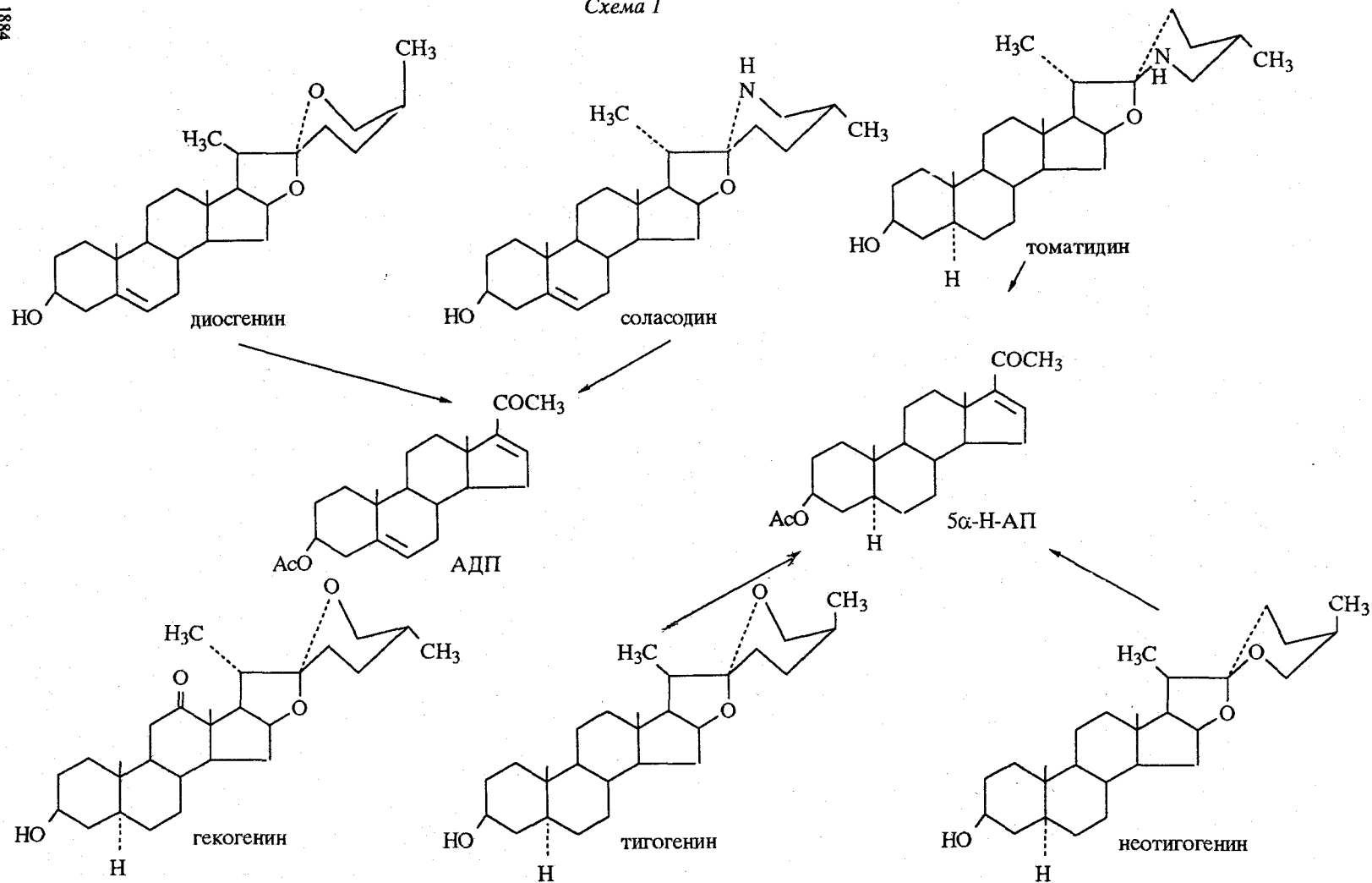
ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1883
II. Гидроксилирование 5α -Н-сапогенинов	1885
III. Гидроксилирование 5α -Н-андростанов	1888
IV. Трансформация галогензамещенных 5α -Н-андростанов	1911
V. Гидроксилирование 5α -Н-D-гомоандростанов	1913
VI. Гидроксилирование 5α -Н-прегнанов	1919

I. ВВЕДЕНИЕ

Промышленное производство кортикостероидов базируется в настоящее время в основном на диосгенине, соласодине и полупродукте их расщепления — 3β -ацетате 16-дегидропрегненолона (АДП). Расширение объема производства стероидов испытывает существенные трудности в связи с резким возрастанием цен на это сырье, закупаемое в странах с тропическим климатом. Единственным собственным промышленным источником стероидного сырья служит соласодин, потребность в котором в странах СНГ не удовлетворяется. В связи с этим в качестве перспективных альтернативных источников все чаще рассматриваются 5α -Н-стероиды — гекогенин, тигогенин, неотигогенин [1] и получаемый из них 3β -ацетокси- 5α -Н- Δ^{16} -прегнен-20-он (5α -Н-АП), которые пока не могут конкурировать с их Δ^5 -аналогами из-за насыщенности колец А и В, трудно трансформируемых химическими способами в практически полезные Δ^4 - и Δ^{14} -3-кетозамещенные стероидные препараты (схема1). К настоящему времени накопились данные о возможностях микробиологических методов эффективной трансформации (гидроксилирования и дегидрирования) 5α -Н-стероидов. Однако они никогда не систематизировались и поэтому недоступны для осознанного практического применения. Более того, большая их часть относится к 5α -Н-андростановому ряду, а значительно меньшая — к 5α -Н-прегнановому ряду, практическая значимость которого несоизмеримо выше. Тем не менее, при ближайшем рассмотрении оказывается, что между этими рядами существует близкая аналогия, позволяющая проводить сопоставление результатов и их априорное перенесение с андростанового на прегнановый ряд. Основной целью обзора является представление систематизированной картины, отражающей влияние заместителей в различных положениях стероидного ядра на процесс микробиологического гидроксилирования 5α -

Схема 1



Н-стероидов; за его рамками остается рассмотрение трансформаций кольца А 5 α -Н-стероидов с помощью микробиологического дегидрирования с последующим 9 α -гидроксигидрированием, осуществляемыми бактериями. В рамках этого обзора нам представляется также нецелесообразным привлечение к рассмотрению данных по трансформации 5 β -Н-стероидов, которые не только менее доступны, но и структурно несопоставимы. Так, известно, что пространственная изомерия при атоме С(5), контролирующая сочленение колец А и В, является одним из наиболее важных факторов, влияющих на взаимодействие стероидных субстратов со стероид-гидроксилазами [2]. Проиллюстрируем сказанное примерами андростерона и его 3 β -гидроксиизомера, гидроксилирующихся плесенью *Penicillium* sp. соответственно в 1 α - и 12 β -положения. Их А/В-*цис*-аналоги, независимо от конфигурации 3-оксигруппы гидроксилируются только в 7 β -положение [3]. Плесень *Aspergillus tamarii* гидроксилирует андростерон и его 3 β -гидроксиизомер в 11 β - и 11 α -положения, тогда как их А/В-*цис*-аналоги — в 7 β -положение [4]. Еще пример для соединений прегнанового ряда: 16 α , 17 α -эпокси-5 α -Н-прегнан-3-он трансформируется с помощью *Rhizopus nigricans* в 11 α -гидроксипроизводное (60%), а его 5 β -Н-изомер трансформируется, хотя и в том же направлении, но с большим трудом [5]. Критическое изменение стереохимии субстрата (А/В-*транс* на А/В-*цис*) безусловно влияет на пространственную структуру фермент-субстратного комплекса; этот фактор, как видно из сказанного выше, становясь определяющим, требует самостоятельного рассмотрения.

Исследования микробиологических превращений стероидов относятся в основном к соединениям с Δ^4 -3-кето- или Δ^5 -3 β -гидроксигруппировками и обобщены в работах [2,6—11]. При этом усилия многих исследователей были направлены на изучение механизма микробиологических трансформаций, специфичности действия микроорганизмов в зависимости от положения в системе классификации и от стереохимических особенностей стероидных субстратов. Изучение механизма гидроксилирования в отличие от дегидрирования осложняется высокой лабильностью стероид-гидроксилаз [12]. Остается невыясненным вопрос о том, почему одна и та же культура меняет направление гидроксилирования при смене стероидного субстрата. Не является ли это следствием функционирования в клетке различных ферментов? Не установлены окончательно причины микробиологического гидроксилирования стероидов. Согласно существующим гипотезам, микробиологическая трансформация стероидов в некоторых случаях вызвана необходимостью их детоксикации, в других случаях она происходит как этап ассимиляции стероидов в качестве источника углерода. Последнее подтверждается на примере бактериального гидроксилирования. Бактерии начинают расщепление стероидной молекулы с гидроксилирования в положении 9 α , 22 и 26. Однако нет данных о причинах свойственного стрептомицетам гидроксилирования в положение 16 α [6—11]. За исключением приведенных примеров гидроксилирования шизомицетами, в подавляющем большинстве случаев гидроксилирование стероидов выполнено с помощью представителей всех классов грибов в положения 1 α , 1 β , 2 α , 2 β , 3 β , 4 β , 5 β , 6 α , 6 β , 7 α , 7 β , 8 β , 9 α , 10 β , 11 α , 11 β , 12 α , 12 β , 14 α , 15 α , 15 β , 16 α , 16 β , 17 α , 18, 21 [6—11]. В данной работе, которая является первой попыткой систематизации и анализа разрозненных сведений о трансформации 5 α -Н-стероидов, включая результаты 1992 г., рассматриваются примеры гидроксилирования только грибными культурами. Все виды грибов, использованные для трансформации 5 α -Н-стероидов, представлены в табл. 1.

II. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5 α -Н-САПОГЕНИНОВ

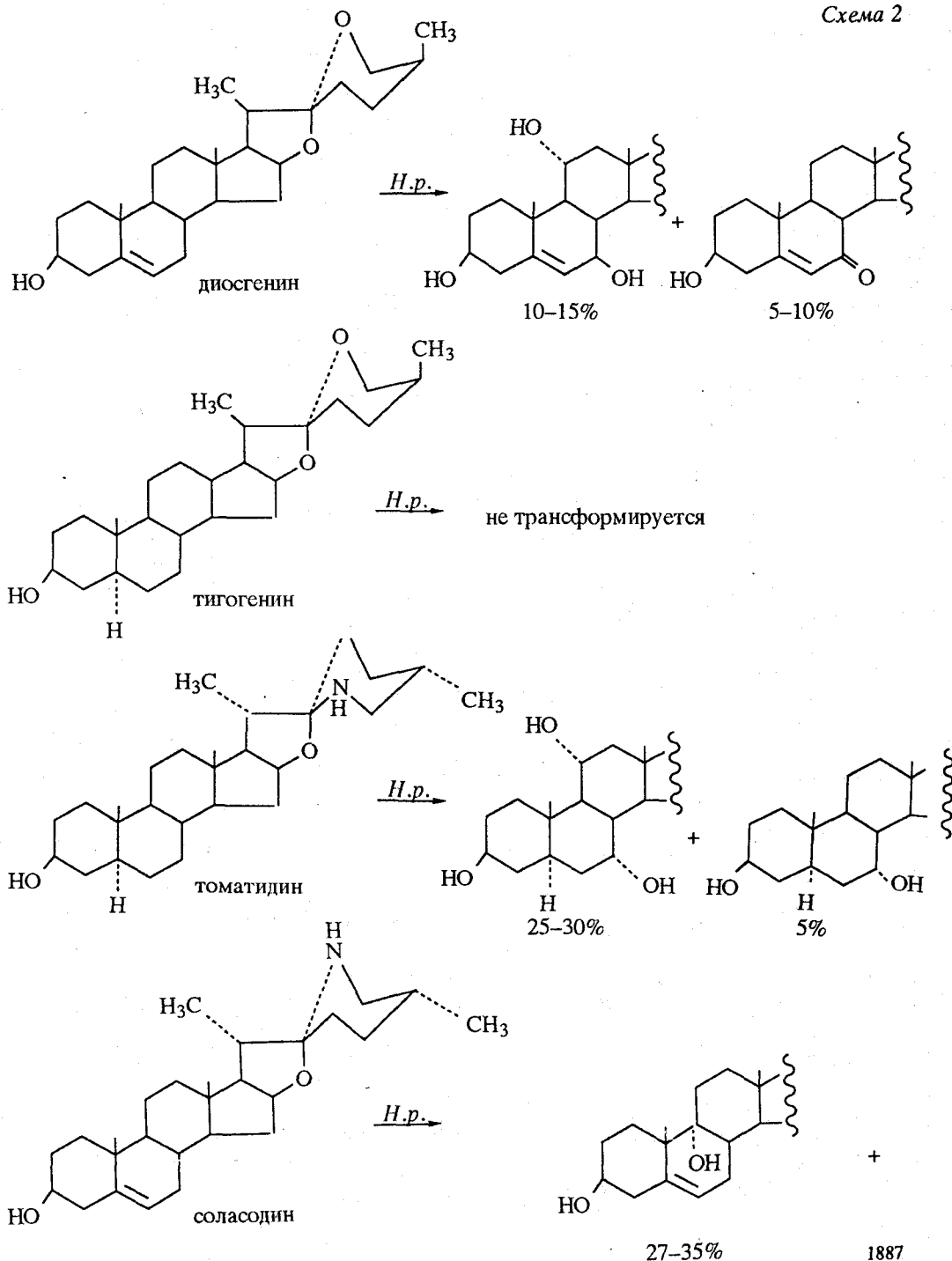
После открытия способности низших грибов гидроксилировать прогестерон [39] был предпринят ряд попыток получить микробиологическим способом гидроксилированные стероидные сапогенины, поскольку они рассматривались как перспективные исходные субстраты в синтезе стероидных гормонов (схема 1). Первые результаты осуществления подобных трансформаций были отрицательными, несмотря на то, что

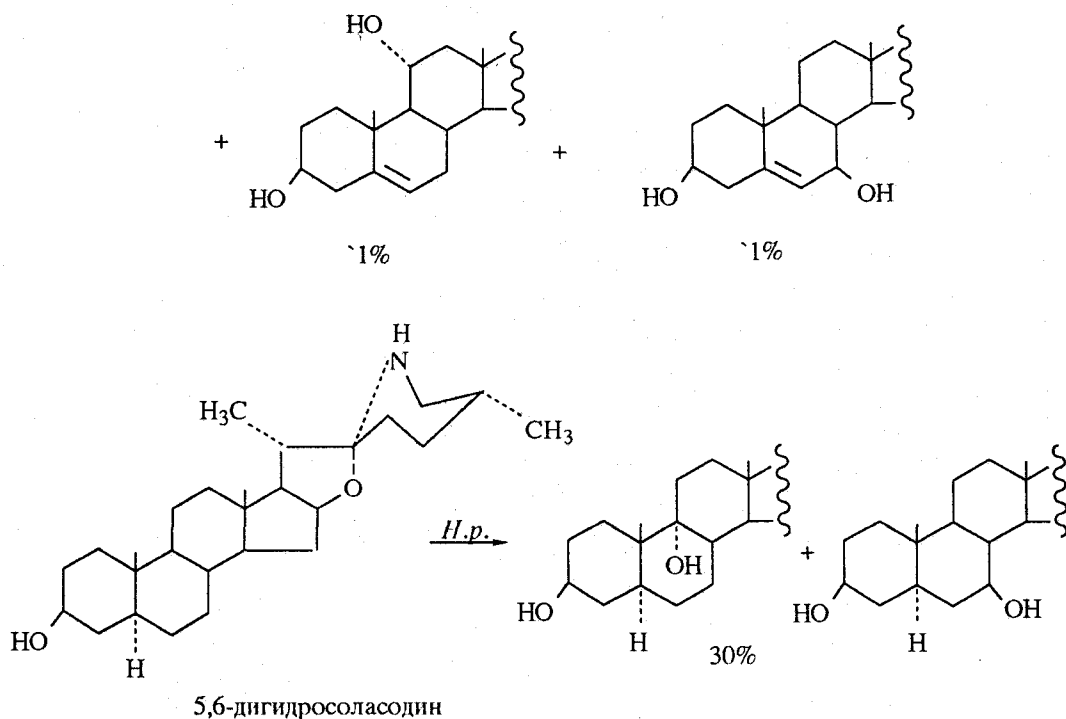
Таксономия грибов, гидроксилирующих 5 α -Н-стероиды

Класс	Род	Вид	Сокращенное обозначение	Ссылки
Ascomycetes	Calonectria	decora	C.d.	[13, 16, 19, 20, 29, 30, 34—36, 100—103]
	Diaporthe	celastrina	D.c.	[31]
	Didymella	vodakii	D.v.	[64]
	Glomerella	cingulata	Gl.c.	[58]
		fusaroides	Gl.f.	[58]
		lagenarium	Gl.l.	[58]
	Gymnoascus	reesii	G.r.	[97]
	Ophiobolus	herpotrichus	O.h.	[27]
	Corticium	praticola	C.pr.	[38]
	Daedalea	rufescens	D.r.	[28, 35]
Basidiomycetes	Hypholoma	sublateritium	H.s.	[99]
	Leptoporus	fissilis	L.f.	[37]
	Polystictus	sanguineus	P.s.	[38]
	Aspergillus	nidulans	A.n.	[38]
Deuteromycetes		ochraceus	A.o.	[17, 18, 21, 25, 26, 29, 34, 36, 38, 68, 80, 93, 98, 111]
		tamarai	A.t.	[4]
	Beauveria	sp.	B.sp.	[62]
	Chaetomella	oblonga	Ch.o.	[113]
		raphigera	Ch.r.	[113]
	Curvularia	clavata	C.cl.	[82, 87, 88, 117]
		lunata	C.l.	[59, 61, 65, 68, 105—107]
	Epicoccum	humicola	E.h.	[114]
		neglectum	E.n.	[114]
		oryzae	E.o.	[114]
		yuccae	E.u.	[114]
	Fusarium	graminearum	F.g.	[71]
		sulfureum	F.s.	[57]
	Gliocladium	roseum	G.r.	[116]
	Phoma	sp.	Ph.sp.	[60]
	Penicillium	sp.	P.sp.	[3, 70, 77]
		urticae	P.u.	[18]
	Pestalotia	funerea	P.f.	[64, 110]
	Spondylocadium	australe	Sp.a.	[66]
		xylogenum	Sp.x.	[66]
	Sporotrichum	epigaeum	S.e.	[63]
		sulfurescens	S.s.	[55, 63]
	Wojnowicia	graminis	W.g.	[27]
	Absidia	regnieri	A.r.	[33]
	Circinella	sp.	C.sp.	[67]
	Cokeromyces	recurvatus	C.r.	[115]
	Cunninghamella	blakesleeana	C.bl.	[107]
		baininieri	C.b.	[124]
		elegans	C.el.	[47, 89—96]
	Helicostylum	piniforme	H.p.	[41—46, 84, 86, 87]
	Mucor	griseo-cyanus	M.g.-c.	[56]
	Thieghemella	orchidis	T.o.	[107]
	Rhizopus	arhizus	R.a.	[24, 35, 38, 54, 69]
		circinans	R.c.	[24, 35]
		nigricans	R.n.	5, 14, 22, 23, 26, 29, 34—36, 54, 79, 81, 111, 112]
	Syncephalastrum	racemosum	S.r.	[33, 85]

для этой цели изучали довольно широкий круг микроорганизмов и условий их культивирования [40]. Однако позже японские ученые получили с помощью фикомицетов *H.p.* гидроксипроизводные как Δ^5 -, так и 5α -Н-сапогенинов (диосгенина, томатицина, соласодина, 5,6-дигидросоласодина) [41—46]. Заслуживает внимания факт однотипности протекания трансформации диосгенина и 5α -Н-стероидного алкалоида — томатицина — и полное отсутствие микробиологического превращения тигогенина в сравнении с диосгенином (схема 2) [44].

Схема 2





Основное направление гидроксирования определяется структурой субстрата. Диосгенин и томатидин трансформируются преимущественно с образованием 11α-гидроксипроизводных, а соласодин и 5,6-дигидросоласодин — с образованием 9α-гидроксипроизводных [41, 46]. Следует подчеркнуть, что при трансформации томатидина культурой *H.p.* атом азота в кольце *F* не препятствует 11α-гидроксированию.

Повторная попытка получить гидроксипроизводные из 5α-спиростанолов предпринята через 20 лет после указанных выше работ. С помощью *C. el.* получены 1β, 7β-дигидроксипроизводные гекогенина [47]. В отличие от *H.p.* и *C.el.* исследованные культуры грибов *Gymnoascus*, *Scopulariopsis*, *Fusarium*, *Dendrostibella*, *Nurotus* не гидроксилируют 5α-Н- и Δ⁵-сапогенины, а подобно бактериям трансформируют кольцо *A* и расщепляют боковую цепь [48—53].

III. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5α-Н-АНДРОСТАНОВ

Наиболее широко исследованными на гидроксирование грибами явились 5α-Н-андростаны. Анализ результатов трансформаций различных 5α-Н-андростанов (монокетоны, дикетоны, кетоспирты), выбранных в качестве простейших модельных соединений для интерпретации поведения микроорганизмов, позволил сделать основные выводы относительно механизма микробиологического гидроксирования стероидов. Гидроксилирующая активность по отношению к 5α-Н-андростанам исследована у грибов различных классов аскомицетов, базидиомицетов, дейтеромицетов и фикомицетов, у которых известна способность к гидроксированию Δ⁴-3-кетостероидов в положении: 11α — *A.o.*, *R.n.*, 11β — *C.cl.*, *C.cl.*, 12β, 15α — *c.d.*, *P.u.*, *P.sp.*, 21 — *W.g.*, *O.h.* [2, 6, 7]. Проверены также ранее не исследованные культуры *A.t.* [4], *D.g.* [28], *A.g.* [33], *L.f.* [37], *D.c.* [31], *R.c.* [24]. Результаты этих исследований представлены в табл. 2 и 3. При оценке данных табл. 2 следует обратить внимание на

Гидроксилирование 5 α -Н-андростанов грибами

Заместители в субстрате	Микро-организм	Исход-ное, %	Основные направления	Выход, %	Побочные направления	Выход ² , %	Ссылки
1	2	3	4	5	6	7	8
2,7-(CO) ₂	L.f.	15	16 β	22	16 β , 18	6	[37]
2,7-(CO) ₂	W.g.	15	2 β , 17 β	19	17 β	9	[27]
					2 β , 18	10	
3-CO	A.o.	56	6 β , 11 α	51	11 α	11	[21]
3-CO	A.r.	55	9 α , 15 β	8	9 α	4	[33]
3-CO	W.g.	72	9 α , 17 β	13	—	—	[27]
3-CO	D.r.	90	не трансформируется	—	—	—	[28]
17-CO	A.o.	65	7 β , 11 α	27	—	—	[21]
3,6-(CO) ₂	D.r.	9	3 β , 16 β	39	3 β , 15 β	12	[28]
					3 β , 6 α , 16 β	25	
3,6-(CO) ₂	L.f.	21	16 β	12	3 β , 16 β	8	[37]
3,7-(CO) ₂	W.g.	32	3 β , 17 β	41	3 α , 17 β	27	[27]
3,7-(CO) ₂	L.f.	4	16 β , 18	7	3 β , 18	5	[37]
3,7-(CO) ₂	O.h.	12	3 β , 17 β	62	—	—	[27]
3,7-(CO) ₂	A.r.	0	3 β , 11 α	6	Δ^1 -17-CO	3	[33]
					11 α	1	
3,7-(CO) ₂	S.r.	3	3 β , 12 α	13	7 α , 9 α	5	[33]
		3	3 β , 12 β	6	1 β	3	
					11 α	2	
					12 α	2	
					7 α , 9 α , 11 α	2	
3,7-(CO) ₂	D.c.	7	3 β , 16 α	48	3 β , 16 β	11	[31]
3,7-(CO) ₂	R.a.	3	16 β	15	16 α	3	[24]
			3 β , 16 β	31	11 α , 16 β	3	
					17 α	2	
3,7-(CO) ₂	R.c.	7	3 β , 11 α	22	11 α , 16 β	5	[24]
			16 β	10	3 β , 16 β	6	
3,7-(CO) ₂	D.r.	3	3 β , 7 α , 16 β	33	3 β , 7 α , 16-CO	3	[28]
					3 β , 7 β , 16 β	13	
3,11-(CO) ₂	A.r.	0	17 β , ($\Delta^{1,4}$)	6	16 β ($\Delta^{1,4}$)	4	[33]
					17-CO($\Delta^{1,4}$)	2	
					16-CO	2	
3,11-(CO) ₂	S.r.	—	16 β ($\Delta^{1,4}$)	18	17 β ($\Delta^{1,4}$)	9	[33]
					17-CO($\Delta^{1,4}$)	9	
3,11-(CO) ₂	D.c.	0	3 β , 16 α	55	16 α	18	[31]
					3 β , 11, 16-(CO) ₂	10	
3,11-(CO) ₂	R.c.	17	6 α	20	3 β , 7 β	3	[24]
			16 β	15	9 α , 16 β	2	
			7 β	10			
3,11-(CO) ₂	D.r.	5	3 β , 16 β	28	3 β , 15 β	15	[28]
3,11-(CO) ₂	L.f.	11	16 β	13	16 β , 18	5	[37]
3,11-(CO) ₂	R.a.	16	3 β , 16 β	22	16 β	7	[24]
			9 α , 16 β	23	9 α , 16 α	7	
3,11-(CO) ₂	O.h.	46	16 β	11	16-CO	38	[27]
			17 β	11	16-CO, 3 β	21	

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
3,11-(CO) ₂	W.g.	24	17β	28	3α, 17β 3β, 17β 3β, 16β	8 13 6	[27]
3,11-(CO) ₂	P.u.	—	15α 3β, 15α	31 15	— —	— —	[18]
3,16-(CO) ₂	L.f.	15	18	16	—	—	[37]
3,17-(CO) ₂	W.g.	7	1α, 17β 1α, 3β	7 6	1α, 3α, 9α, 7β 7α	1 1	[27]
3,17-(CO) ₂	S.s.	—	11α	22	3β	7	[55]
3,17-(CO) ₂	A.r.	0	9α 7α, 9α	14 13	3β, 9α 7α	5 10	[33]
3,17-(CO) ₂	A.r.	—	9α	11	7α 1β, 9α	2,4 0,7	[33]
3,17-(CO) ₂	C.cl.	—	11β	—	7α	—	[82]
3,17-(CO) ₂	D.c.	6	3β, 9α	6	9α	3	[31]
3,17-(CO) ₂	S.r.	0	3β, 7α 3β, 7α, 17β	7 3	3β 3β, 9α	7 2	[33]
3,17-(CO) ₂	D.r	0	3β, 7β, 17β	24	3β, 11α, 17β 3β, 6α, 17β	13 11	[28]
3,17-(CO) ₂	A.o.	—	11α	66	—	—	[21, 93]
3,17-(CO) ₂	A.t.	—	6β 11β	25 ⁶ 30 ⁶	— —	— —	[4]
3,17-(CO) ₂	P.sp.	—	1α	17	—	—	[70]
6-CO	D.r.	21	3β, 6α, 16β	16	3β, 6α, 16-CO 3β, 16β 3β, 15β	5 4 2	[28]
6,17-(CO) ₂	L.f.	17	2β	13	—	—	[37]
7-CO	D.r.		3β, 7α, 16β 3β, 7β, 16β	41 16	— —	— —	[28]
7,11-(CO) ₂	D.r.	0	3β, 7α, 16β	42	—	—	[28]
7,16-(CO) ₂	D.r.	0	3β, 7α	39	—	—	[28]
7,17-(CO) ₂	D.r.	0	3β, 7α, 17β 3β, 7β, 17β	32 16	3-CO, 7β, 17β	5	[28]
7,17-(CO) ₂	A.r.	33	5α	6	—	—	[33]
7,17-(CO) ₂	S.r.	4	1α, 17β	23	12β, 17β 11α, 17β 5α, 17β	7 11 4	[33]
7,17-(CO) ₂	W.g.	13	2α 2α, 17β	34 30	3β 3β, 17β	11 5	[27]
7,17-(CO) ₂	L.f.	12	2β	24	—	—	[37]
7,17-(CO) ₂	O.h.	38	3β, 17β	43	3β	32	[27]
7,17-(CO) ₂	R.c.	38	3β 11α	15 18	11α, 17β 4α 3β, 17β	8 6 5	[24]

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
7,17-(CO) ₂	R.a.	11	3α	31	3β	6	[24]
					3β, 17β	6	
					3α, 17β	2	
					3α, 11α	6	
					3β, 11α	2	
					11α	3	
7,17-(CO) ₂	D.c.	0	3α	52	1α	4	[31]
					17β	7	
11-CO	D.r.	10	3β, 14α, 16β	12	3β, 16-CO	7	[28]
					3β, 16α	5	
11-CO	O.h, W.g.	50—58	не выделен	—	—	—	[27]
11,17-(CO) ₂	A.r.	34	—	—	17β	28	[33]
11,17-(CO) ₂	S.r.	37	7α, 17β	27	5α, 17β	9	[33]
					7α	5	
11,17-(CO) ₂	D.c.	32	7α, 17β	11	7α	10	[31]
11,17-(CO) ₂	L.f.	39	не выделен	—	—	—	[37]
11,17-(CO) ₂	O.h.	63	3α	45	17β	44	[27]
11,17-(CO) ₂	R.a.	11	4α, 17β	27	7β, 17β	8	[24]
			3α, 17β	20			
11,17-(CO) ₂	R.c.	19	4α, 17β	54	7β, 17β	18	[24]
16-CO	D.r.	58	не трансфор- мируется	—	—	—	[28]
17-CO	D.r.	50	не трансфор- мируется	—	—	—	[28]
17-CO	H.p.	—	не трансфор- мируется	—	—	—	[86]
17-CO	O.h., W.g.	74—87	не трансфор- мируется	—	—	—	[27]
17-CO	C.el.	50	1β, 7α	14	1β, 7-CO	6	[92]
3α-OH, 6-CO	L.f.	0	16β, 18	39	16β	31	[37]
3β-OH, 6-CO	L.f.	—	17β	40	17-CO	3	[37]
			16β	27	16-CO	3	
3β-OH, 6-CO	A.r.	5	9α	23	14α	9	[33]
					11α	5	
3β-OH, 7-CO	L.f.	0	16β	24	16β, 18	6	[37]
3α-OH, 7-CO	W.g.	6	17β	55	—	—	[27]
3β-OH, 7-CO	W.g.	4	17β	63	3-CO, 17β	3	[27]
					17-CO	5	
					7α, 17β	2	
3β-OH, 7-CO	S.r.	0	12α	51	9α	19	[33]
					12β	8	
3β-OH, 11-CO	D.r.	0	16β	17	15β	8	[28]
					14α, 16β	5	
					16-CO	3,5	
3β-OH, 11-CO	L.f.	5	16β, 18	24	—	—	[37]
3β-OH, 11-CO	W.g.	48	6β	48	17β	22	[27]
3β-OH, 11-CO	D.r.	0	16β	17	15β	8	[28]
					14α, 16β	5	
					16-CO	3,5	

Таблица 2 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8
3β-OH, 16-CO	L.f.	22	18	21	—	—	[37]
3α-OH, 17-CO	R.a.	0	11α	30	7β	8	[24]
3α-OH, 17-CO	P.sp.	—	12β	12 ⁵	—	—	[3]
3β-OH, 17-CO	P.sp.	—	7α	11,8 ⁶	—	—	[3]
3α-OH, 17-CO	A.t.	—	11β	30 ⁶	11α	5	[4]
3α-OH, 17-CO	A.o.	—	11α	82	—	—	[18]
3α-OH, 17-CO	C.el.	0	7β	43	7α	10	[92]
3β-OH, 17-CO	R.a.	—	7β	57	7-CO	1	[24]
			7α	20	6α	8	
3β-OH, 17-CO	W.g.	5	1α	22	14α	13	[27]
					9α	7	
					5α	7	
3β-OH, 17-CO	F.g.	—	15α	—	—	—	[71]
3β-OH, 17-CO	A.t.	—	11β	45 ⁶	—	—	[4]
3β-OH, 17-CO	D.c.	0	9α	40	3-CO, 9α	15	[31]
					7α	12	
3β-OH, 17-CO	M.g.-c.	—	7α	—	7α, 14α	—	[56]
3β-OH, 17-CO	R.c.	7	7β	43	6α	25	[24]
3β-OH, 17-CO	A.r.	4	9α	19	9α, 14α	2	[33]
					7β	12	
					7α, 14α	4	
3β-OH, 17-CO	S.r.	0	7β	27	7-CO	10	[33]
			7β, 17β	24			
3α-OAc, 17-CO	C.el.	15	6β, 11β	22	1β	8,0	[92]
3β-OAc, 17-CO	C.el.	0	7β	31	7α	3	[92]
					7-CO	3	
6β-OH, 3-CO	L.f.	0	10β, 18	34	—	—	[37]
6α-OH, 17-CO	R.c.	37	11α	56	3β	5	[24]
6α-OH, 17-CO	R.a.	4	11α	72	11α, 17β	5	[24]
7α-OH, 3-CO	D.r.	28	16β	53	3β, 16β	28	[28]
7β-OH, 3-CO	D.r.	33	3β	18	—	—	[28]
7β-OH, 11-CO	A.r., S.r.	22—63	—	—	17-CO	15—25	[33]
9α-OH, 3-CO	D.c.	3	3β, 16α	47	16α	15	[31]
9α-OH, 3-CO	A.r.	82	не выделен				[33]
9α-OH, 3-CO	S.r.	10	3β, 12α	12	—	—	[33]
11α-OH, 3-CO	A.r.	49	не выделен				[33]
11α-OH, 3-CO	S.r.	25	3β, 7β	27	7β	17	[33]
					3β	4	
11α-OH, 3-CO	D.c.	28	16α	9	—	—	[31]
12α-OH, 3-CO	D.c.	0	3β, 16α	48	16β	19	[31]
12α-OH, 3-CO	S.r., A.r.	53—65	—	—	3β	6—10	[33]
17β-OH, 3-CO	A.t.	—	11β	20 ⁶	—	—	[4]
17β-OH, 3-CO	D.c.	54	3β, 9α, 17-CO	18	3β, 9α	9	[31]
17β-OH, 3-CO	A.r.	5	9α	14	7α, 9α, 17-CO	7	[33]
					9α, 14α	2	
17β-OH, 3-CO	L.f.	67	не выделен				[37]

Таблица 2 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8
17 β -ОН, 3-CO	A.o.	7	11 α	79	6 α , 11 α	2	[26]
17 β -ОН, 3-CO	R.a.	21	11 α	23	3 β , 7 β	5	[24]
			6 α	12	3 β , 6 α	4	
					3 β , 11 α	4	
					5 α	4	
17 β -ОН, 3-CO	D.c.	54	3 β , 9 α , 17-CO	18	9 α , 17-CO	4	[31]
					3 β , 9 α	9	
17 β -ОН, 3-CO	R.c.	19	6 α	33	—	—	[24]
			11 α	26	—	—	
17 β -ОН, 3-CO	R.sp.	—	1 α	—	—	—	[70]
17 β -ОН, 3-CO	C.el.	—	7 α	18	9 α	0,5	[93]
					6 α	3	
					12 α	0,8	
17 β -ОН, 3-CO	D.r., O.h.	81	не выделен				[27]
17 β -ОН, 3-CO	W.g.	7	1 α	5	3 β	2	[27]
			1 α , 3 α , 9 α	2			
17 β -ОН, 3-CO	S.r.	0	3 β , 7 α	27	7 β	9	[33]
					9 α	7	
17 β -ОН, 6-CO	S.r.	19	11 α , 17-CO	23	—	—	[33]
17 β -ОН, 7-CO	W.g.	14	2 α	58	3 β , 7 α	5	[27]
			2 α , 7 α	15			
			3 β	11			
17 β -ОН, 7-CO	D.c.	0	3 β	26	3 α , 17-CO	16	[31]
					3 α	7	
17 β -ОН, 7-CO	A.r.	18	3 β	24	3 α , 17-CO	6	[33]
17 β -ОН, 7-CO	S.r.	0	3 β , 12 β	23	3 β	17	[33]
					12 β	1	
					1 β	7	
17 β -ОН, 11-CO	W.g.	39	3 β	35	3 α	11	[27]
17 β -ОН, 11-CO	A.r., S.r.	22—63	—	—	17-CO	15—25	[33]
17 β -ОН, 11-CO	D.c.	8	7 α	18	7,17-(CO) $_2$	5	[31]
3 β , 7 α -(ОН) $_2$ -17-CO	D.c.	70	3-CO	56	—	—	[31]
3 β , 7 β -(ОН) $_2$ -17-CO	A.o.	16	7 β , 11 α	78	—	—	[26]

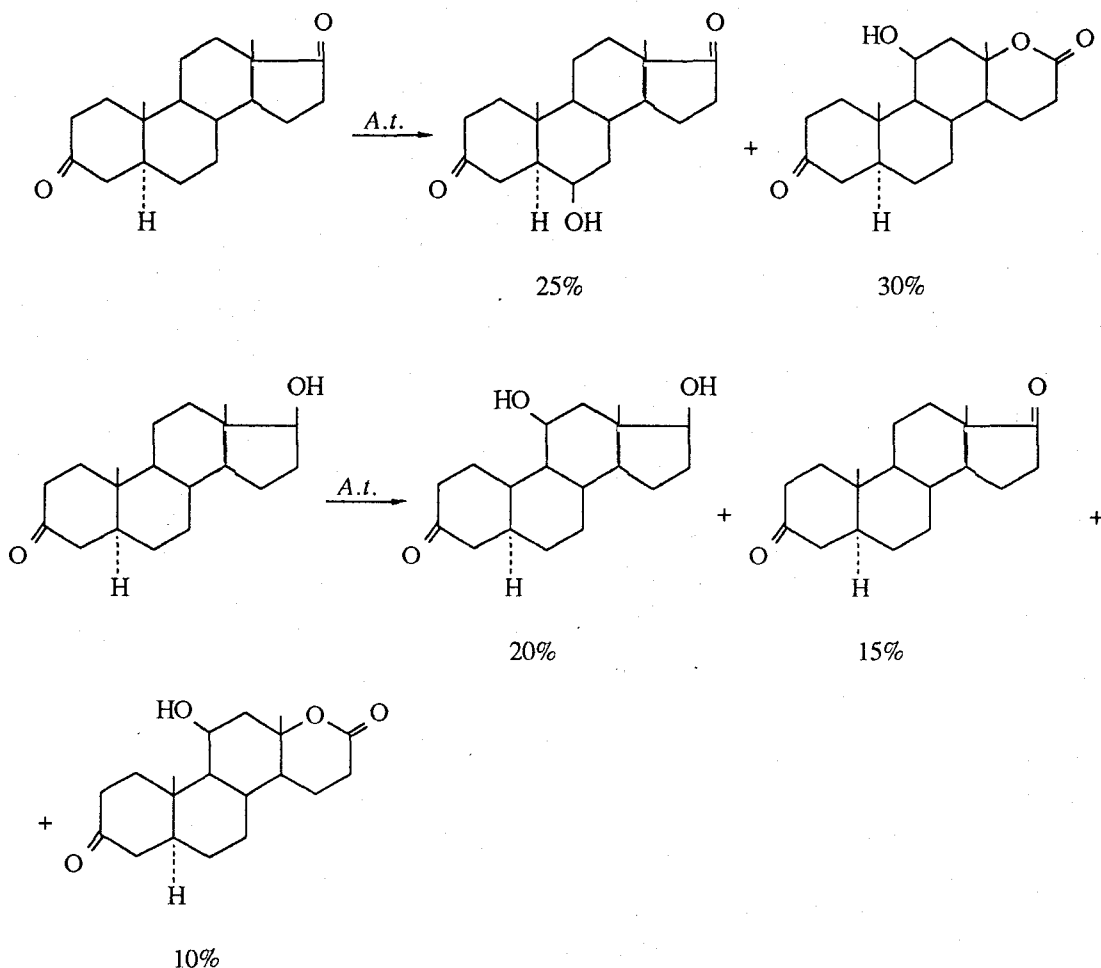
^aВыходы здесь и в последующих таблицах приведены в расчете на конвертируемый субстрат.

^bВыходы выделенного продукта в расчете на загруженный субстрат.

два, как нам кажется, важных момента. Как ни странно, но из всех изученных видов только штамм A.1. образует 11 β -моногидроксилированные соединения в ряду 5 α -Н-андростанов с достаточно высоким выходом. Однако для этой культуры характерна лактонизация кольца D и, к сожалению, этот процесс конкурирует с основной реакцией 11 β -гидроксилирования. Наличие в субстрате 3-кетогруппы активирует расщепление кольца D с образованием лактона, тогда как при инкубации A.1. с 3-

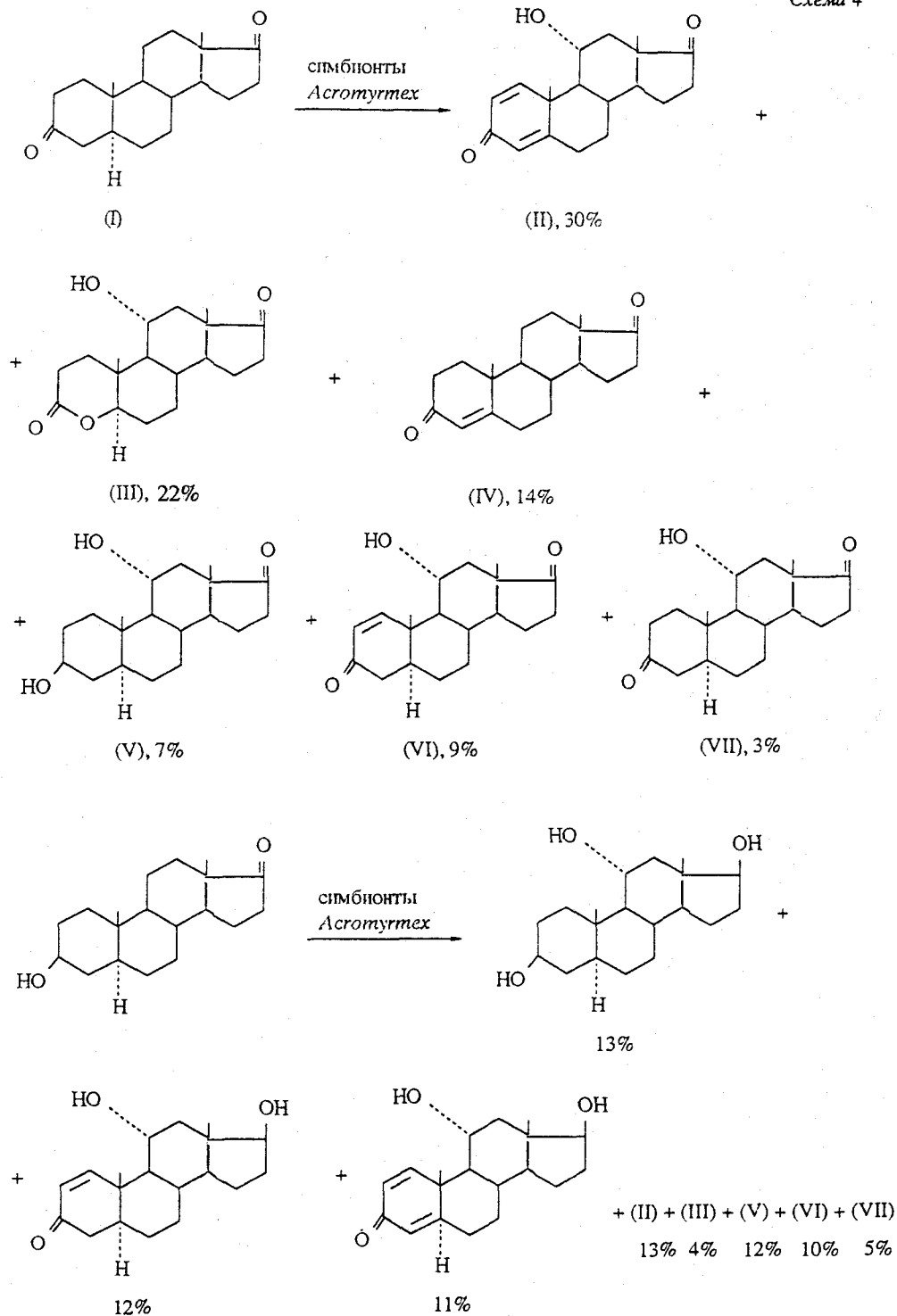
гидроксиг-5 α -Н-андростаном *D*-гомоизомеризация не происходит [4] (схема 3).

