

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235021**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420945**

(51) Int.Cl.  
**C12P 33/06 (2006.01)**  
**C12R 1/645 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **22.03.2017**

---

(54) **Sposób wytwarzania  $3\beta,7\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**24.09.2018 BUP 20/18**

(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**  
**NATALIA HOC, Żagań, PL**  
**MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL**  
**EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL**  
**JAKUB GRZESZCZUK, Opole, PL**  
**ELŻBIETA PŁASKOWSKA, Wrocław, PL**  
**MONIKA URBANIAK, Bytom, PL**  
**ŁUKASZ STĘPIEŃ, Poznań, PL**  
**TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Anna Kasperowicz**

---

**PL 235021 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leków o właściwościach neuroprotektoryjnych oraz leków stosowanych w zapaleniu jelit.

Dane doświadczalne i kliniczne wskazują, że 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-on jest powstającym z DHEA (dehydroepiandrosteronu) bioaktywnym metabolitem człowieka wykazującym działanie neuroprotektoryjne (Akwa Y, Young J, Kabbadj K, Sancho MJ, Zucman D, Vourc'h C, Jung-Testas I, Hu ZY, Le Goascogne C, Jo DH, Corpéhot C, Simon P, Baulieu E-E, Robel P. (1991) Neurosteroids: biosynthesis, metabolism and function of pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 71–81; Pringle A, Schmidt W, Deans J, Wulfert E, Reymann K, and Sundstrom L (2003) 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* 18:117–124), immunostymulujące (Morfin R, Lafaye P, Cotillon AC, Nato F, Chmielewski V, Pompon D. (2000) 7 $\alpha$ -Hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response, *Annals NY Acad Sci*, 917, 971–982), przeciwzapalne (Pélissier MA, Muller C, Hill, M, Morfin R. (2006) Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 71, 240–248; Pelissier MA, Trap C, Malewiak MI, Morfin R. (2004) Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids*, 69 137–144) 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 11 $\beta$ -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).

Znana jest mikrobiologiczna metoda otrzymywania 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu z 3 $\beta$ -hydroksyandrost-5-en-17-onu (DHEA): – z wydajnością 22% w wyniku zastosowania szczepu *Absidia coerulea* AM93 (Milecka-Tronina N, Kołek T, Świzdor A, Panek A. (2014) Hydroxylation of DHEA and its analogues by *Absidia coerulea* AM93. Can an inducible microbial hydroxylase catalyze 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -hydroxylation of 5-ene and 5 $\alpha$ -dihydro C<sub>19</sub>-steroids? *Bioorg. Med. Chem.* 22, 883–891), – z wydajnością 96% w wyniku zastosowania szczepu *Fusarium culmorum* (Kołek T. (1999) Biotransformation XLVII: transformations of 5-ene steroids In *Fusarium culmorum* culture, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 71, 83–90); – z 63% konwersją wg GC w wyniku zastosowania szczepu *Mortierella isabellina* AM212 (Kołek T, Milecka N, Świzdor A, Panek A, Białońska A. (2011) Hydroxylation of DHEA, androstenediol and epiandrosterone by *Mortierella isabellina* AM212. Evidence indicating that both constitutive and inducible hydroxylases catalyze 7 $\alpha$ - as well as 7 $\beta$ -hydroxylations of 5-ene substrates, *Org. Biomol. Chem.* 9, 5414–5422); – z wydajnością 35% w wyniku zastosowania szczepu *Gelasinospora retispora* (Koshimuraa M, Utsukihara T, Haraa A, Mizobuchi S, Horiuchi CA, Kuniyoshi M. (2010) Hydroxylation of steroid compounds by *Gelasinospora retispora*. *J Mol Cat B-Enzym* 67, 72–77); – z wydajnością 38% w wyniku zastosowania szczepu *Mucor silvaticus* (Wang Y, Sun D, Chen Z, Ruan H, Ge W. (2013) Biotransformation of 3 $\beta$ -hydroxy-5-en-steroids by *Mucor silvaticus*, *Biocatal Biotransform.* 31, 168–174)

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3 $\beta$ -hydroksyandrost-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 9 godzin. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

W wyniku regioselektywnego wprowadzenia grupy hydroksylowej w cząsteczce substratu, którym jest 3 $\beta$ -hydroksyandrost-5-en-17-on (DHEA), otrzymuje się 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-on, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1.

