

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235020**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420193**

(22) Data zgłoszenia: **13.01.2017**

(51) Int.Cl.

C12P 33/06 (2006.01)

C12P 33/12 (2006.01)

C12R 1/785 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania 3 β ,7 α ,17 α -trihydroksyandrost-5-enu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.12.2017 BUP 26/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

18.05.2020 WUP 05/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy
we Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
ANNA KANCELISTA, Siechnice, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
MONIKA URBANIAK, Bytom, PL
ŁUKASZ STĘPIEŃ, Poznań, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 235020 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-enu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leków o właściwościach immunomodulujących (Lehman L.R., Stewart J.D., Filamentous fungi: Potentially useful catalysts for the biohydroxylations of non-activated carbon centers *Curr. Org. Chem.* 2001, 5, 439; Wong L.L., Cytochrome P450 monooxygenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1998, 2, 263).

Dane doświadczalne i kliniczne wskazują, że $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-en-17-on jest powstającym z DHEA (dehydroepiandrosteronu) bioaktywnym metabolitem człowieka wykazującym działanie neuroprotektoryjne, przeciwzapalne i antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych (Robinson B, Michael KK, Ripp SL, Winters SJ, Prough RA: 2003 Glucocorticoids inhibit interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo metabolites of dehydroepiandrosterone: a role for 11β -hydroxysteroid dehydrogenases? *Arch Biochem Biophys* 412, 251–258; Chalbot S, Morfin R: 2005 Human liver S9 fractions: metabolism of dehydroepiandrosterone, epiandrosterone, and related 7-hydroxylated derivatives. *Drug Metab Dispos* 33, 563–569). $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-en wykazuje wysoką aktywność antynowotworową względem linii komórkowych chłoniaka. Wykazano, że androstentriole właśnie z takim usytuowaniem grup hydroksylowych wykazują najwyższą aktywność antynowotworową (M.R. Graf, W. Jia, M.L. Lewbart, R.M. Loria (2009) The anti-tumor effects of androstene steroids exhibit a strict structure-activity relationship dependent upon the orientation of the hydroxyl group on carbon-17. *Chem Biol Drug Des* 2009; 74: 625–629).

Znana jest chemiczna metoda otrzymywania $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-enu z $3\beta,17\alpha$ -dihidroksyandrost-5-enu w wyniku selektywnej oksydacji węgla alilowego i redukcji nowopowstałej grupy karbonylowej (M.R. Graf, W. Jia, M.L. Lewbart, R.M. Loria (2009) The anti-tumor effects of androstene steroids exhibit a strict structure-activity relationship dependent upon the orientation of the hydroxyl group on carbon-17. *Chem Biol Drug Des* 2009; 74: 625–629).

W dostępnej literaturze nie znaleziono mikrobiologicznej metody otrzymywania $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-enu.

Istota wynalazku polega na tym, że regioselektywne wprowadzenie grupy hydroksylowej w cząsteczce substratu, którym jest 3β -hidroksyandrost-5-en-17-on (DHEA), w wyniku którego otrzymuje się $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-en, poprzedzone jest enancjoseptyczną redukcją grupy karbonylowej usytuowanej przy C-17, reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Mucor hiemalis* KCh W2.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Mucor hiemalis* KCh W2. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3β -hidroksyandrost-5-en-17-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 24 godziny. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 g : 1 L.

Korzystnie także jest, gdy proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 3 dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Mucor hiemalis* KCh W2, następuje stereoselektywna hydroksylacja przy atomie węgla C-7, poprzedzona enancjoseptyczną redukcją grupy karbonylowej przy węglu C-17. Użytkany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą (chloroform).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie $3\beta,7\alpha,17\alpha$ -trihidroksyandrost-5-enu z wydajnością izolowaną na poziomie 54% (według GC > 65%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Metoda izolowania szczepu *Mucor hiemalis* KCh W2

Próbkę gleby pobranej na Wyspa Słodowa – Wrocław, okolice Starego Miasta i Węzła Wodnego przeniesiono do sterylnej gilzy. Następnie w warunkach aseptycznych 1g gleby rozpuszczono w 10 ml sterylnej wody. Pobrano 1 cm³ supernatantu i wykonano posiewy z kolejnych rozcieńczeń. Kolejnymi rozcieńczeniami badanego materiału zaszczerpiono płytki agarowe (sterylne plastikowe

plytki z 20 ml pożywki stałej o składzie: glukoza 3%, aminobak 1%, agar 0,8%). Z jednego z rozcieńczeń wyodrębniono czystą kulturę szczepu *Mucor hiemalis* KCh W2, który wykorzystano do biotransformacji. Wyodrębniony szczep przechowywany jest na skosach agarowych w temperaturze +4°C w kolekcji Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław.

Szczep dostępny jest również w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. J. Chełmońskiego 37, 51-630 Wrocław.

Przykład

Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 1 g aminobaku i 3 g glukozy, wprowadza się szczep *Mucor hiemalis* KCh W2 o sekwencji 1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ metanolu. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym, wstrząsaniu przez 3 dni. Następnie mieszaninę poreakcyjną ekstrahuje się: trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się chromatograficznie, używając jako eluentu mieszaniny heksanu i acetonu w stosunku objętościowym 2:1.