Схема 3



Второе заслуживающее внимания явление относится к неидентифицированным грибам — симбионтам муравьев, которые не исследовались ни до указанной работы [32], ни после нее. Из схемы 4 следует, что в ряду 5 α -Н-андростанов грибы-симбионты катализируют три процесса: а) гидроксигирование тех позиций, которые определены направляющим влиянием имеющихся заместителей в молекуле; б) окисление по Байеру—Виллигеру; в) дегидрирование кольца А. Последние два процесса протекают только при наличии кислородного заместителя в 11-положении. Примеры с 5 α -Н-андростанами, содержащими кислородные функции в положениях 3 и 17, подтверждают неизменность общего направления процесса при изменении природы кислородного заместителя при С(3) (схема 4).

Приходится сожалеть, что аналогичные исследования не проведены с соединениями ряда 5 α -Н-прегнана, поскольку одновременная активация колец А и С в прегнановом ряду представляется весьма актуальной задачей. Редкое сочетание у грибов *Ascomyces* гидроксигирующей и дегидрирующей активностей может быть объяснено, как нам кажется, тем, что эти грибы представляют собой микробный консорциум, члены которого выполняют различные превращения стероидной молекулы. В принципе известна способность грибов рода *Septomyxa* трансформировать 5 α -Н-



Гидроксирование моно- и дикислородзамещенных 5 α -андростанов культурами *Calonectria decora* и *Rhizopus nigricans*

Таблица 3

Заместители в субстрате	Calonectria decora [13, 19, 20, 30]					Rhizopus nigricans [14, 22, 23]				
	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксирования	Выход, % ^а	Побочные направления	Выход, % ^а	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксирования	Выход, % ^а	Побочные направления	Выход, % ^а
1-CO	75	Сложная смесь	—	—	—					
2-CO	13	6 α , 12 β	26	6 α , 11 α	11	51	6 α , 16 α	10	6 α , 16 α (2-CO \rightarrow 2 α -OH)	2,5
3-CO(EtOH)	23	12 β , 15 α	40—52	12 β , 15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	13	46	11 α , 16 β	18	6 β , 11 α	4
3-CO(DMSO)	0	6 α , 12 β , 15 α	28			—	11 α , 16 β	33	6 β , 11 α 11 α	4 1
3 β -OH(EtOH)	33	12 β , 15 α	18	—	—					
4-CO	0	12 β , 15 α 11 α , 15 α	41 40	— —	— —	40	11 α , 16 β	9	11 α , 16 β (4-CO \rightarrow 4 β -OH)	7
6-CO	90	Не реагирует				90	Не реагирует			
7-CO	72	»		12 β , 15 α	4	90	3 α , 16 β	34	4 β , 16 β	16
11-CO	40	1 β , 6 α	11	6 α	3	62	4 α , 16 β	7	3 α , 16 β 3 β , 16 β	5 3
15-CO	4	14 β , 6 α , 12 β	21	2 α , 12 β	8	59	Не выделено			
16-CO	31	6 α , 11 α	26—33	1 β , 6 α	7	34	3 β , 7 α	46		
17-CO	32—75	1 β , 6 α	15—47	1-CO, 6 α , 19	38	59	3 α , 11 α	10	3 α , 6 α	8
12-CO	8	6 α , 15 α	15	1 β , 6 α , 15 α	12	—	3 β , 7 β 6 α , 11 α 3 β , 7 β	9 9 29	3 β , 11 β	2,5
17 β -OH	41	1 β , 6 β	18	6 α , 11 α	7					
15 α -OH-2-CO	0	6 α	13	—	—					
17 β -OH-2-CO	4	6 α	31	—	—	17	6 α	15	—	
6 α -OH-3-CO	—	—	—	—	—	0	16 α	30	17 α	7
6 β -OH-3-CO							16 β	27	11 α , 16 β	4
							11 α	14		
						0	16 β	39	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	2

7 α -OH-3-CO						0	11 α , 16 β	30		
							11 α	14		
							16 β	33		
							16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	24		
7 β -OH-3-CO						31	16 β	52		
11 α -OH-3-CO	4	12 β , 15 α	24	-	-	5	16 β	45—30	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	11
							16 α	14	7 β , 17 α , 16-CO	4
							16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	11—50		
11 β -OH-3-CO						27	9 α , 16 β (11 β -OH \rightarrow 11-CO)	13	16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4
							16 β	11	6 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH), 11 β -OH \rightarrow 11-CO)	2
							16 β (11 β -OH \rightarrow 11-CO)	9	16 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH, 11 β -OH \rightarrow 11-CO)	1
							16 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH, 11 β -OH \rightarrow 11-CO)	9		
16 β -OH-3-CO						0	11 α	61—80	11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	23—27
17 β -OH-3-CO						8	11 α	34	7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	7
							6 α	30	5 α	6
17 β -OMe-3-CO	16	12 β , 15 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	8	-	-					
3 β -OH-6-CO						0	16 α	43	16 β	18
17 β -OH-6-CO						0	3 β	23	5 α , 11 α	7
							3 α	21	3 α , 11 α	7
							11 α	11		
3 β -OH-7-CO						0	16 β	77		
17 β -OH-7-CO						0	3 α	52	4 α	3
									3 β	12

Заместители в субстрате	Cakibetrus decira [13, 19, 20, 30]					Rhizopus nigricans [14, 22, 23]				
	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, %	Возвращенный субстрат, %	Главные направления гидроксилирования	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a
3β-OH-11-CO						0	16β	34	7β, 16β	8
							16α	11	17β, 16-CO	7
							6α	9	16-CO	6
									5α, 16β	5
									7β, 17α	4
17β-OH-11-CO						26	3α	47	—	—
15α-OH-12-CO	0	6α	13	—	—	—	4α	25	—	—
14β-OH-15-CO	23	7β, 12β	34	7β, 12β	—					
12β, 14β(OH) ₂ -15-CO	0	7β	21							
3β-OH-16-CO						0	7α	90	—	—
3α-OH-17-CO		1β, 15α	25	—	—	7	7β	24		
		1β, 6α	37	—	—	—	11α	23	6α	5
3α-OMe-17-CO	3	1β, 6α	60	—	—					
3β-OH-17-CO	6	12β, 15α(3β-OH → 3-CO)	32			0	7β	48	7α	15
		12β, 15α	21						6α	12
6α-OH-17-CO						16	11α	58	3β	10
7α-OH-17-CO						10	3β	77		
17β-OH-17-CO						25	3β	57		
2,16-(CO) ₂	—	12β-6-CO	27	6α, 12β	12	0	7α(2-CO → 2α-OH)	55	7α	7
									6α(2-CO → 2α-OH)	5
1,17-(CO) ₂	15	6α	33	6α, 19	25					
2,17-(CO) ₂	15	6α	13			0	7α(2-CO → 2α-OH)	20	7β(2-CO → 2α-OH)	6

3,6-(CO) ₂							6	16β(3-CO → 3β-OH) 16α(3-CO → 3β-OH) 16α 16β	26 23 23 32	6α(2-CO → 2α-OH) 16β	2 9
3,7-(CO) ₂	26	12β(3-CO → 3β-OH)	19				4	16β		16β(3-CO → 3β-OH)	9
3,11-(CO) ₂	27	15α(3-CO → 3β-OH) 15α	23 18				4—19	16β 16β(3-CO → 3β-OH)	55—20 20	9α,16β 9α,16α 16α(3-CO → 3β-OH) 16α	6 5 4 2
3,12-(CO) ₂	10	15α	14								
3,16-(CO) ₂	69	15α(3-CO → 3β-OH)	26	12β, 15α	11	0	7α(3-CO → 3β-OH)	50	—	—	—
3,17-(CO) ₂	23	12β, 15α	5			32	$\left\{ \begin{array}{l} 11\alpha \\ 6\alpha \end{array} \right.$	23 15	$\left\{ \begin{array}{l} 6\alpha(3\text{-CO} \rightarrow 3\beta\text{-OH}) \\ 7\beta(3\text{-CO} \rightarrow 3\beta\text{-OH}) \end{array} \right.$	3 4	
6,17-(CO) ₂	27	1β	64—56								
7,17-(CO) ₂	25	1β	55	—	—	0	3α 3β	37 7	3α, 11α 3β(17-CO → 17β-OH) 3α-(17-CO → 17β-OH)	5 4 6	
11,16-(CO) ₂ (EtOH, 6 ч)						22	3β, 7β 3α	24 10	3β	5	
11,17-(CO) ₂	4	6α	32	—	—	21	3α(17-CO → 17β-OH)	36	4α(17-CO → 17β-OH)	15	
1,17-(CO) ₂ -6α-OH	6—40	19	26—29	—	—						
3β, 6α-(OH) ₂						6	16α	37	3α 16β	14 17	
3β, 6β-(OH) ₂						17	16β	38	15α	17	

стероиды в $\Delta^{1,4}$ -кетосоединения, но при этом они не проводят гидроксильрование [72—74].

Значительный прогресс в понимании механизма гидроксильрования стероидов достигнут благодаря работам ученых Оксфордского университета. Они исследовали влияние функциональных групп субстрата на тип гидроксильрования разными грибными культурами. В попытке отойти от единообразия, возникшего при использовании субстратов прегнанового ряда с кислородсодержащими заместителями при C(3) (в основном CO), и найти общую модель гидроксильрования научная группа под руководством Джонса исследовала очень широкий набор 5α -H-стероидов (более 300), в котором систематически менялись положения, природа кислородсодержащих заместителей и их количество, а также были первоначально исключены дополнительные структурные факторы (двойная связь, сочленение колец, наличие гетероатома). Эта гигантская работа, в ходе которой было получено более 800 гидроксистероидов, и значение которой трудно переоценить, выполнена в 1969—1980 гг. [13—38]. Сначала в орбиту исследований вовлекались известные микроорганизмы, характеризующиеся как субстрат-специфичностью, так и субстрат-независимостью, затем новые микроорганизмы, не изученные ранее в качестве стероид-гидроксильрующих биокатализаторов, вплоть до вышеуказанных грибов — симбионтов *Ascomyces oostrophosus* [32].

Данные табл. 2 и 3 показывают, что эти исследования пришли на смену эпизодическим и немногочисленным исследованиям трансформаций 3,17-дизамещенных 5α -H-андростанов отдельными культурами [54—56, 64, 70, 77]. Ученые Оксфордского университета изучили влияние широкого набора заместителей в 5α -H-андростане на гидроксильрующую способность A.g., P.u., R.a., R.c., W.g., O.h. с акцентом на C.d., R.n., A.o. Полученные результаты в большинстве случаев подтверждают гипотезу Браннона [4], согласно которой гидроксильрование в различные положения стероидной молекулы катализируется одним неспецифичным ферментом. Этой гипотезе не противоречит и построенная на основании интерпретации результатов гидроксильрования различных субстратов R.n. [22, 23] модель фермент-субстратного взаимодействия, определяющая направление гидроксильрования. Общая интерпретация механизма гидроксильрования, предложенная Джонсом [78], не только удовлетворительно объяснила результаты окисления стероидов вышеперечисленными культурами, но и получила признание и развитие в работах других групп исследователей [79—96].

Предложенная модель гидроксильрования предлагает существование на поверхности ферментной глобулы трех активных центров, служащих двум целям, т.е. каждый центр-сайт может выполнять две функции — функцию связывания фермента с субстратом и функцию гидроксильрования (рис. 1). Согласно этой модели, сайты

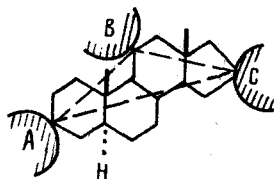
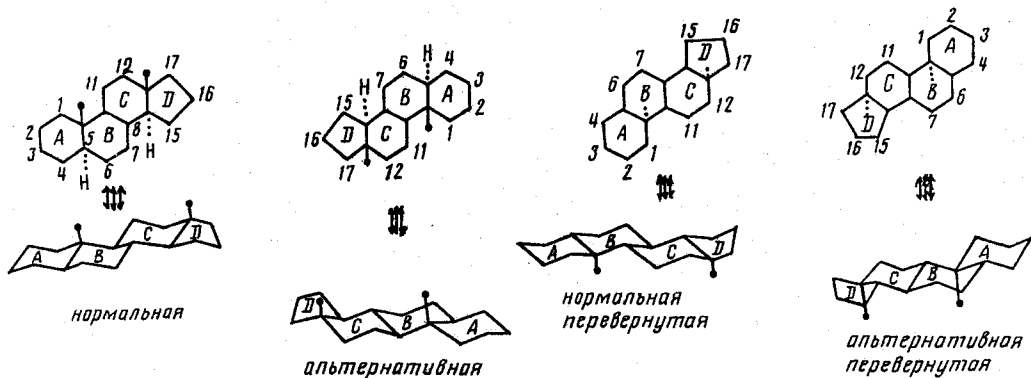


Рис. 1. Модель фермент-субстратного взаимодействия по Джонсу [78]

имеют треугольную локализацию, приблизительно соответствующую той, которую занимают атомы C(3), C(11) и C(17) стероидного кольца. Способ образования фермент-субстратного комплекса и, следовательно, результат гидроксильрования будет зависеть от того, несут ли эти центры стероидного кольца кислородные заместители (сколько и какие); при этом связывание стероида с ферментом может происходить в одной из возможных ориентаций. Считается, что теоретически возможны четыре ориентации стероида по отношению к ферменту: а) нормальная (normal), б) альтернативная (reverse), в) нормальная перевернутая (normal capsized), г) альтернативная перевернутая (reverse capsized), две последние получаются вращением стероидной

молекулы вокруг оси C(3)—C(17) на 180°. Нормальная и альтернативная ориентации — более предпочтительны и практически только они рассматриваются в модели гидроксирования Джонса (схема 5).

Схема 5



Согласно этой модели связывание фермента со стероидным субстратом происходит по двум кислородным центрам, что хорошо подтверждается данными трансформации монокетонов 5 α -Н-андростанов различными культурами. Практически все монокетоны (1-, 2-, 3-, 4-, 6-, 7-, 11-, 12-, 15-, 16-, 17-CO) трансформируются или с большим трудом — с возвратом до 90% непрореагировавшего субстрата — или не трансформируются совсем. При наличии трансформации наблюдается большая неоднородность продуктов реакции. Высокий процент возврата может быть связан с низкой растворимостью монокетонов по сравнению с другими стероидами и, следовательно, с более трудным проникновением в клетку. Но основное объяснение низкой реакционной способности монокетонов и неоднородности получаемых из них продуктов заключается, по-видимому, в том, что молекула субстрата, закрепленная на поверхности фермента только на одном сайте, вращается или раскачивается вокруг центра связывания, подвергая каталитическому действию фермента не всегда предсказуемые положения. При этом монокетоны, как правило, подвергаются дигидроксированию. Как это происходит у *D.r.*, показывает рис. 2.

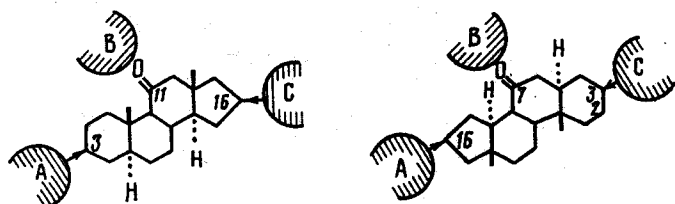


Рис. 2. Направление гидроксирования 11-кето- и 7-кето-5 α -Н-андростанов культурой *D.r.* [28]

Эта же модель объясняет принцип дигидроксирования монокетонов грибами *C.d.* и *R.l.* следующим образом: кетогруппа субстрата в одной (или нескольких) из его ориентаций связывается с одним из связующих центров фермента, а два других сайта выполняют функцию гидроксирования тех C—H-связей, которые оказываются расположенными к ним вициально. Например, 3- и 16-кетоны дигидроксировались *R.l.* в 11,16- и 3,7-положения вследствие связывания кетогруппы с ферментом в центре А нормальным и альтернативным способами соответственно (рис. 3). Образование многокомпонентной смеси 6,11-, 3,7- и 3,11-дигидроксипроизводных при трансформации 17-кето-5 α -Н-андростана авторы объясняют неоднородным связыванием обоими

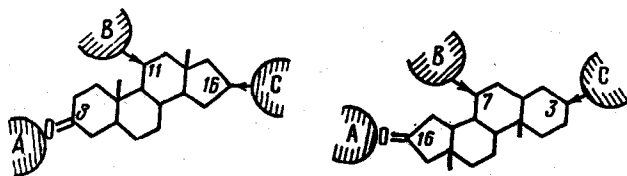
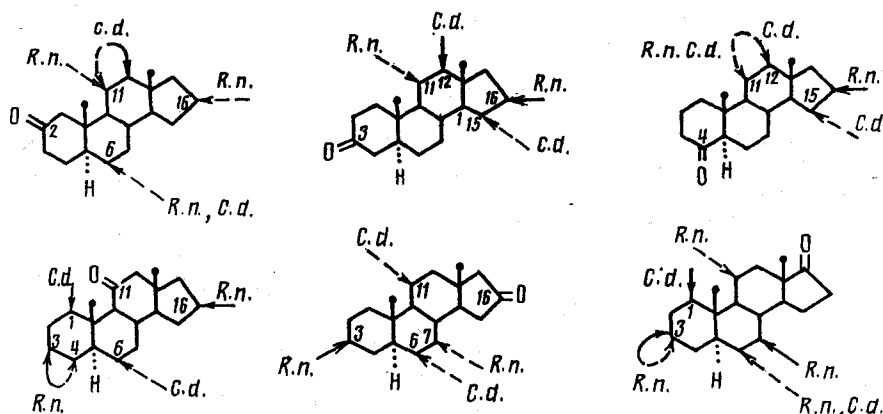


Рис. 3. Направление гидроксилирования 3-кето- и 16-кето-5 α -Н-андростанов грибами *C.d.* и *R.n.* [20, 22, 30]

способами. В этом случае плохо поддается объяснению образование 6,11-дигидроксипроизводных, а также образование 6 α , 16 α - и 6 α , 11 α -, а не 11,16-дигидроксизамещенных продуктов при трансформации 2-кето-5 α -Н-андростана с помощью *R.n.* [22].

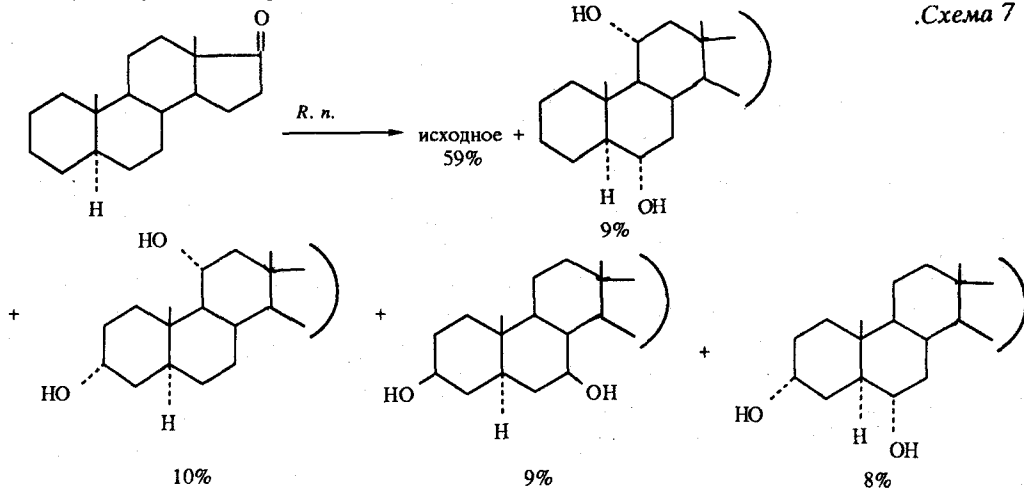
Схема 6



Здесь и далее : — β -атака
 --- α -атака

Не исключено, что указанные варианты дигидроксилирования являются следствием последовательного моногидроксилирования сначала в 11 α - или 16 α -положения, а затем в 6 α -; во всяком случае известно об индукции 6-гидроксилазы у *R.n.* 11 α -гидроксистероидами при инкубации с Δ^4 -3-кетостероидами [2]. Возможно, что 16 α -гидроксипроизводные 5 α -Н-стероидов также индуцируют синтез второго фрагмента. Следует заметить, что высокий процент возвращенного исходного субстрата (17-CO и 2-CO) указывает на то, что ни один из доступных способов связывания не создает благоприятную для гидроксилирования ситуацию (схема 7).

Схема 7



Рассмотрим эти данные (схема 6) в сравнении с результатами окисления монокетонов 5 α -Н-андростанов культурой *C.d.* Как правило, *C.d.* вводит обе экваториальные группы на расстояние, практически одинаковое от кислородного атома субстрата, причем расстояние между атакуемыми углеродными атомами примерно тоже одинаково (1 – 6 = 3,9 Å; 6 – 11 = 4,4 Å; 11 – 15 = 4,5 Å). Как видно, окисление монокетонов *R.l.* не столь специфично, ибо наряду с экваториальным имеет место и аксиальный способ замещения, а расстояние между атакуемыми центрами не столь однообразно, хотя и составляет в большинстве случаев ~ 5 Å (11—16, 3—17). Заметная конверсия монокетонов в главный продукт при инкубации с *C.d.* осуществляется только тогда, когда заместитель находится в терминальных кольцах. Интересной особенностью *R.l.* по отношению к стероидам ряда 5 α -Н-андростана является интенсивное гидроксилирование в 16 β -положении (см. выше табл. 3), никогда не проявляющееся в прегнановом ряду [35]. Низкой способностью к окислению моноспиртов *R.l.* также отличается (1- α , 3- β , 6- α , 11- α , 17 β -), при инкубации с которыми остается 75—95% исходного субстрата [22], тогда как *C.d.* гидроксилирует по крайней мере 3 β - и 17 β -спирты (остальные не исследованы) (табл. 3). Наиболее характерным для *C.d.*-вида, известного как 12 β , 15 α -дигидроксилирующая культура для Δ^4 -3-кетостероидов [104], является также 12 β , 15 α -дигидроксилирование 5 α -Н-андростанов с 3-СО, 3 β -ОН, 3 α -ОН заместителями, а также соединений с 3 β -ОН- Δ^1 -, 3-СО- Δ^1 или 17-ацетатной группировками [13, 19, 29]. В отличие от *C.d.* плесени *R.l.* и *A.o.* не гидроксилируют 3- и 17-моноацетаты 5 α -Н-андростана [29].

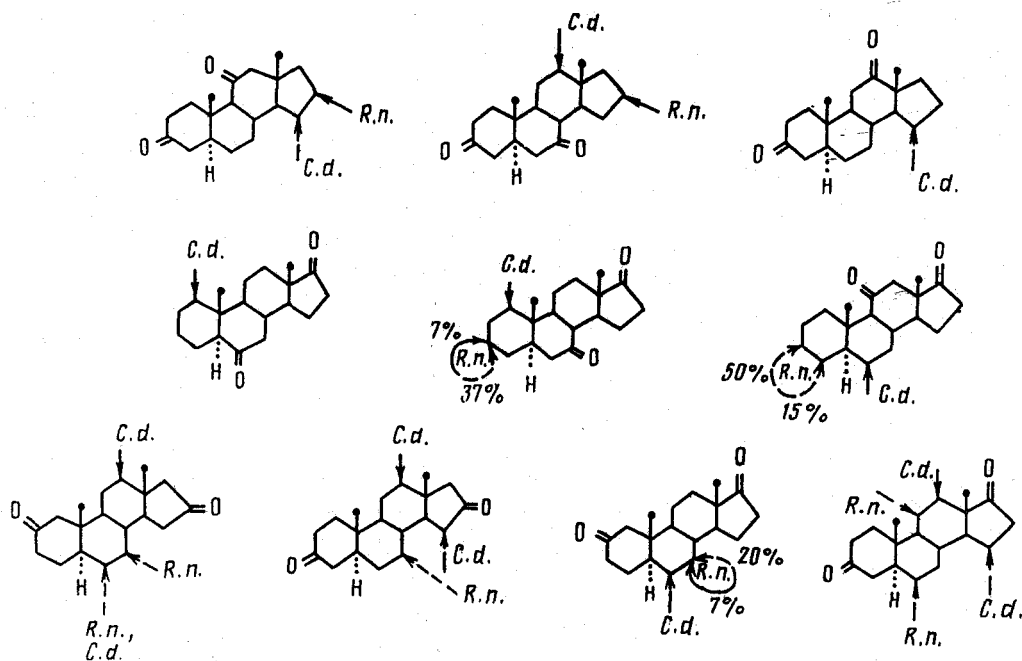
При трансформации монокетонов с помощью *D.r.* связывание фермента с субстратом происходит в основном с участием заместителя в центре молекулы (C(7) или C(11)) с образованием 3 β , 16 β -дигидроксилированных продуктов (табл. 2, рис. 2). При использовании в качестве субстратов андростанов с заместителями в терминальных кольцах (3-, 16-, 17-) возврат непрореагировавшего стероида составляет 50—90%, образуется сложная смесь неидентифицированных продуктов [28]. Культуры *W.g.*, *O.h.*, *D.c.*, *D.r.* и *S.r.* инертны по отношению к большинству моно- (в основном СО) замещенным 5 α -Н-андростанов [27], что согласуется с обсуждаемой гипотезой о вероятном участии в связывании двух центров фермента.

Культура *A.o.* также не трансформирует большинство монокетонов. Исключение составляют 3- и 17-кетоандростаны, превращаемые с 44 и 35%-ной конверсией соответственно в 6 β , 11 α -дигидрокси- и 7 β , 11 α -дигидроксипроизводные (51 и 27%) и 11 α -дигидроксипроизводные (11 и 5%) [21]. Однако образование дигидроксилированных производных культурой *A.o.* обусловлено действием не одного фермента, как у *C.d.*, а двух стероид-гидроксилаз, существование которых показано в экспериментах с бесклеточным экстрактом [75, 76]. Предполагается, что вторая гидроксилазная система в клетках *A.o.* индуцируется продуктом реакции первого фермента, которым всегда является 11 α -гидроксипроизводное, что приводит к образованию 6 β , 11 α -дигидроксипроизводных, но никогда — 6 β -моногоидроксипроизводных [28]. Присутствие в молекуле второй кислородсодержащей группы (СО или ОН) в различных положениях облегчает гидроксилирование 5 α -Н-андростанов с помощью *A.o.*, но всегда в 11 α -положение. Кроме того, если при инкубации с монокетонами *A.o.* катализирует преимущественно дигидроксилирование, то дизамещенные андростаны превращаются этой культурой с высоким выходом 66—82% исключительно в 11 α -моногоидроксипроизводные (табл. 2). Однако функционирование в клетках *A.o.* двух стероид-гидроксилаз и характерная для этого микроорганизма сайт-специфичность дают основание считать его неподходящим для решения поставленной задачи. В связи с этим основное внимание группы было сосредоточено на *C.d.* и *R.l.*, которые способны к гидроксилированию стероидов в различные положения в зависимости от структуры субстрата (табл. 3), с привлечением культур, указанных в табл. 2.

Анализ результатов превращения монозамещенных 5 α -Н-андростанов показывает, что движущей силой, которая определяет направление гидроксилирования, является

специфичность микроорганизма и ориентирующее действие кетогруппы. Использование в качестве субстратов различным образом замещенных кетонов и дикетонов позволяет, увеличив скорость и эффективность трансформации (изменением гидрофильности субстрата, растворителя для внесения в реакционную смесь, времени инкубации), проследить за конкурентным влиянием заместителей, ограничив процесс моногидроксилированием за счет блокирующего действия второго заместителя и, главное, выявить факторы, ответственные за направление гидроксилирования. Замечено, что полярные группы в терминальных кольцах так же, как это наблюдалось на монозамещенных андростанах, оказывают доминирующее влияние на процесс гидроксилирования культурой *C.d.* Например, общая для субстрата 3-кетогруппа в 3,11-, 3,12- и 3,7-дикетонах направляет гидроксилирование в кольца *C* и *D*, а общая для субстрата 17-кетогруппа в 6,17-, 7,17-, 11,17-дикетонах направляет гидроксилирование этим микроорганизмом в кольца *A* и *B*. При этом кетогруппы в средних кольцах *B* и *C* обладают слабым ориентирующим эффектом, блокируя гидроксилирование в собственное положение и стимулируя в соседние или пространственно сближенные (табл. 3, схема 8).

Схема 8



Естественно, что конкуренция кетогрупп, расположенных в терминальных кольцах (4 последних примера на схеме 8) выражается в дигидроксилировании, направление которого обусловлено ориентирующим влиянием обеих кетогрупп. Гидроксильные группы в образующихся главных продуктах, как правило, экваториально ориентированы и находятся на расстоянии 3,5—4,5 Å от ближайшего кислороднесущего углерода и на расстоянии 6,3—8 Å либо от C(3) (субстрат с заместителем в кольце *A*), либо от C(17) (субстрат, замещенный в кольце *D*). Направляющая сила основных ориентирующих заместителей при анализе результатов окисления оценена следующим образом: 3-CO- Δ^4 (и менее четко 5 α - и 3 β -OR, R = H, Me) > 17-CO > 3 α -OR (R = H; Me); 3-CO, Δ^4 > 17 β -OH и т.д., т.е. природа кислородной функции менее важна, чем ее пространственная ориентация относительно стероидного ядра в целом. Это чрезвычайно важный вывод, позволяющий разрушить укоренившееся и, как уже показано на культуре *A.o.*, по-видимому ложное представление о необходимости, например, Δ^4 -3-кетогруппы в молекуле стероида для успешного их микробиологического гидроксилирования.

Согласно обсуждаемой модели гидроксирования, дикислородсодержащие субстраты ориентируются у молекулы фермента таким образом, чтобы обеспечить максимально возможное гидрофильное связывание между обоими заместителями и соответствующими им центрами фермента, в таком случае третий каталитический центр отвечает за гидроксирование ближайшего атома углерода.

Ферменты *R.l.* гидроксилируют терминально замещенные субстраты, ориентированные нормальным способом, в положение 11, а ориентированные альтернативным способом — в положение 6 или 7. Так, из четырех подвергнутых окислению терминально замещенных дикетонов три субстрата (2,16-, 2,17-, 3,16-) гидроксилируются только альтернативным способом (табл. 3, схема 8) [23]. Приведенные модели показывают, что для первых двух стероидов связывание нормальным способом не дает возможности для контакта стероида с ферментным сайтом В, а в 3,16-дикетоне геометрическое расположение центров благоприятно для обоих видов связывания. Наблюдаемый для 3,16-дикетона альтернативный способ гидроксирования свидетельствует о предпочтительности связывания 16-кетогруппы по сайту А. 3,17-Дикетон, хотя и гидроксилируется нормальным способом, но с низкой конверсией (32% исходного), низким выходом 11 α -оксипроизводного (23%) и образованием 6 α -оксипроизводного. Поэтому будет справедливым сказанное выше для 17-монокетона распространить на 3,17-дикетон. Поразительным результатом является количественное 11 α -гидроксирование (~ 100%) 16 β -гидроксид-3-кетона и 7 α -гидроксирование (90%) 3 β -гидроксид-16-кетона, если вспомнить, что соответствующие моноспирты не трансформируются *R.l.* [23]. Вероятно, эти спирты в сочетании с 3-кето- и 16-кетогруппами дают оптимальную модель для гидроксирования соответственно нормальным и альтернативным способами. 17-Кетогруппа в сочетании с 3 β -гидроксильной проявляют заметное предпочтение гидроксирования одним (альтернативным) способом (48% 7 β -ОН и 15% 7 α -ОН), наличие же 3 α -гидроксильной группы способствует образованию продуктов гидроксирования обоими способами (23% 11 α -ОН и 5% 6 α -ОН). Присутствие 17 β -гидроксильной группы в 17 β -гидроксид-5 α -андростан-3-оне, хотя и облегчает процесс гидроксирования *R.l.*, но делает его селективным. Вероятно, и здесь асимметричное расположение заместителя при С(17) мешает оптимальному способу связывания субстрата с ферментом.

Результаты окисления *R.l.* практически всех изученных кетонов и кетолов с одним кислородным атомом в терминальном кольце, а другим — в среднем удовлетворительно интерпретируются с позиций представления о трех двухцелевых сайтах. Как правило, субстраты с заместителем в кольце А гидроксилируются преимущественно в кольцо D и наоборот, замещенный в кольце D субстрат гидроксилируется в кольцо А, т.е. и здесь, как и в случае с *C.d.*, наблюдается доминантное влияние терминальных заместителей, связывающихся с ферментом по сайту А чаще нормальным или альтернативным способом и гидроксилирующимся по сайту С. Заместители же в центральных кольцах оказывают лишь вспомогательное, обсужденное выше для *C.d.* влияние (схема 9). Минорные продукты гидроксирования, вероятно, могут возникнуть при внедрении гидроксильной группы в соседние с основным направлением гидроксирования положения (например, 4 или 17). Нельзя не отметить, что для дизамещенных соединений более характерно моногидроксирование, даже если способ связывания молекулы с субстратом благоприятен для вхождения второй группы. Так, в приведенных выше на схеме 10 примерах эпимерные 7-гидроксид-3-кетоны вовсе не гидроксилируются по сайту В, а эпимерные 6-гидроксид-3-кетоны — лишь частично (см. табл. 3).

В авторском варианте предлагаемая модель гидроксирования акцентирует внимание на региональности реакций, но совершенно игнорирует их стереохимические аспекты: стереоспецифичность реакций или ее отсутствие, влияние стереохимии заместителя в субстрате. Спустя два года Криндл с соавт. [79], анализируя гидроксирование норкаранов *R.l.* с позиции гипотезы Джонса о формировании временного ферментсубстратного комплекса предложили ее модификацию, которая

Схема 9

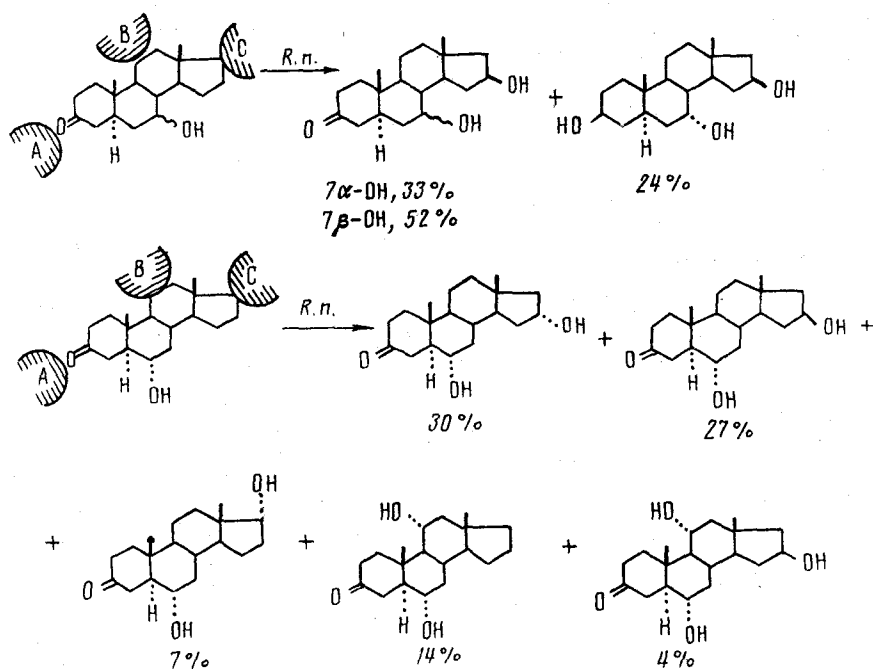
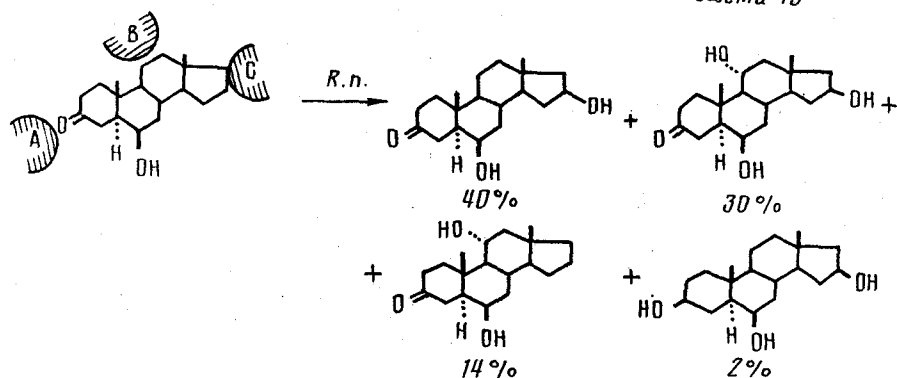


Схема 10



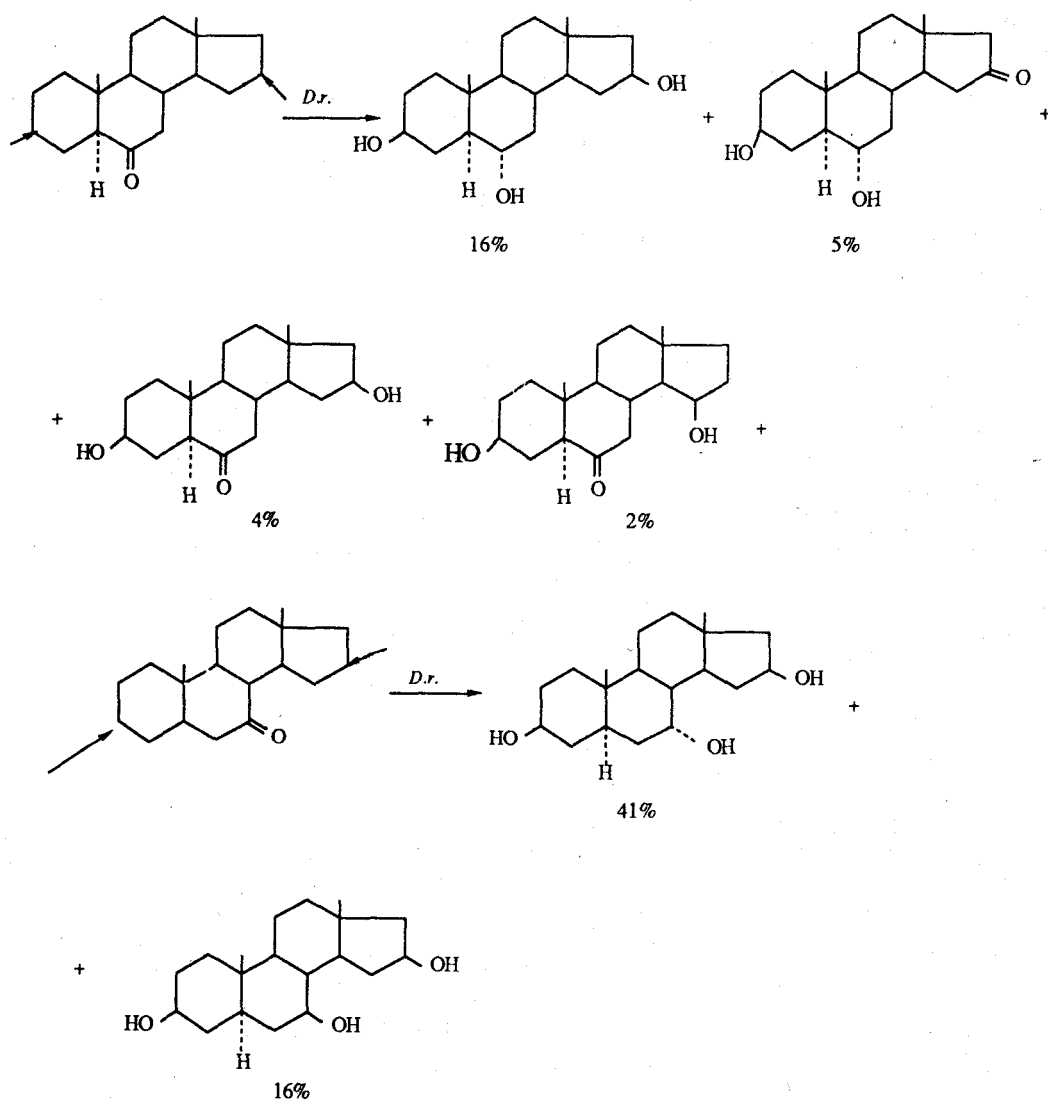
учитывает трехмерность стероидной молекулы и белковой глобулы. Их идея заключалась в том, чтобы провести воображаемую плоскость через молекулу стероидного субстрата таким образом, чтобы сайты А и В были бы ниже ее (или копланарны), а центр С — выше. При этом предполагается, что центр А предпочитает связывать кислородные атомы ниже этой плоскости и гидроксирование происходит в α -области. Центр В предъявляет аналогичные требования к связыванию с ферментом, но гидроксирование может происходить как в α - (аксиальной или экваториальной), так и в β -области (только экваториальной). Центр С предпочитает связываться с ферментом выше этой плоскости и направлять гидроксирование в β -положение. С точки зрения авторов все результаты по стереохимии гидроксирования стероидов *R. n.* и собственные данные по гидроксированию норкаранов хорошо укладываются в рамки этой гипотезы [79].