Na tej drodze otrzymuje się 54,2 mg 3 β ,7 α ,17 α -trihydroksyandrost-5-en (wydajność 54%, według GC > 65%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600 MHz) (ppm) (CDCl₃) δ : 0.69 (s, 3H, 18-H); 1.00 (s, 3H, 19-H); 1.14 (td, 1H, J = 13.5, 3.7 Hz, 1-H α); 1.20-1.29 (m, 2H, 9-H, 12H α); 1.44-1.70 (m, 6H, 2-H α , 8-H, 11-H α , 11-H β , 15-H α , 16-H α); 1.78-1.93 (m, 5H, 1-H β , 2-H β , 12-H β , 14-H, 15-H β); 2.21 (m, 1H, 16-H β); 2.29 (br, J = 13.1 Hz, 4-H α); 2.36 (ddd, 1H, J = 13.1, 5.0, 2.1 Hz, 4-H β); 3.59 (tt, 1H, J = 11.0, 4.7 Hz, 3-H α); 3.77 (d, 1H, J = 6.0 Hz, 17-H β); 3.88 (br t, 1H, J = 3.7 Hz, 7-H β); 5.62 (dd, 1H, J = 5.3, 1.5 Hz, 6-H).

¹³C NMR (151 MHz) (ppm) (CDCl₃) δ : 16,76 (C-18); 18,43 (C-19); 20,43 (C-11); 24,89 (C-15); 31,10 (C-2); 31,51 (C-12); 32,75 (C-16); 37,22 (C-1); 37,60 (C-10); 37,98 (C-8); 42,13 (C-14); 42,19 (C-4); 42,49 (C-9); 45,08 (C-13); 65,63 (C-7); 71,41 (C-3); 80,00 (C-17); 123,99 (C-6); 146,28 (C-5).

```
ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATCCCGCCTGATTTCAGATCAAATTTAAGA
ATGATTTATTTGGGAGGCCCCAGAGATAGTCTTTTTACTAGAGCATTCTTTA
TATTAAAAAATGTTTCAGGCAGAAAGAACAATAGTTCAGGCCTAATAATTTTA
AAGAATTCAGCAATAAAGCCGAAACTCTCATTTCCATTCAACAACAAAATTATG
AATGTGGGGTGTTTTTGATACTGAAACAGGCGTGCTCAATGGAATACCATTG
AGCGCAAGTTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACTGAATATGCAATTCACAC
TAGTTATCGCACTTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAGATCCG
TTGTTAAAAGTTGTTTTATAAGTTTTTTACGCTTATGTTACAATTATAACTG
AATTCTTTTGGTAAATAATTAATAGGATACCAGGCCTAAGCCTGACTTTCAGC
TCGGTTAACATTCTAGTAGCCTATCCCTATGGCTAAAAGACATTCCTCAGAC
GCTGAAAAATTAACAGTTCACAGTAAAAAAGAATGAACCATTCGCTAGAA
AACTAGCAAAGGCCATCTAAATTATTTAT
```

Sekwencja 1

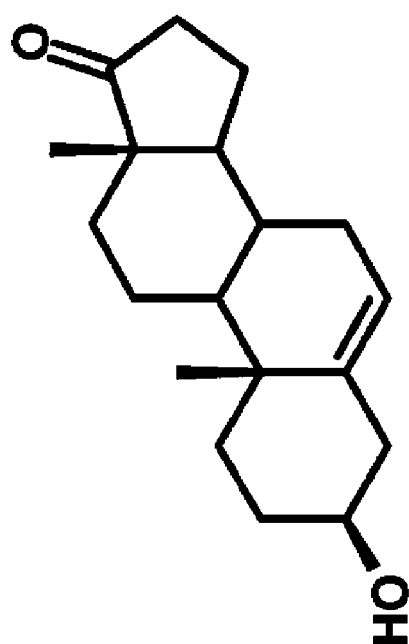
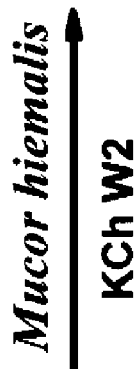
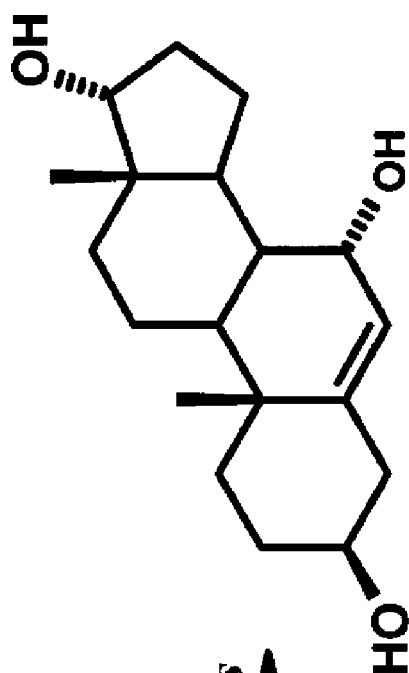
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3 β ,7 α ,17 α -trihydroksyandrost-5-en, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Mucor hiemalis* KCh W2 o sekwencji 1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, zaś transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, przez co najmniej 72 godziny, po

czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

2. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 g : 1 L.
3. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 3 dni.

Rysunki

**Wzór 1****Wzór 2**