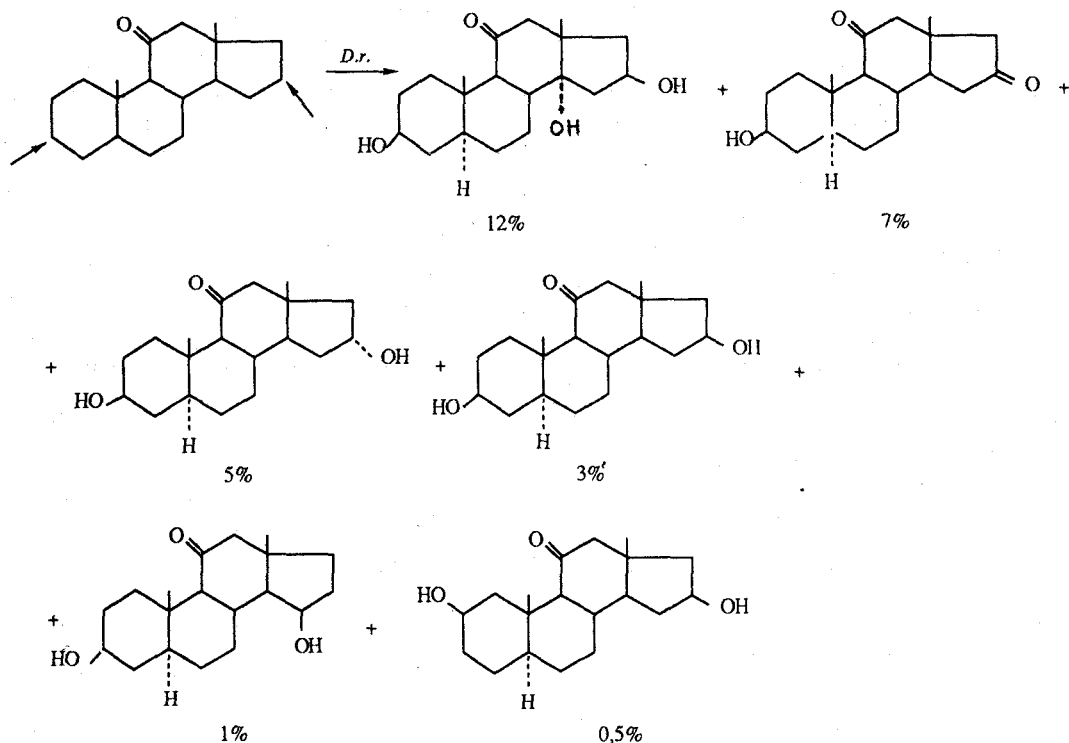
В предложенную гипотезу хорошо вписываются результаты трансформации 5 α -андростанов культурами *W.g.*, *O.h.* и *D.r.*, где большинство моно- (в основном СО)

замещенных 5 α -андростанов инертны в присутствии *W.g.* и *O.h.* Ферментная система *D.r.* проявляет удивительный контраст между медленным гидроксилированием субстратов с карбонильной группой в терминальном кольце и более высокой скоростью превращения субстратов с этой группой в центральном кольце. Так, 5 α -андростаны с 3-CO, 16-CO и 17-CO-группами трансформируются *D.r.* лишь на 10—40%, образуя сложную смесь неидентифицированных продуктов, а их 6-CO, 7-CO, 11-CO-аналоги окисляются с 80—90%-ной конверсией по терминальным кольцам. Процессы гидроксилирования 11- и 7-кетонев культурой *D.r.* отличаются специфичностью: первые дают несколько продуктов гидроксилирования, тогда как 7-кетоны гидроксилируются более однозначно (схема 11, табл. 2).

Рассмотрим на примере этих культур (*W.g.*, *D.r.*, *O.h.*), как полученные с их помощью результаты указываются в рамки модели Джонса. Ферментная система *O.h.* оказалась инертной по отношению к терминально-замещенным дикислородсодержащим андростанам. Культуры *W.g.* и *D.r.*, напротив, эффективно гидроксилируют эти

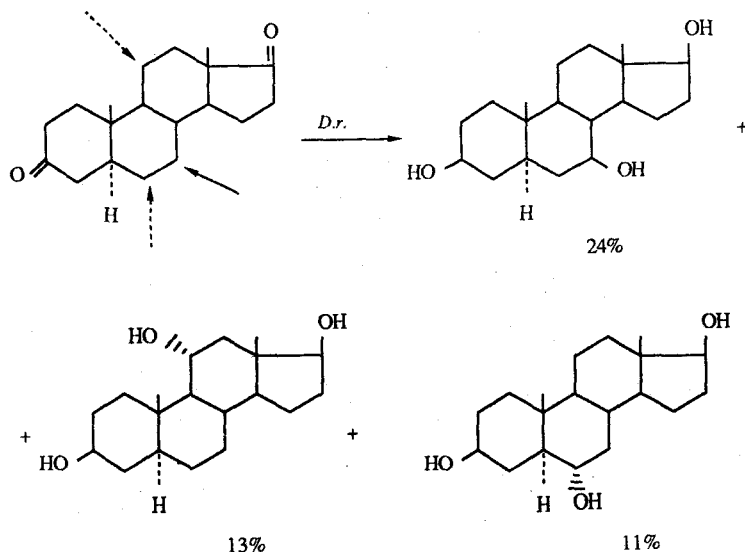
Схема 11

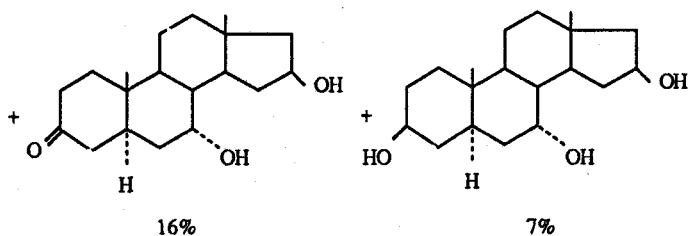
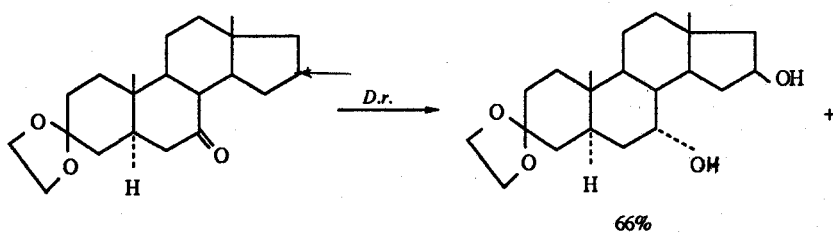
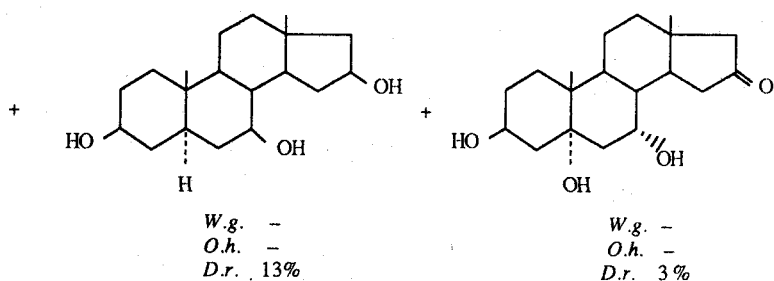
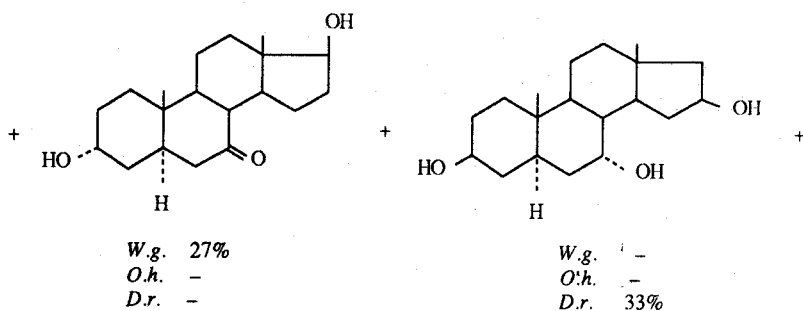
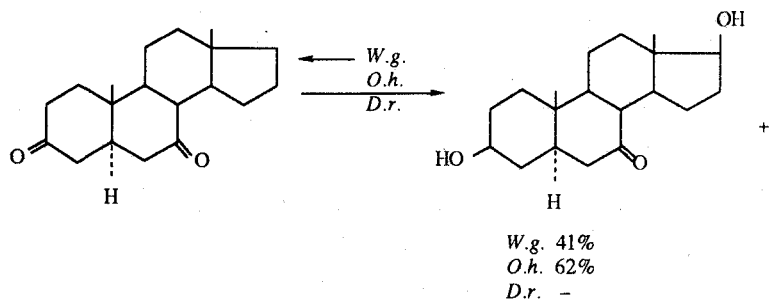




субстраты (табл. 2) [27, 28]. Дикислородзамещенные 5α -андростаны с одной кетогруппой в терминальном кольце (2-, 3- или 17-) и другой — в среднем (7- или 11-) гидроксилируются легко и всегда в другое терминальное кольцо независимо от используемого микроорганизма, причем замена кетогруппы на гидроксильную оказывает незначительное влияние на процесс гидроксирования. Четко просматриваемая тенденция к преимущественной атаке определенных положений стероидного ядра (чаще 3-, 7-, 16- или соседние к ним) характерна для всех трех культур (схема 12).

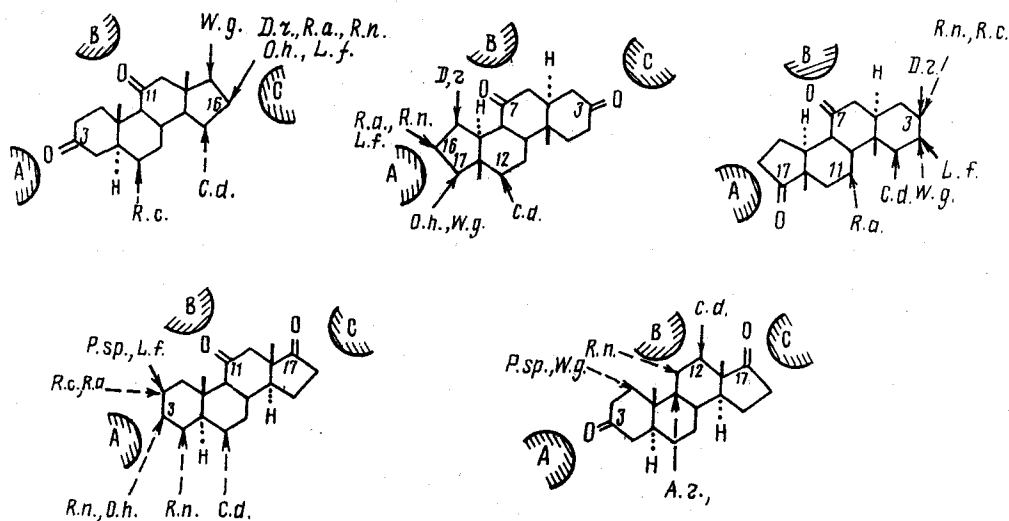
Схема 12



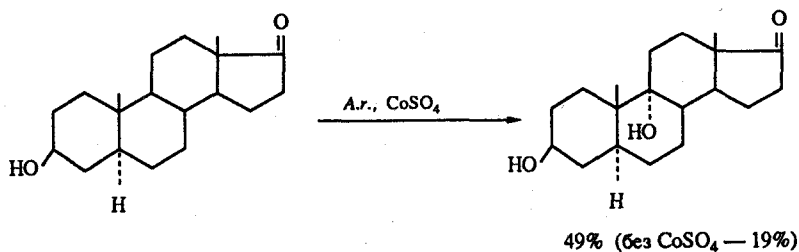


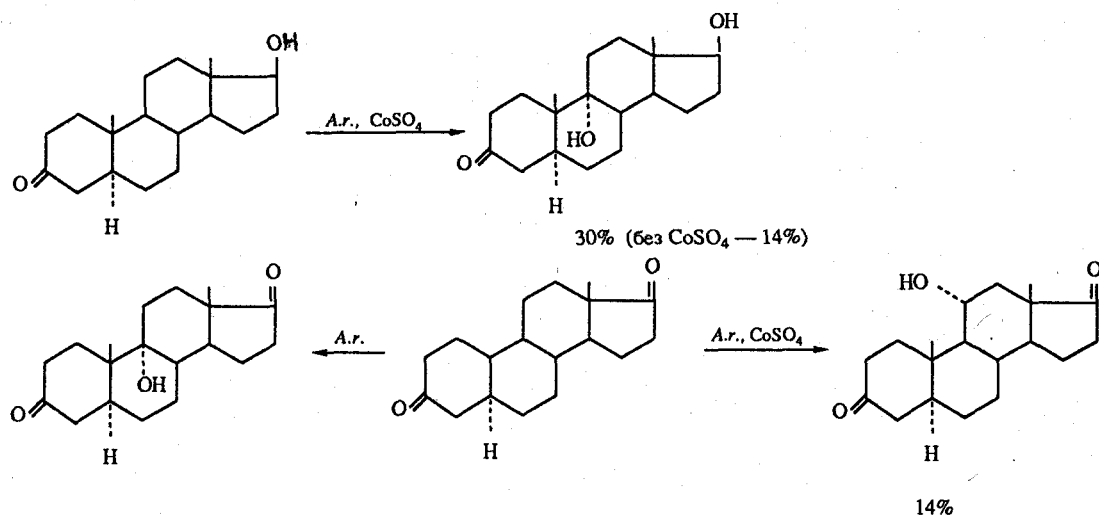
На схеме 13 суммированы обсужденные выше данные по окислению 5 α -андростанов, включенные в табл. 2, 3 (не рассматриваются результаты трансформации грибами не идентифицированными до рода). Эти результаты в большинстве случаев укладываются в рамки модели фермент-субстратной специфичности Джонса—Криндла. Так, при связывании по сайтам А и В или В и С гидроксирование происходит соответственно по сайтам С или А (структуры 3,11-(CO)₂, 3,7-(CO)₂, 7,17-(CO)₂ и 11,17-(CO)₂), а при связывании по сайтам А и С, все грибы, подчеркнем, представители разных классов, вводят аксиальную гидроксигруппу (за исключением *C.d.*), в положения молекулы, ориентированные по сайту В. Одновременно один из связывающих центров может выполнять функцию гидроксирования, и в таком случае образуются дигидроксированные продукты. Если же этого не происходит, то образуются монодигидроксированные продукты, что наблюдается при трансформации дизамещенных андростанов в подавляющем большинстве случаев. Аналогично протекают превращения андростановых субстратов при замене кетогрупп на гидроксильные, а также 3-, 17-моно- и диацеталей, 2 α , 3 α -эпоксидов, но не 2 β , 3 β - и не 16 α , 17 α -, 16 β , 17 β -эпоксидов.

Схема 13



Не поддаются объяснению результаты гидроксирования *A.r.* [33], которая вводит в 3,17-дикетон 11 α -либо 9 α -гидроксигруппу в зависимости от присутствия в среде двухвалентного кобальта. Если субстратами служат 3 β - или 17 β -кетоспирты, то гидроксигруппа вводится в 9 α -положение, независимо от наличия Co. Однако в его отсутствие выход 9 α -гидроксипродуктов в 2 раза ниже. Исключительность этих данных состоит также в том, что соли тяжелых металлов, в том числе Co, полностью ингибируют действие 9 α -гидроксилаз бактериального происхождения [2] (схема 14).

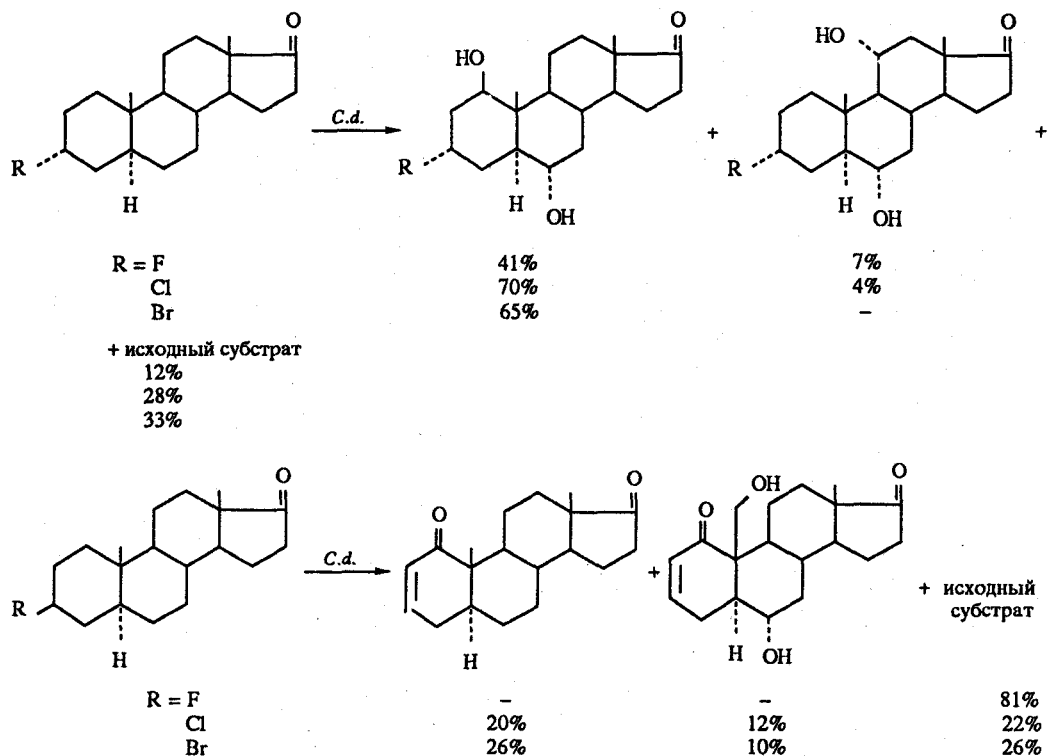




IV. ТРАНСФОРМАЦИЯ ГАЛОГЕНЗАМЕЩЕННЫХ 5α-Н-АНДРОСТАНОВ

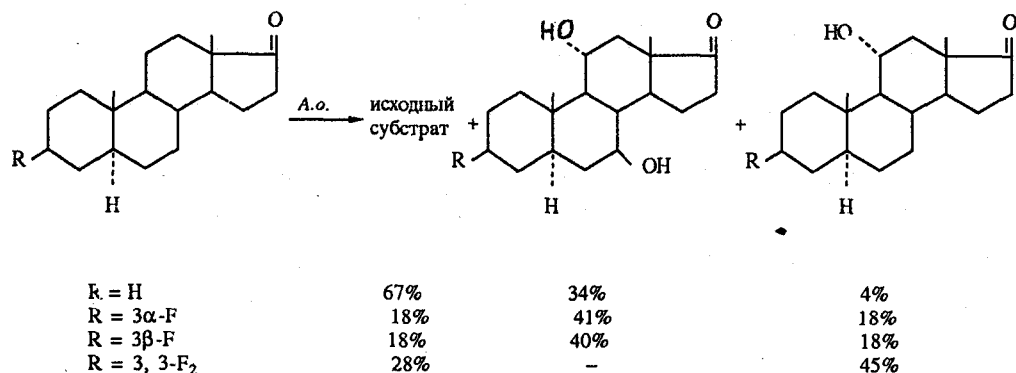
Для выяснения влияния галогензаместителей на процесс гидроксирования 5α-Н-андростанов (3-, 16-, и 17-кето) ряд моно-галоген (3-, 6-, 17-) и гем-дифторзамещенных (6-, 7-, 12-, 16-, 17-) субстратов инкубировали в стандартных условиях с *C.d.*, *R.n* и *A.o.* [34, 36] и результаты сравнивались с полученными для родственных незамещенных 5α-Н-андростанов. Оказалось, что каталитические свойства биокатализатора определяет атом галогена: его природа, положение и конфигурация. Иллюстрацией этому служат результаты гидроксирования 3α- и 3β-галоген-5α-Н-андростанов-17

Схема 15



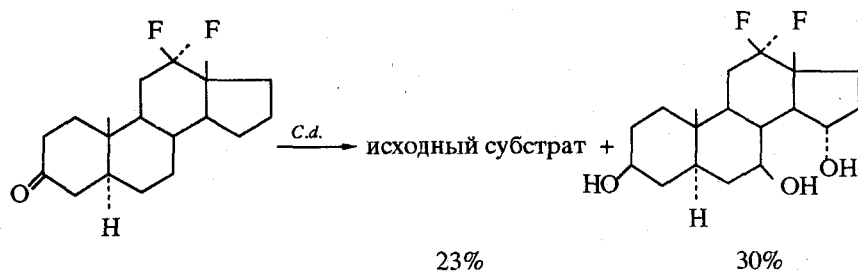
(схема 15). Другой порядок активности галогенированных субстратов обнаружен в случае 17 α -галогенированных 5 α -Н-андростанов-3: здесь хлорзамещенные — неактивны с *C.d.*, фтор — подвержены 12 β , 15 α -дигидроксилированию (как и незамещенные 3-кето-5 α -Н-андростаны, табл. 3). Четкое и весьма полезное различие существует между F-кетонами с одной стороны и Cl, Br-кетонами при гидроксигировании 3- и 17-кетоандростанов *A.o.* Например, 3 α -Cl- и Br-производные не реагируют, тогда как 3 α -F-кетон эффективно гидроксигируется этой культурой в положение 11 α . Весьма существенный вывод, сделанный при исследовании широкого набора фторированных 5 α -андростанов, состоит в том, что атом фтора, удаленный от специфичного для каждого 5 α -андростанона (и микроорганизма) центра атаки, облегчает процесс гидроксигирования, не меняя его направления. Четко это прослеживается на 11 α -гидроксигирующей культуре *A.o.*, которая в отличие от *C.d.* и *R.n.* проявляет низкую субстратную специфичность. Представленные на схеме 16 результаты демонстрируют не только явно выраженное индуцирование процесса гидроксигирования 3-F-заместителем, но и возможность направленного 11 α -гидроксигирования 17-кето-5 α -андростанов этой культурой (сравни с табл. 3).

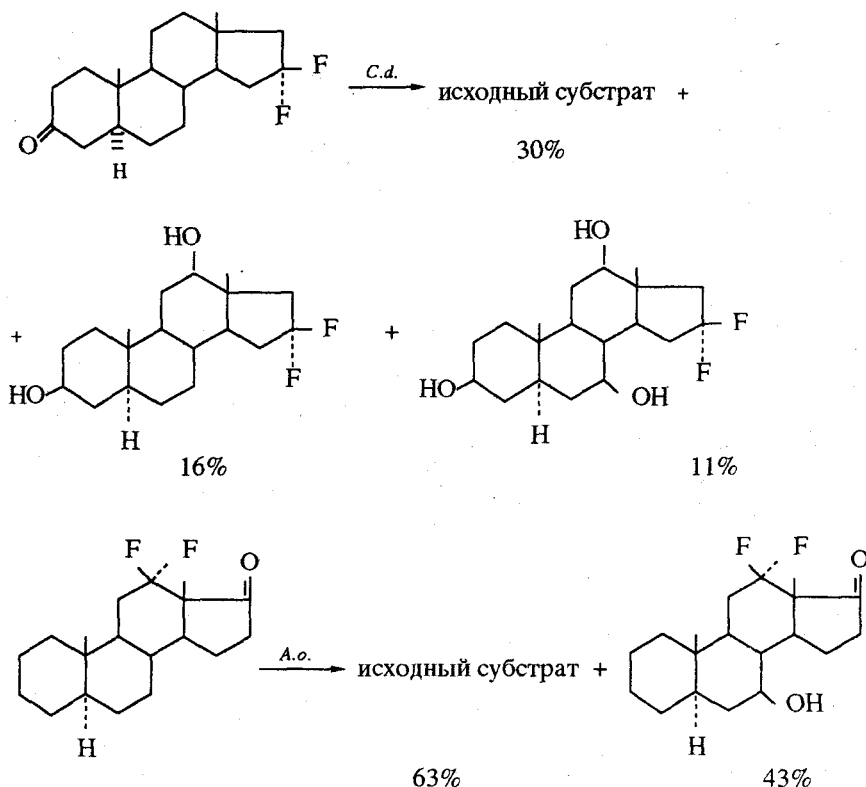
Схема 16



Напротив, атом хлора, близлежащий к стандартным точкам атаки, как правило, блокирует процесс гидроксигирования в эти стандартные или соседние положения или же направляет его по «альтернативному» пути. Например, свойственное 3-кето-5 α -Н-андростанам 12 β , 15 α -дигидроксилирование культурой *C.d.* не обнаружено в реакциях с 12,12-дифтор- и 16,16-дифтор-3-кетонами, где главными направлениями атаки являются соответственно 7 β , 15 α - и 7 β , 12 β -атомы. Показательным примером такого смещения центра атаки является результат гидроксигирования 12,12-дифтор-17-кетоандростанов в 7 β -гидроксипроизводное. Этот результат особенно поразителен в том плане, что для осуществления 6 β - или 7 α -гидроксигирования этим ферментом необходимо наличие 11 α -оксигруппы, а моногидроксигирование всегда протекает только в 11 α -положение [76] (схема 17).

Схема 17





V. ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ 5 α -Н-D-ГОМОАНДРОСТАНОВ

С целью выявления дополнительных факторов, определяющих фермент-субстратное взаимодействие, группы исследователей Венесуэлы и Великобритании [89—96] провели анализ влияния *A*- и *D*-гомологизации в ряду 5 α -Н-андростанов на процесс гидроксилирования тремя культурами — *A. o.*, *R. n.* [80, 81] и *C. el.* Сравнение полученных данных с результатами трансформации аналогично замещенных 5 α -Н-андростанов позволило заключить, что, во-первых, и на *D*-гомостероидах культура *A. o.* проявляет узкую сайт-специфичность, гидроксилируя их только в 11 α -положение (табл. 4). Во-вторых, соединения этого ряда не индуцируют синтез второй гидроксилазы, что дополнительно подтверждается отсутствием гидроксилирования 3,11-дихлорзамещенных *D*-гомо-5 α -андростанов. Следует заметить, что эти же соединения не гидроксилируются и культурой *R. n.*, что говорит в пользу высказанного ранее предположения о том, что в клетках *R. n.* могут также функционировать две гидроксилазы, но не столь специфичные, как у *A. o.* В основном же результаты гидроксилирования *D*-гомо-5 α -андростанов *R. n.*, по мнению авторов [80, 81], хорошо укладываются в рамки механизма Джонса, с позиций которого могут быть объяснимы почти все полученные данные. В этом ряду редко наблюдается нормальный способ гидроксилирования и практически все изученные субстраты гидроксилируются альтернативным способом, причем реакции в большей степени сопровождаются восстановлением кетогруппы. Исключение составляет *D*-гомо-5 α -Н-андростан-3,17-дион, гидроксилирующийся до некоторой степени нормальным способом в 11 α -положение. Но как только 3-кетогруппа восстанавливается до 3 β -гидроксигруппы, благоприятно ориентированной для связывания альтернативным способом, процесс

Таблица 4

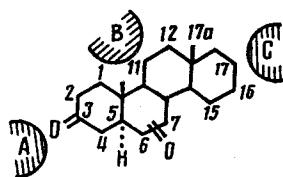
Гидрокселирование D-гомо-5 α -H-андростанов различными культурами

Заместители	Культура	Исходное, %	Главные направления	Выход, % ^a	Побочные направления	Выход, % ^a	Ссылки
2,17a-(CO) ₂	R.n.	14	6 α и 7 α	20	2-CO \rightarrow 2 α -OH	14	[81]
3,6-(CO) ₂	R.n.	47	17 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	17	3-CO \rightarrow 3 α -OH	6	[81]
3,7-(CO) ₂	R.n.	7	17 α	31	—	—	[81]
3,17-(CO) ₂	R.n.	—	7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH) 11 α (3-CO \rightarrow 3 α -OH)	20 29	3-CO \rightarrow 3 α -OH	45	[81]
3,17a-(CO) ₂	R.n.	35	—	—	3-CO \rightarrow 3 α -OH	19	[81]
11 α -OH, 3-CO	R.n.	39	—	—	3-CO \rightarrow 3 β -OH	11	[81]
3 β -OH, 17a-CO	R.n.	0	7 β (17-CO \rightarrow 17 α -OH)	18	17-CO \rightarrow 17 α -OH	19	[81]
7 β -OH, 17a-CO	R.n.	50	7 β	47	17a-CO \rightarrow 17 α -OH	10	[81]
3 α -OH, 17a-CO	R.n.	50	7 продуктов				[81]
6-CO	A.o.	90			7 β -OH \rightarrow 7-CO	21	[80]
2,17a-(CO) ₂	A.o.	61	11 α	65	—		[80]
3,6-(CO) ₂	A.o.	50	11 α	29	—		[80]
3,7-(CO) ₂	A.o.	24	11 α	20	—		[80]
3,11-(CO) ₂	R.n., A.o.	10	Не выделены				[80]
3,17-(CO) ₂	A.o.	24	11 α	79	—		[80]
3,17a-(CO) ₂	A.o.	0	11 α	73	—		[80]
11 α -OH, 3-CO	A.o.	85	Не выделены				[80]
3 β -OH, 17a-CO	A.o.	38	11 α	46	3 β -OH \rightarrow 3-CO	41	[80]
3 β -OAc, 17a-CO	A.o.	—	11 α	—			[94, 95]
3 α -OH, 17a-CO	A.o.	33	11 α	48	—		[80]

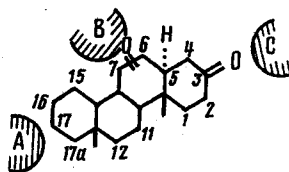
3,17-(CO) ₂	C.el.	-	7α, 9α	35	7α	2	[94, 95]
			9α, 14α	20	3-CO → 3β-OH		
3,17a-(CO) ₂	C.el.	-	7α, 14α	33,5	7α	2	[94, 95]
					1β, 3β, 7-CO	1,5	
					1β, 7α	3,2	
					1β, 7β	1,2	
3β-OAc, 17-CO	C.el.	-	9α, 14α	36	-	-	[95]
3β-OAc, 17a-CO	C.el.	-	7β(3β-OAc → 3β-OH)	29	1β, 7-CO	4	
			7α(3β-OAc → 3β-OH)	9	1β, 6β	4	
					7-CO	0,6	
3β-OH, 17a-CO	C.el.	-	1β, 7-CO	4	-	-	[95]
			1β, 7β	4	-	-	
			1β, 7α	10	-	-	
17-CO	C.d.	-	6α, 17α	10	-	-	[19]
			7β, 12β, 15α	11	-	-	
			1β, 7β, 15α	6	-	-	
17aβ-OH, 17aα-Me-	C.el.	-	11β	2	11β(3-CO → 3β-OH)	8	[117]
3,17-(CO) ₂			6α	4	6α(3-CO → 3β-OH)	3	

начинает протекать именно в этом направлении с образованием 7β -гидроксипроизводных. Напротив, 3,17а-*D*-гомокотон (табл. 4) не гидроксилируется даже альтернативным способом вследствие того, что первоначально образующееся его 3α -гидроксипроизводное, имея неблагоприятную для связывания по сайту С ориентацию гидроксильной группы, гидроксилируется с образованием многокомпонентной смеси неидентифицированных продуктов. Вероятно, этот последний результат дает основание для общего вывода о гидроксировании стероидов: если структура субстрата не способствует хорошему связыванию с ферментом, то оно осуществляется с различным образом ориентированными молекулами, приводя к неоднородному процессу гидроксирования или восстановлению кетогрупп.

В отличие от 5α -андростанов, 3,6- и 3,7-дикетоны которых гидроксилируются *R.n.* в 16α - и 16β -положения, соответствующие *D*-гомоаналоги образуют 17α -гидроксипродукты [81]. Авторы полагают, что указанные *D*-гомостероиды гидроксилируются альтернативным способом по сайту А, следствием этого же пути гидроксирования является образование 16α -гидрокси- 5α -андростан-3,6-диона, тогда как 16β -эпимер образуется нормальным способом трансформацией по сайту С, если, конечно, в процессе не принимают участие «скрученные» формы молекул (схема 18).



нормальный

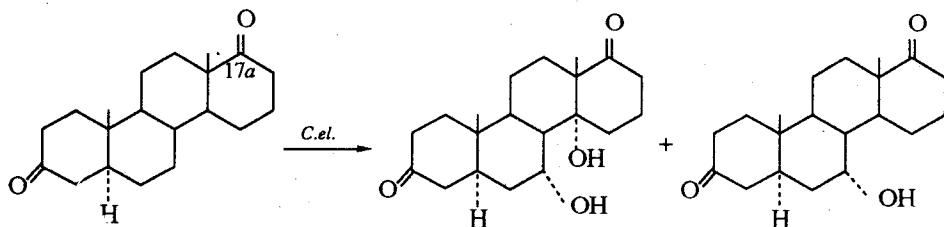


альтернативный

К сожалению, отсутствуют столь же систематизированные исследования гидроксирования *D*-гомо 5α -Н-андростанов другими культурами. Хотелось бы, однако, отметить различное поведение дигидроксидирующей культуры *C.d.* по отношению к 5α -Н-андростанону-17 (табл. 3) и его *D*-гомоаналогу (табл. 4): 1β , 6α -дигидроксирование в первом случае и преимущественно тригидроксирование (7β , 12β , 15α и 1β , 7β , 15α) — во втором.

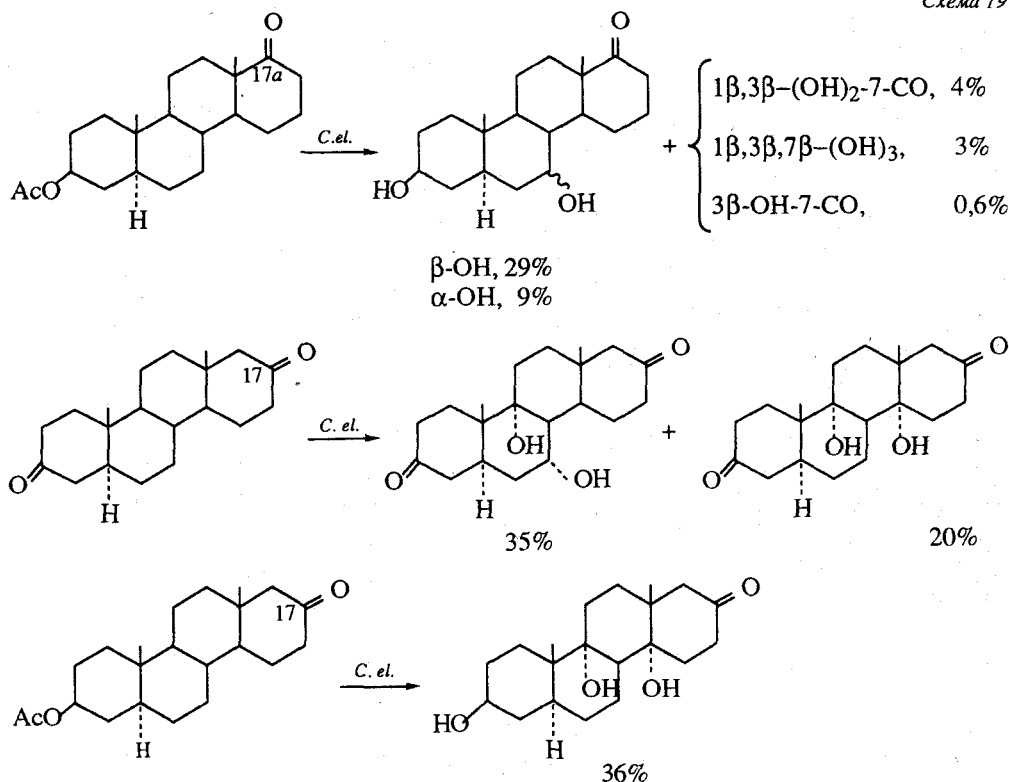
Имеющиеся, хотя и немногочисленные, результаты гидроксирования двух пар 3,17-дискислородзамещенных *D*-гомо- 5α -Н-андростанов культурой *C.el.* (табл. 4) в сравнении с данными окисления этой культурой соответствующих аналогов 5α -Н-андростана (табл. 2) также могут быть интерпретированы в рамках упомянутой выше модели гидроксирования. Обращает внимание поразительное различие, особенно заметное в ряду 17а-*D*-гомокетонов, в направлении гидроксирования *D*-гомо- 5α -Н-андростан-17(или 17а)-онов при замене 3-кетогруппы на 3β -ацетатную, гидролизующуюся в процессе реакции (табл. 4, схема 19). Приведенные ниже данные

Схема 19



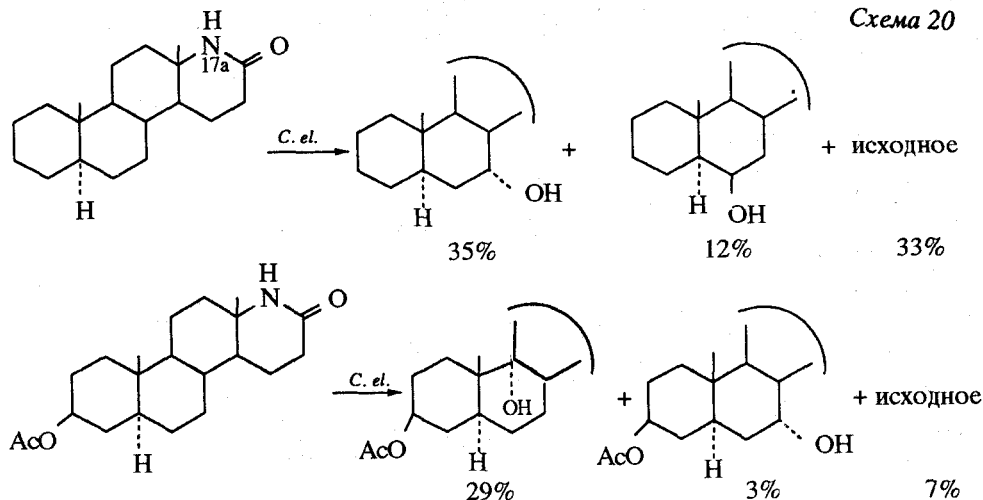
33,5%

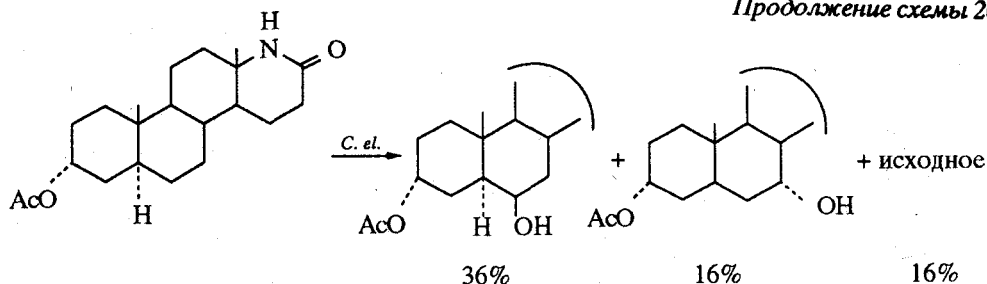
2,2%



убедительно показывают также существенную зависимость направления гидроксирования от положения кетогруппы в кольце *D*. Так, если главным продуктом инкубации 3β -ацетокси- 17α -*D*-гомкетона является 7β -гидроксипроизводное, то трансформация его 17-кетогомкетона дает преимущественно $9\alpha,14\alpha$ -дигидроксипроизводное. Отметим, что введение атома азота в положение 17α *D*-гомо- 5α -Н-андростанона-17, вероятно, ингибирует процесс 14α -гидроксирования этой культурой. Так, для 3β -ацетокси- 17α -аза-*D*-гомо- 5α -Н-андростанона-17 (схема 20), в отличие от его карбоаналога (схема 19), наблюдается только моногидроксирование, преимущественно в 9α -положение [90, 92]. На примере трансформации 17α -аза- 5α -Н-андростанов культурой *C. el.* четко прослеживается влияние замещения при С(3) на

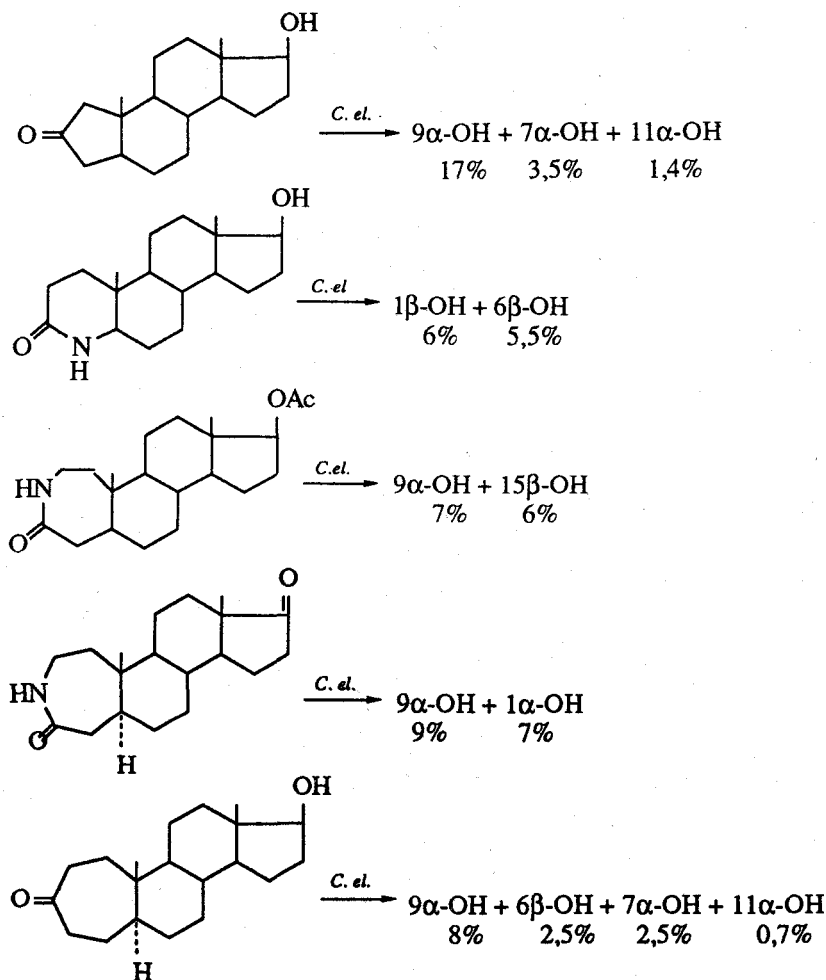
Схема 20





направление гидроксирования. Изменение структуры кольца А 5 α -Н-андростанов вносит не менее существенные изменения в направление гидроксирования этой структурой. В серии работ Краба с соавт. [86—96] исследовано влияние колец А и D на гидроксирование культурой *C. el.* Анализ этих данных не позволил выявить определенных корреляций. Можно лишь отметить, что А-нор-, А-гомо- и аза-А-гомо-5 α -Н-андростаны, независимо от замещения в кольце D (CO- или OH-группа), проявляя склонность к моногидроксированию (преимущественно в 9 α -положение), тем не менее трансформируются с низкой степенью конверсии (схема 21). В отличие от *C. el.* культура *A. o.* гидроксорирует А-гомо-3,17-дикетон в типичное для нее положение, образуя 11 α -гидроксипродукт с выходом 58% [93].

Схема 21



Практическая направленность использования 5 α -Н-прегнанов в синтезе кортикостероидов, вероятно, определила выбор гидроксилирующих микроорганизмов и субстратов, набор которых в сравнении с 5 α -Н-андростанами весьма ограничен. В ряду 5 α -Н-прегнанов исследованы культуры, известные своей способностью к гидроксилированию Δ^4 -3-кетостероидов в положения: 11 β -(*Curvularia*, *Cunninghamella*, *Tieghemella*), 11 α -(*Rhizopus*, *Aspergillus*), 12 β -(*Calonectria decora*) [2, 6—11]. Из 5 α -Н-прегнанов получены также 9 α -гидроксипроизводные [118—122], но этот тип трансформации целесообразно рассмотреть изолированно, поскольку он осуществляется бактериями и в отличие от гидроксилирования грибами, протекает как стадия микробиологического расщепления стероидной молекулы после введения Δ^4 -3-кетогруппировки [2, 6—9].

Введение гидроксильной функции в положения C(9), C(11 α) и C(12) обеспечивает их дальнейшее превращение в 11 β -гидроксипроизводные химическими методами. Из тех же практических соображений в качестве субстратов изучены в основном 3 β -гидроксиды и чаще 3-кето-5 α -Н-прегнаны. Исследования, выполненные на соединениях этого ряда, не носят столь фундаментального характера, как на 5 α -Н-андростанах, и полученные результаты, суммированные в табл. 5, не дают возможности выявления строгой корреляции во взаимодействии фермента с субстратом. Однако несколько систематических исследований субстратной специфичности ряда культур представляют несомненный интерес.

Продолжая работы по исследованию фермент-субстратного взаимодействия, Джонс с соавт. [35] перенесли их на соединения прегнанового ряда, безусловно допуская, что при наличии вращательной способности боковой цепи в модель, построенную на данных андростанового ряда, могут быть внесены определенные коррективы. Они исследовали набор микроорганизмов наиболее эффективных при трансформации 5 α -Н-андростанов: *A.o.*, три вида *Rhizopus*, *C.d.*, *D.g.* [35]. К сожалению, не располагая столь вариabельным набором субстратов, как в андростановом ряду, авторы вынуждены были ограничиться 3-, 7- и 11-кислородзамещенными 20-кето-5 α -Н-прегнанами (табл. 5). Из-за отсутствия количественных данных по трансформации замещенных 20-кетопрегнанов культурой *A.o.* возможен лишь качественный анализ результатов. 5 α -Н-Прегнан практически не трансформируется *A.o.*, или же образуется сложная смесь неидентифицированных продуктов. При инкубации с 3,20-дикетопреганом трансформация протекает по обычному для этого микроорганизма пути с образованием 11 α -гидроксипродукта. Однако при инкубации с 3 β -оксианалогом после введения 11 α -гидроксигруппы наблюдается нетипичное для *A.o.* гидроксилирование в 1 β -положение. При длительной инкубации (6 суток) 3 β -гидроксид-5 α -Н-прегнан-20-он дает смесь 1 β , 11 α -ди и 11 α -моногодгидроксипроизводных, причем дигидроксипродукт образуется не синхронно, а последовательно через 11 α -моногодгидроксипродукт (табл. 5). Отмечено [25], что 1 β , 11 α -дигидроксилирование характерно для 16 β -Me-, Δ^{16} - и 16 α , 17 α -эпоксианалогов 3 β -гидроксид-5 α -Н-прегнан-20-она, но не наблюдается в случае их 17 α -гидроксид- и 16-Me- Δ^{16} -производных. Поведение 2,20- и 3,20-дикетонов [25] 5 α -Н-прегнана резко контрастирует с поведением 3 β -гидроксианалогов, давая исключительно продукты 11 α -моногодгидроксилирования. Следует заметить при этом, что соответствующие Δ^4 -3-кетопреган-аналоги количественно превращаются в 6 β , 11 α -дигидроксипроизводные.

Любопытный результат получен гидроксилированием стероидных алкалоидов фунтумидина (3 α -NH $_2$) и фунтумина (3 α -NH $_2$, 20 α -OH), гидроксилирующихся *A.o.* в 12 β - и 11 α -положения [98]. Из результатов следует, что природа и стереохимия замещения при C(3) весьма существенно влияют на процесс гидроксилирования 5 α -Н-прегнанов микроорганизмом *A.o.*

Микроорганизм *C.d.* дигидроксилирует 3-кето- и 3 β -гидроксид-20-кето-5 α -Н-преганом в 12 β , 15 α -положения, при блокировании C(12) атома 11 α -гидроксильной группы атака направляется исключительно по C(15) и в этом проявляется сходство этой

Гидроксилирование замещенных 5 α -Н-прегнан-20-онов плесневыми грибами

Заместитель	Микро- орга- низм	Исход- ное, %	Основное направление	Выход, %	Побочное направление	Выход, % ^a	Ссылки
-	L.f.	19	Не выделен	-			[37]
-	A.o.	91	Не трансформируется	-			[25]
2-CO	A.o.	0	11 α	50	-	-	[25]
3-CO	A.o.	28	11 α	38	11 α , 17 β	9	[25]
3-CO	C.d.	-	12 β , 15 α	40	-	-	[100, 102]
3-CO	D.r.	0	7 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4	3-CO \rightarrow 3 β -OH	5	[35]
			7 β (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	5			
3-CO	R.a.	14	11 α	12	7 β , 11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	7	[35]
3-CO	R.c.	7	11 α	9	11 α , 17-CO(3-CO \rightarrow 3 β -OH)	4	[35]
			11 α , 17 β	4	-	-	
			11 α , 17-CO	7	11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	3	
3-CO	A.t.	17	11 β	10		5	[4]
3-CO	S.e.	-	11 α	-			[63]
3-CO	C.sp.	-	9 α	-			[67]
3-CO	R.n.	25	11 α	22	7 β , 11 α (3-CO \rightarrow 3-OH)	7	[35]
					11 α (3-CO \rightarrow 3 β -OH)	5	
3-CO	R.n.	60	11 α	40	3-CO \rightarrow 3 β -OH	3	
7-CO	C.d.	45*	12 β	18			[112]
7-CO	C.d.	10**	1 α , 12 β	33	1-CO, 12 β	21	[35]
7-CO	D.r.	30	3 β (7-CO \rightarrow 7 α -OH)	13	3 β (7-CO) \rightarrow 7 β -OH)	3	[35]
7-CO	R.n.	21	3 α , 11 α	10			[35]
			3 β , 11 α	14			[35]
			4 α , 11 α	12			

3-CO-11 α -OH	C.d.	—	15 α	—		[100]
11-CO	D.r.	10	3 β	35		[35]
11-CO	R.n.	57	Не выделено			[35]
11-CO	C.d.	58	Не выделено			[35]
3 β -OH	R.n.	12*	7 β	15	7 β , 12 β	12 [35]
					11 α	7
3 β -OH	R.n.	10**	7 β , 12	22	7 β , 11 α	10 [35]
					7 β	8
					11 α	5
3 β -OH	R.a.	14	11 α , 7-CO	16	7 β	11 [54]
3 β -OH	R.c.	5	7 β	11	11 α	4 [35]
3 β -OH	A.o.	3	1 β , 11 α	57	1 β , 11 α (3 β -OH \rightarrow 3-CO)	8 [17, 25]
3 β -OH	A.n.	—	1 β , 11 α	—		[38]
3 β -OH	D.r.	17	7 α	9		[35]
7 α -OH	C.d.	26	12 β	17		[35]
7 α -OH	D.r.	9	3 β	27		[35]
7 α -OH	R.n.,	53	3 β	24		[35]
11 α -OH	R.n.,	58	Не выделено			[35]
	C.d.					
11 α -OH	D.r.	10	3 β	35		[35]
11 β -OH	C.d.,	64—71	Не выделено			[35]
	D.r.,					
	R.n.					
3 β -OH- Δ ¹⁶	C.d.	21	Не выделено			[35]
3 β -OH- Δ ¹⁶	D.r.	8	14 α , 15 β	21		[35]
3 β -OH- Δ ¹⁶	R.n.	16	7 α , 15 α	12		[35]
			7 α	13		
3 β -OH-11-CO	P.f.	—	7-CO, 15 β	12		[64]

Заместитель	Микро- орга- низм	Исход- ное, %	Основное направление	Выход, %	Побочное направление	Выход, %	Ссылки
3β-11β-(OH) ₂	D.v.	—	16α	—			[64]
3β, 21-(OH) ₂	R.a.	—	7β	—			[69]
3β-OH-5, 6α-O	C.I.	—	11β	24—45			[105, 106]
3β, 21-(OH) ₂ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	16			[105]
3β-OH-21-OAc-5, 6α-O	C.I.	—	11β	50			[105, 106]
3β, 17β-(OH) ₂ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	20			[105]
3β, 17α, 21-(OH) ₃ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	16			[105]
3β, 17α-(OH) ₂ -21-OAc-5, 6-O	C.I.	—	11β	28			[105]
3β, 17α, 20α-(OH) ₃ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	33			[105]
3β, 20β-(OH) ₂ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	52			[105]
3β-OH-16α-Me-5, 6α-O	C.I.	—	11β	45			[106]
3β, 20α-(OH) ₂ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	8			[105]
3β, 20β, 21-(OH) ₃ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	10			[105]
3β-OH-21-OAc-16α-Me-5, 6α-O	C.I.	—	11β	55			[105]
3β-OAc-21-OAc-16α-Me-5, 6α-O	C.I.	—	11β	36			[105]
3β, 21-(OH) ₂ -5, 6α-O-17α, 20-O	C.I.	—	11β	28			[105]
3β-OH-5, 6α-O-16, 7α-O	C.I.	—	11β	45			[105, 106]
3β, 17β-(OH) ₂ -5, 6α-O	C.I.	—	11β	31—45			[105, 106]
3β-OH-16, 17α-O	A.o.	—	1β, 11α				[38]

3 β , 21-(OH) ₂ -5 α -Br-6 β -F-16 α -Me	C.l.	-	11 β	45	3 β -OH-5 α -Br-6 α -F- Δ^4 -3-кето-6 α -F	[68]
3 α -NH ₂	A.o.	-	12 β	6,7	11 α	8,5 [98]
3-CO-11 α -OH	C.d.	-	15 α	60		[100, 102]
3-CO-16, 17 α -O	R.n.	-	11 α	60		[111]
3-CO-21-OH-16 β -Alk	Gl.c.	-	11 α	-		[58]
3-CO-21-OH-16 α -тр.Bu	Ph.sp.	-	11 β	-		[60]
			11 α	-		
3-CO-17 α , 21-(OH) ₂	C.l.	-	11 β , 14 α	50—53		[107]
3-CO-17 α , 21-(OH) ₂	C.bl.	-	11 α	70—75		[107]
3-CO-17 α , 21-(OH) ₂	T.o.	-	11 α	40—45	11 β	5 [107]
3-CO-16 α , 17 α -21-(OH) ₃	C.l.	-	11 β	38—42		[107]
»	T.o.	-	11 α	30	11 β	5 [107]
»	C.bl.	-	11 α	60—65	11 β	5 [107]
3-CO-21-OH-16, 17 α -O ₂ CMe ₂	C.l.	-	11 β	10—12		[107]
»	T.o.	-	11 β	40—45	11 α -OH	5—8 [107]
»	C.bl.	-	11 α	30—35		[107]
			11 β	10—12	11-CO	5

Обозначения: инкубация стероида, растворенного в EtOH * — 1 сут,

** — 6 сут,

+ — 2 сут,

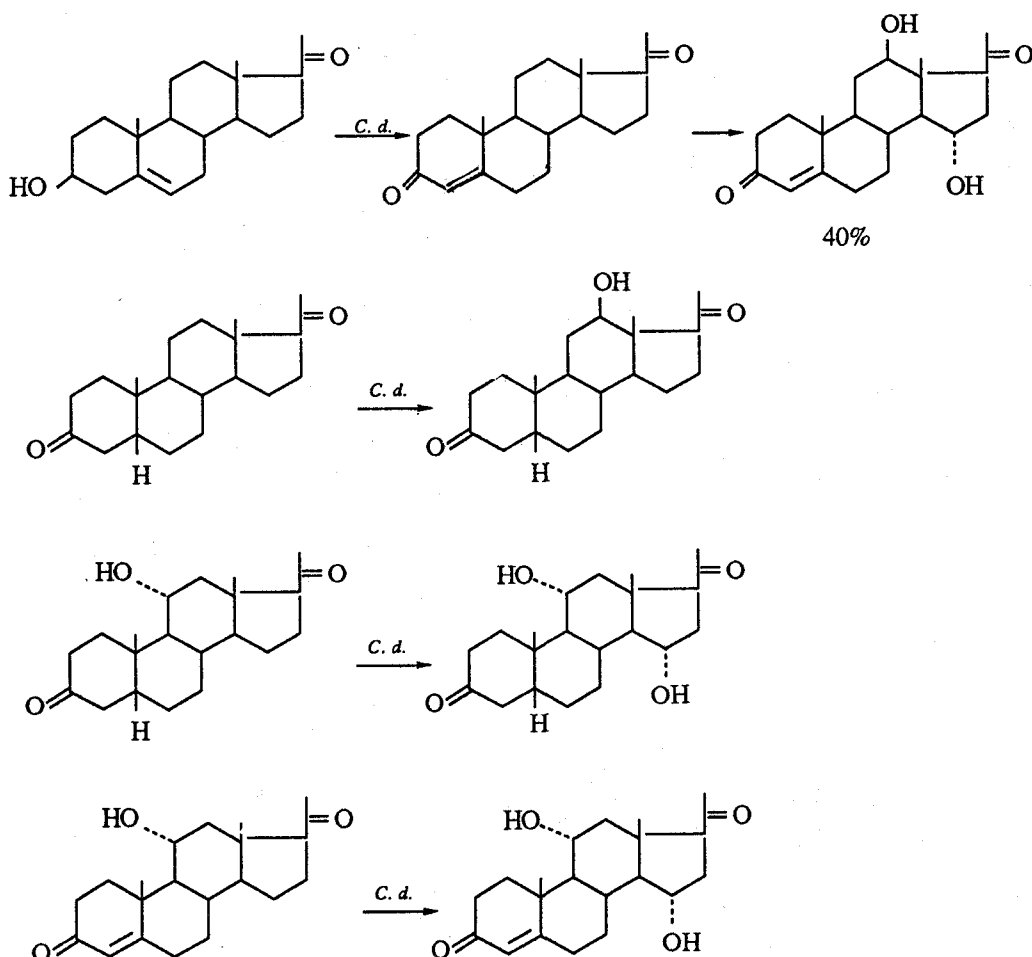
++ — 4 сут.

культуры с ее поведением в 5α -Н-андростановом ряду. Устойчивость этого направления гидроксилирования наблюдается для различных субстратов прегнанового ряда, независимо от наличия или отсутствия Δ^4 -, Δ^5 -двойной связи и даже сочленения колец A, B [100, 102]. Обращает внимание отраженное на схеме 22 свойство культуры *C.d.* одновременно с гидроксилированием изомеризовать 3-окси- Δ^5 -аналоги в Δ^4 -3-кетопроизводные.

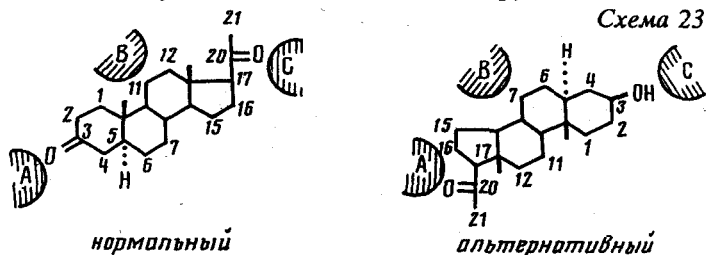
Удивительной особенностью *C.d.*, является обнаруженное несвойственное ей 11α -гидроксилирование 3α , 6α -дигидроксизамещенных, проявившееся только в 5β -Н-прегнановом ряду [101]. Более ранние данные о 15β -гидроксилировании культурой *C.d.* [103] следует считать ошибочными.

Три вида муковых грибов *Rhizopus*: *R.a.*, *R.c.*, *R.n.* изучены в отношении гидроксилирования 5α -Н-прегнанов. Различия между этими культурами подобны, но менее ощутимы по сравнению с теми, которые наблюдались с 5α -Н-андростанами [23, 24], тенденция к деградации боковой цепи наблюдается в трансформации с *R.n.* Анализ результатов, представленных в табл. 5, указывает на отчетливо проявляющуюся склонность этого микроорганизма к преимущественному 11α -гидроксилированию 3-кетон α ов 5α -прегнана и 7β -гидроксилированию 3β -гидроксид- 5α -Н-прегнанов; некоторое отклонение наблюдается только для 3β -гидроксид- Δ^{16} -аналога, атакуемого

Схема 22



гидроксилазой, не только по C(7) (с α -области), но и в аллильное 15-положение. Нетипично для *R.l.* гидроксирование в 12 β -положение при инкубации с 3 β -гидроксипрегнанолоном [35]. Мюррей и Петерсон [55] в более раннем патенте указывают, что *R.l.* гидроксигирует это соединение, так же как 3,20-дикетоаналог — в 11 α -положение. Общее сходство дифференцированного поведения 3-кето- и 3 β -гидроксипроизводных 5 α -Н-прегнанов и 5 α -Н-андростанов-17 (или-16) указывает, вероятно, на возможность применения модели фермент-субстратного взаимодействия в 5 α -Н-прегнановом ряду, естественно с учетом стереохимических возможностей боковой цепи и условий связывания 20-кетогруппы (схема 23).



В отличие от 5 α -андростанов, которые гидроксигируются в 9 α -положение культурами *C.el.*, *D.c.*, *A.g.*, *W.g.*, *R.a.* (см. табл. 2, 4), только штамм *Circinella sp.* вводит 9 α -гидроксигруппу в 5 α -Н-прегнаны [67], это свойство проявляется также и на Δ^4 -3-кетопрегнана [123].

Серия представленных в табл. 5 данных трансформаций в 11 α -положение 3 β -гидроксид-5 α , 6 α -дизамещенных прегнанов микроорганизмом *C.l.* в контексте с предыдущим, показывает, что при блокировании гидроксигирования по C(7) (5,6 α -эпоксид- или 6 β -F) реакция осуществляется исключительно по атому C(11). Эти же результаты подвергают сомнению официально бытующее мнение о невозможности гидроксигирования 3 β -гидроксид-ненасыщенных в кольце А прегнанов.

Все представленные в табл. 5 результаты трансформации 5,6 α -эпоксидов *C.l.* приведены из данных, полученных при кратковременной инкубации в расчете на максимальный выход целевого продукта — 11 β -гидроксид-5,6 α -эпоксид-5-прегнанов. Последующие исследования показали, что эта реакция идет с параллельным образованием 14 α -гидроксидпроизводных [104], а длительная инкубация приводит к гамме продуктов [105], в которых направление гидроксигирования уже определяется имеющимися в молекуле 11 β - и 11 α -гидроксигруппами и 11-кетогруппой, непременно образующейся последующим окислением 11 β -гидроксигруппы [2, 6].

Так например, на схеме 24 представлена смесь продуктов, полученная при трансформации 3 β -гидроксид-5,6 α -эпоксид-5-прегнан-20-она *C.l.* в течение 36 ч, в которой образование 7 α -гидроксид- и 17 α -гидроксидпроизводных, по мнению авторов, можно считать следствием направляющего эффекта первично введенных в молекулу 14 α -оксид и 11-кетогрупп [105], а образование 11,14 α -дизамещенных — следствием взаимного влияния этих групп. Еще на одном примере покажем, что время трансформации — весьма существенный параметр в реакциях этого типа [105]. И здесь авторы полагают, что образование конечного продукта окисления — 11-кето-15 β -гидроксидпроизводного происходит в результате последующего окисления обоих минорных продуктов (схема 25).

Замещенные в кольце D хорошо трансформирует *C.bl.* (17 α -гидроксид-, 16 α , 17 α -дигидроксид-, 16 α , 17 α -диоксидизопропилиден-) 3,20-дикето-5 α -прегнаны преимущественно в 11 α -положение, причем наличие в α -области стероидной молекулы 16 α -кислородсодержащего заместителя стимулирует конкурентное 11 β -гидроксигирование (табл. 5). Аналогично проявляет себя и культура *T.o.*, однако в этом случае 16 α , 17 α -ацетонидная группа блокирует практически полностью 11 α -гидроксигирование, способствуя процессу 11 β -гидроксигирования (схема 26).

Показанные на схеме 27 все три вида субстрата гидроксигируются *C.l.* в 11 β -

Схема 24

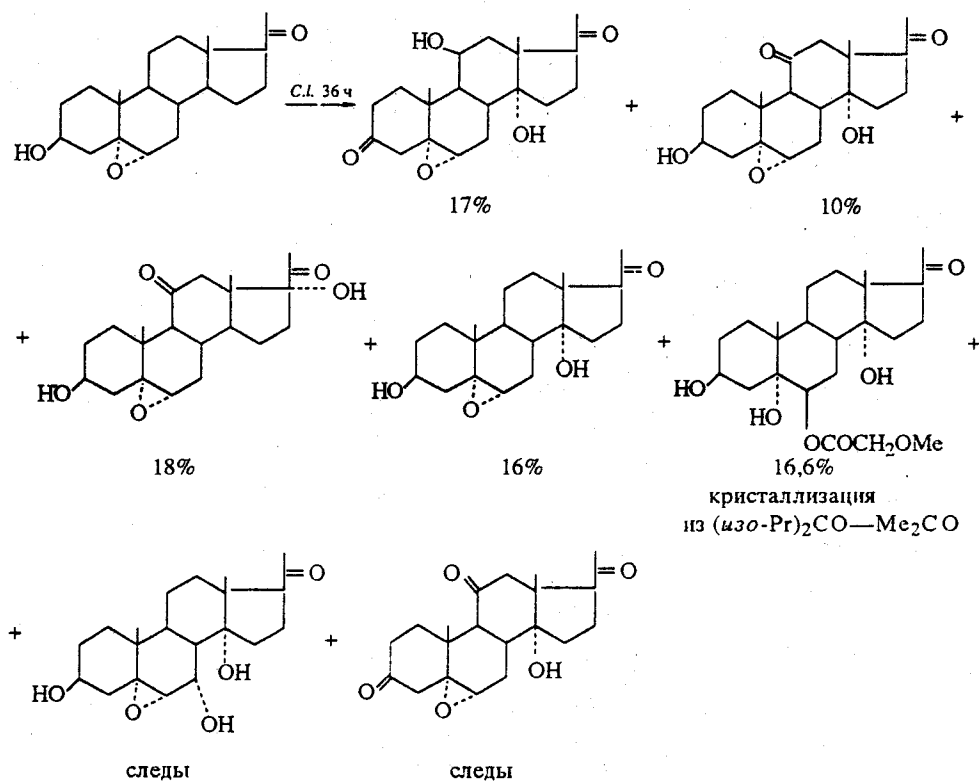
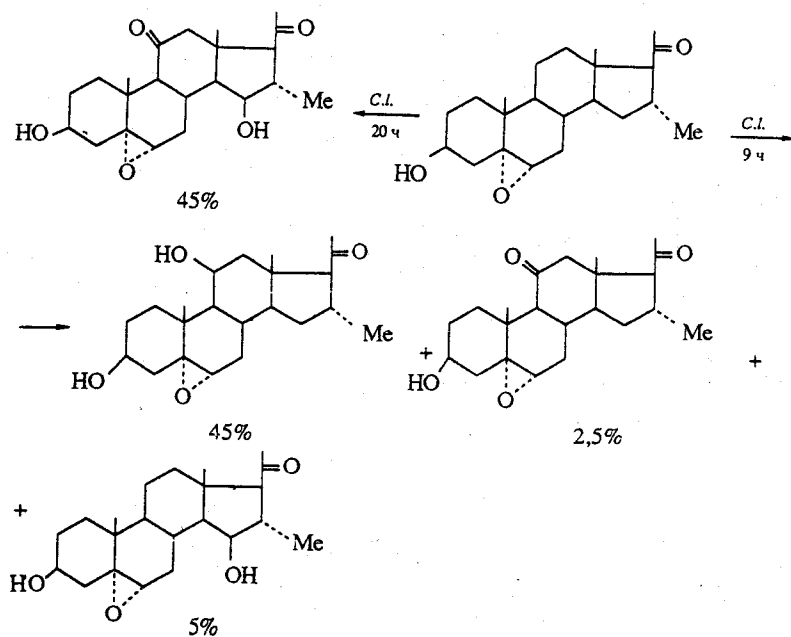


Схема 25



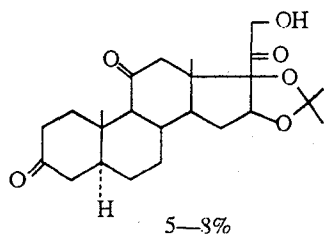
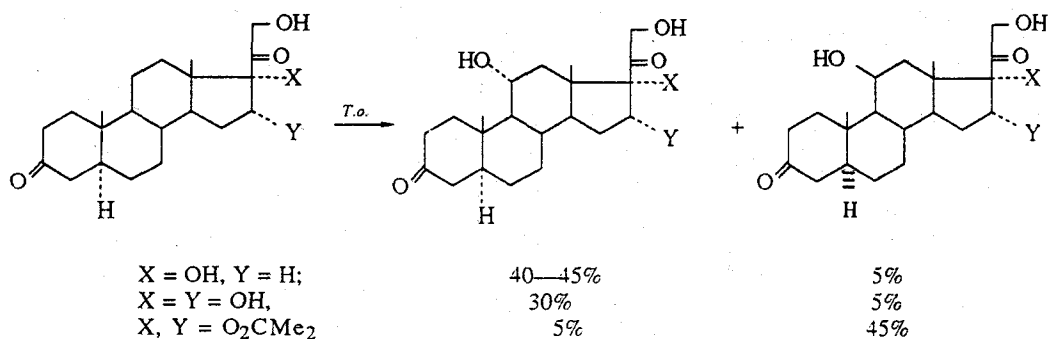
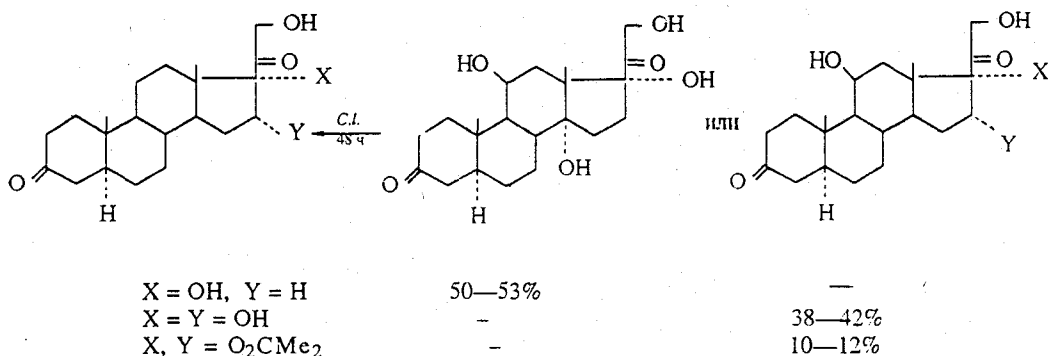


Схема 27



положение, а в случае 16-незамещенного соединения ($X = OH, Y = H$) наблюдается и последующее 14 α -гидроксилирование, вероятно ингибируемое в двух остальных случаях кислородным атомом при C(16). Анализ методом ТСХ реакционной смеси через 24 ч инкубации 17 α , 21-дигидрокси-5 α -прегнан-3,20-диона показывает наличие 3—5% исходного субстрата, 14 α - и 11 β -моногоидроксипроизводных (15 и 20% соответственно) и 11 β , 14 α -дигидроксипроизводного (30—35%), из чего следует, что 11 β - и 14 α -гидроксилирование осуществляется последовательно. Нельзя не отметить, что *C.l.* трансформирует кортексолон в смесь 11 β - и 14 α -моногоидроксипроизводных (67% и 15% соответственно) [107], из чего авторы делают вывод, что 5 α -Н-стероиды пространственно менее затруднены, чем их Δ^4 -3-кетоаналоги. Благодаря этому введение гидроксильной группы в одно из положений не исключает возможности их переориентации относительно фермента, что приводит к образованию 11 β , 14 α -дигидроксисоединений. По этой же причине, по мнению авторов [107], 16 α , 17 α -дигидрокси-5 α -прегнан-3-он более доступен трансформациям с *C.bl.* и *T.o.*, дающим 11 α -гидроксигруппы с 65 и 30%-ным выходами соответственно, тогда как его Δ^4 -3-кетоаналог не трансформируется ни одной из обсуждаемых культур. Нам такая точка зрения не кажется убедительной; вероятно, объяснение наблюдаемым фактам следует

искать в общей модели субстрат-ферментного взаимодействия прегнанов, в которой кислородная функция в кольце *D* (ее природа, положение, стереохимия) должны не только принимать участие, но конкурировать с 20-кетогруппой при геометрически или стереохимически благоприятном способе связывания.

Анализируя данные табл. 5 с точки зрения модели фермент-субстратного взаимодействия Джонса можно заметить, что в целом они согласуются с положением о функционировании на поверхности фермента трех связывающих и одновременно гидроксiliрующих сайтов. Действительно, прегнановые монокетоны, возможность связывания фермента с которыми реализуется только одним центром, практически не трансформируются, а при наличии двух терминальных кислородных групп в молекуле стероида гидроксiliрование происходит по сайту В. При наличии второго кислородного заместителя в центре В, гидроксiliрование может протекать по сайту А, если он не связан с молекулой стероида. В том случае, когда имеются три кислородных заместителя, соответствующие сайтам А, В и С, то продукты трансформации либо не удается выделить, либо, как это происходит у *C.d.* с 3,20-(CO)₂-11 α -ОН-прегнаном, гидроксiliрование, по-видимому, катализирует один из связывающих сайтов (схема 23) [102].

К вышесказанному необходимо добавить, что трансформация 5 α -Н-прегнанов выполнена также с помощью неидентифицированных до вида стрептомицетов и *S. roseochromogenes*, которые вводят 16-гидроксильную группу в 3-кето- и 3 β -гидрокс-5 α -Н-прегнаны [108, 109], так же как и в соединения с Δ^4 -3-кетогруппировкой. Вероятно, механизм гидроксiliрования кольца *D* этими представителями класса *Schizomycetes*, так же как и 9 α -гидроксiliрование с *Rhodococcus* [118—122], отличается от предложенного Джонсом с соавт. для грибов.

Анализ изложенных данных позволяет проследить, как специфическая способность микроорганизмов к гидроксiliрованию 5 α -Н-стероидов зависит от типа стероида и характера заместителя в нем (кетон-, гидрокс-, ацетоксигрупп), их положения и стереохимии, количества. Это позволяет осуществить целенаправленное гидроксiliрование стероидов в то или иное положение молекулы. Многочисленные примеры, суммированные в таблицах, показывают, что насыщенность колец стероидной молекулы не является препятствием для эффективного гидроксiliрования. Это означает, что существует возможность изменения порядка превращения 5 α -Н-стероидов в биологически активные препараты, предполагающая первоначальное их гидроксiliрование и последующее дегидрирование кольца А. Обратная и общепринятая последовательность, заключающаяся в гидроксiliровании первоначально полученных из 5 α -Н-стероидов Δ^4 -3-Н-кето- (или $\Delta^{1,4}$ -3-кето)-производных, является предметом следующей части обзора, с акцентом на авторские исследования по использованию культуры *Rhodococcus*, катализирующей оба эти процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камерницкий А.В., Абубакиров Р.К., Горовец М.Б. и др. // Химия спиростанолов. М.: Наука, 1986.
2. Ахрем А.А., Тумов Ю.А. // Стероиды и микроорганизмы. М.: Наука, 1970. С. 251, 323.
3. Noguchi A., Fukushima D.K. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 1. P. 3552.
4. Brannon D.R., Parrish F.W., Wiley B.J., Long L. // Ibid. 1967. V. 32. № 5. P. 1521.
5. Kenney H.E., Weaver E.A., Wall M.F. // J. Amer. Chem. Soc. 1958. V. 80. № 20. P. 5568.
6. Ахрем А.А., Тумов Ю.А. // Микробиологические трансформации стероидов. М.: Наука, 1965.
7. Charney W., Herzog H.L. // Microbial Transformations of Steroids. N.Y.: Acad. Press, 1967.
8. Smith L.L. // Terpenoids and Steroids. 1974. V. 4. P. 394.
9. Kieslich K. // Microbial Enzymes and Bioconversions. L.: Acad. Press. 1980. P. 369.
10. Mahato S.B., Banerjee S. // Phytochemistry. 1985. V. 24. № 2. P. 1403.
11. Mahato S.B., Banerjee S., Podder S. // Ibid. 1989. V. 28. № 1. P. 7.
12. Holland H.L. // Chem. Soc. Reviews. 1982. V. 11. № 4. P. 371.

13. Bridgeman J.E., Browne J.W., Cherry P.C. et al. // Chem. Commun. 1969. P. 463.
14. Evans J.M., Jones E.R.H., Kasai A. et al. // Ibid. 1969. P. 1491.
15. Bridgeman J.E., Cherry P.C., Clegg A.S. et al. // J. Chem. Soc. Perk. Trans. I. 1970. P. 250.
16. Brigeman J.E., Cherry P.C., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Chem. Commun. 1997. P. 482.
17. Clegg A.S., Jones E.R.H., Meakins Q.D., Pinhey J.T. // Ibid. 1970. P. 1029.
18. Meakins G.D., Blunt J.W., Clark I.M. et. al. // J. Chem. Soc. Perk. Trans. I. 1971. № 6. P. 1136.
19. Bell A.M., Cherry P.C., Clark I.M. et. al. // Ibid. 1972. № 16. P. 2081.
20. Bell A.M., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1972. № 21. P. 2759.
21. Bell A.M., Browne J.W., Denny W.A., Jones E.R.H. // Ibid. 1972. № 23. P. 2930.
22. Browne J.W., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1973. № 14. P. 1493.
23. Chambers V.E.M., Denny W.A., Evans J.M. et. al. // Ibid. 1973. № 14. P. 1500.
24. Bell A.M., Clark I.M., Denny W.A. et. al. // Ibid. 1973. № 19. P. 2131.
25. Clegg A.S., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1973. № 19. P. 2137.
26. Bell A.M., Chambers V.E.M., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1974. № 2. P. 312.
27. Chambers V.E.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 1. P. 55.
28. Bell A.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 4. P. 357.
29. Evans J.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 14. P. 1356.
30. Chambers V.E.M., Denny W.A., Jones E.R.H. et. al. // Ibid. 1975. № 14. P. 1359.
31. Bell A.M., Boul A.D., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Ibid. 1975. № 14. P. 1364.
32. Jones E.R.H., Meakins G.D., Miners J.O. et. al. // Ibid. 1975. № 16. P. 1552.
33. Bell A.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. et. al. // Ibid. 1975. № 20. P. 2040.
34. Jones E.R.H., Meakins G.O., Miners J.D., Wilkins A.L. // Ibid. 1975. № 22. P. 2308.
35. Jones E.R.H., Meakins G.D., Miners J.O. et. al. // Ibid. 1976. № 17. P. 1842.
36. Bird G.C., Fredericks P.M., Jones E.R.H., Meakins G.D. // Ibid. 1980. № 3. P. 750.
37. Denny W.A., Fredericks P.M., Ghileran I., Jones E.R.H. et. al. // J. Chem. Res. Syn. 1980. № 1. P. 20.
38. Пат. 1. 342. 583 Англия // С.А. 1972. V. 76. 125417.
39. Peterson D.H., Murray H.C. // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 1871.
40. Mininger R.F., Wall M.E., Dworschac R.G., Jackson R.W. // Archiv. Biochem. Biophys. 1956. V. 60. P. 427.
41. Sato Y., Hayakawa S. // J. Org. Chem. 1961. V. 26. P. 4181.
42. Hayakawa S., Sato Y. // Ibid. 1962. V. 27. P. 704.
43. Sato Y., Hayakawa S. // Ibid. 1963. V. 28. P. 2739.
44. Hayakawa S., Sato Y. // Ibid. 1963. V. 28. P. 2742.
45. Sato Y., Hayakawa S. // Ibid. 1964. V. 29. P. 198.
46. Sato Y., Waters J.A., Kaneko H. // Ibid. 1964. V. 29. P. 3732.
47. Jaffer J.A., Blunden G., Crabb T.A. // Phytochemistry. 1983. V. 22 № 1. P. 304.
48. Kondo E., Mitsuugi T. // J. Amer. Chem. Soc. 1966. V. 88. № 20. P. 4737.
49. Пат. 71. 39067 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 403.
50. Пат. 71. 39068 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 404.
51. Пат. 71. 40754 Япония // С.А. 1972. V. 76. 71013.
52. Пат. 72. 13716 Япония // РЖХим. 1972. 20Н 405.
53. Пат. 3. 575810 США // РЖХим. 1972. 3Н453.
54. Пат. 2 602 769 США // С.А. 1952. V. 46. 8331.
55. Пат. 2 877 162 США // С.А. 1960. V. 54. 1625.
56. Valcavi U., Martelli P., Sironi U.C., Tedeschi S. // Il Farmaco. 1975. V. 30. № 6. P. 464.
57. Пат. 2 889 255 США // С.А. 1959. V. 53. 22098.
58. Пат. 2 985 563 США // С.А. 1961. V. 55. 23923.
59. Пат. 3 009 933 США // С.А. 1962. V. 57 3527.
60. Пат. 3 054 725 США // С.А. 1963. V. 58. 912.
61. Пат. 3 087 938 США // С.А. 1963. V. 59. 11625.
62. Пат. 3 013 945 США // С.А. 1962. V. 56. 11586.
63. Пат. 1 048 579 ФРГ // С.А. 1961. V. 55. 3656.
64. Пат. 1 102 733 ФРГ // С.А. 1962. V. 56. 8803.
65. Пат. 1 768 203 ФРГ // С.А. 1970. V. 73. 75656.
66. Пат. 2 876 170 США // С.А. 1959. V. 53. 16226.

67. Пат. 2 0643 ГДР // C.A. 1961. V. 55. 25156.
68. Kieslich K., Schulz G. // Annalen. 1969. V. 726. P. 152.
69. Kahnt F.W., Meystre Ch., Neher R. et. al. // Experientia. 1952. V. 8. P. 422.
70. Dodson R.M., Goldkamp A.H., Muir R.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1960. V. 82. P. 4026.
71. Defaye G., Luche M.J., Chambar E.M. // J. Steroids Biochem. 1978. V. 9. P. 331.
72. Meeks R.C., Meister P.D., Eppstein S.H. et. al. // Chem. and Ind. 1958. № 13. P. 392.
73. Пат. 1 021 845 ФРГ // C.A. 1960. V. 54. 4686.
74. Пат. 2 981 659 США // C.A. 1961. V. 55. 18007.
75. Tan L., Falardeau P. // J. Steroids. Biochem. 1970. V. 1. P. 221.
76. Shibahara M., Moody J.A., Smith L.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1970. V. 202. P. 172.
77. Пат. 2 833 792 США // C.A. 1958. V. 52. 20272.
78. Jones E.R.H. // Pure Appl. Chem. 1973. V. 33. P. 39.
79. McGzindle R., Turnbull J.K., Anderson A.B. // J.Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1975. № 13. P. 1202.
80. Marciano D., Giorgio J.F., Evans J.M. et. al. // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 20. P. 3960.
81. Marciano D., Giorgio J.F., Evans J.M. et. al. // Steroids. 1983. V. 41. P. 1.
82. Jankov R., Stefanovic M. // Glas. Hem. Drus. Beograd. 1975. V. 39. № 9—10. P. 577.
83. Jankov R., Stefanovic M. // Ibid. 1975. V. 39. № 9—10. P. 591.
84. Stefanovic M., Jankov R., Urošević G. // Bull. Acad. Serbesci et arts. 1977. V. 60. № 16. P. 55.
85. Jankov R., Urošević G., Stefanovic M. // Glas. Hem. Drus. Beograd. 1977. V. 42. № 3. P. 237.
86. Jankov R., Urošević G., Stefanovic M. // Ibid. 1980. V. 45. № 11. P. 517.
87. Jankov R., Soskic V., Stefanovic M. // Ibid. 1982. V. 47. № 6. P. 241.
88. Jankov R., Soskic V., Stefanovic M. // Ibid. 1983. V. 48. № 4. P. 121.
89. Crabb T.A., Dawson P.J., Williams R.O. // Tetrahedron Lett. 1975. № 42. P. 3623.
90. Crabb T.A., Saul J.A., Williams R.O. // J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I. 1977. № 23. P. 2599.
91. Crabb T.A., Dawson P.J., Williams R.O. // Ibid. 1980. № 11. P. 2535.
92. Crabb T.A., Saul J.A., Williams R.O. // Ibid. 1981. № 4. P. 1041.
93. Crabb T.A., Ratcliffe N.M. // J. Chem. Rec. Syn. 1986. № 2. P. 48.
94. Campbel S.A., Crabb T.A., Williams R.O. // Ibid. 1986. № 6. P. 208.
95. Crabb T.A., Ratcliffe M.M. // Ibid. 1986. № 6. P. 1928.
96. Crabb T.A., Ratcliffe M.M. // Ibid. 1988. № 7. P. 207.
97. Belić I., Gaberc-Porekar V., Sočić H., Žakeg M. // Z. Allg. microbiol. 1982. V. 22. № 6. P. 359.
98. Greenspan G., Rees R., Smith L.L., Alburn H.E. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. № 12. P. 4215.
99. Пат. 19658 ГДР // C.A. 1961. V. 55. 26361.
100. Пат. 1 067 020 ФРГ // C.A. 1961. V. 55. 7758.
101. Schubert A., Heller K., Siebert R. // Tetrahedron 1962. V. 18. P. 993.
102. Schubert A., Siebert R. // Chem. Ber. 1958. 91. № 9. S. 1856.
103. Schubert A., Langbein G., Siebert R. // Ibid. 1957. V. 90. № 11. S. 2576.
104. Caspi E., Ramm P.J., Gain R.E. // J. Amer. Chem. Soc. 1969. V. 91. № 14. P. 4012.
105. Kieslich K., Wiegless H. // Chem. Ber. 197. B. 104. № 1. S. 205.
106. Cleve G., Hoyer G.A., Kieslich K., Wiegless H. // Ibid. 1972. B. 105. № 2. S. 658.
107. Герасимова М.Л., Гусарова Т.И., Рыжкова В.М. // Хим.-фарм. журн. 1986. № 10. C. 1259.
108. Пат. 3 033 749. США // C.A. 1953. V. 58. 4630.
109. Neher R., Desaulles P., Vischer E. Helv. Chim. acta. 1958. V. 41. P. 1667.
110. Пат. 3033 748.США //C.A. 1962. V. 57. 16712.
111. Kenney H.E., Serota S., Weaver E.A., Wall M.E. // J. Amer. Chem. Soc. 1960. V. 82. № 14. P. 3689.
112. Eppstein S.H., Peterson D.H., Leigh H.M.et. al. // Ibid. 1953. V. 75. № 2. P. 421.
113. Пат. 2 882 205 США // C.A. 1959. V. 53. 16226.
114. Пат. 2 875 134 США // C.A. 1959. V. 53. 16226.
115. Pan S.C., Laskin A.I., Junta B. et. al // Abstr. 148th Meeting Amer. Chem. Soc. Chicago. 1964. P. 140.
116. Пат. 2 721 828 США // C.A. 1956. V. 50. 7891.
117. Stefanovic M., Husinec S.J., Jankov R.M., Bralovic M. // Glas. Hem. Drus. Beograd. 1981. V. 46. № 7. P. 319.
118. Turuta A.M., Kamernitzky A.B., Voishvillo N.E. et. al. // Mendeleev Commun. 1991. № 3. P. 113.

119. Войшвилло Н.Е., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Хим.-фарм. журн. 1992. № 2. С. 64.
120. Джлантиашвили Н.В., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1992. № 5. С. 1182.
121. Войшвилло Н.Е., Турута А.М., Камерницкий А.В. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1992. В печати.
122. Турута А.М., Войшвилло Н.Е., Камерницкий А.М. и др. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1992. № 8. В печати.
123. Schubert A., Onken D., Siebert R., Heller K. // Chem. Ber. 1958. B. 91. S. 2549.
124. Пат. 3117144 США // С.А. 1964. V7 60. 11344g.

Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Дата поступления
6.05.1992 г.

MICROBIAL HYDROXYLATION OF 5 α -H-STEROIDS

Turututa A.M., Voishvillo N.E., Kamernitskii A.V.

Literature data on the application of microorganisms for the hydroxylation of 5 α -H-steroids mainly of 5 α -H-androstane and 5 α -H-pregnane series as well as of 5 α -H-sapogenins have been summarized. The covered data attempt to present a clear idea on the effect of substituent position in the steroid molecule upon the direction of hydroxylation and the microbial enzymes activity in terms of the model substrate-enzyme interaction.

The bibliography includes 124 references.