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

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 12 godzin.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1, następuje stero selektywna hydroksylacja przy atomie

węgla C-7. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą (chloroform).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie  $3\beta,7\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu z wydajnością izolowaną na poziomie 43% (konwersja substratu według GC = 100%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

#### Metoda izolowania szczepu *Trichoderma atroviride* KCh TRW.

Owad przerośnięty grzybnią został zebrany ze ściany korytarza wietrznej sztolni koło Kletna za pomocą jałowej pęsety i umieszczone w jałowych plastikowych probówkach. Następnie próba została przetransportowana na teren Zakładu Fitopatologii i Mykologii Katedry Ochrony Roślin UP we Wrocławiu. Truchło owada zostało wyjęte za pomocą świeżo wyjałowionych narzędzi (pęseta oraz eza mikrobiologiczne) i umieszczone na jałowej szklanej szalce w sterylnym pomieszczeniu. Za pomocą jałowej ezy mikrobiologicznej z powierzchni truchł owadów zostały zebrane tkanki grzyba (nalot zarodników oraz strzępki) i umieszczony na zakwaszonym podłożu PDA (potato dextrose agar). Wzrost był obserwowany przez okres 2 tygodni. Po pojawieniu się wzrostu grzybni został on przeszczepiony na świeże podłoża PDA. Po oznaczeniu jako *Isaria farinosa* KCh KW1.1 jest przechowywany w temperaturze +4°C w kolekcji Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław. Dostępny jest również w:

- Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań,
- Katedra Ochrony Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 24a, 53-363 Wrocław.

#### P r z y k ł a d

Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 500 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1 o sekwencji 1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg  $3\beta$ -hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> DMSO. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 12 godziny. 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 43 mg  $3\beta,7\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu (wydajność 43%, stopień konwersji substratu = 100%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz) (ppm) (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.87 (s, 3H, 18-H); 1.01 (s, 3H, 19-H); 1.11 (td, 1H,  $J$  = 13.4, 3.8 Hz, 1-H $\alpha$ ); 1.23-1.31 (m, 2H, 9-H, 12-H $\alpha$ ); 1.49 (td, 1H,  $J$  = 13.1, 4.3 Hz, 11-H $\alpha$ ); 1.50-1.60 (m, 2H, 2-H $\alpha$ , 15-H $\alpha$ ); 1.64-1.72 (m, 2H, 8-H, 11-H $\beta$ ); 1.78 (td, 1H,  $J$  = 12.1, 5.3 Hz, 14-H); 1.80-1.89 (m, 3H, 1-H $\beta$ , 2-H $\beta$ , 12-H $\beta$ ); 2.07-2.17 (m, 2H, 15-H $\beta$ , 16-H $\alpha$ ); 2.29 (br t, 1H,  $J$  = 12.3 Hz, 4-H $\alpha$ ); 2.35 (ddd, 1H,  $J$  = 13.3, 4.8, 2.0 Hz, 4-H $\beta$ ); 2.33 (dd, 1H,  $J$  = 13.1, 4.6 Hz, 16-H $\beta$ ); 3.56 (tt, 1H,  $J$  = 11.3, 4.7 Hz, 3-H $\alpha$ ); 3.96 (br t, 1H,  $J$  = 3.8 Hz, 7-H $\beta$ ); 5.63 (dd, 1H,  $J$  = 5.1, 1.2 Hz, 6-H).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz) (ppm) (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 13,39 (C-18), 18,38 (C-19), 20,19 (C-11), 22,02 (C-15), 31,18 (C-12), 31,39 (C-2), 35,91 (C-16), 37,07 (C-1), 37,32 (C-8), 37,63 (C-10), 42,06 (C-4), 42,72 (C-9), 45,05 (C-14), 47,23 (C-13), 64,37 (C-7), 71,25 (C-3), 123,67 (C-6), 146,64 (C-5), 221,30 (C-17).

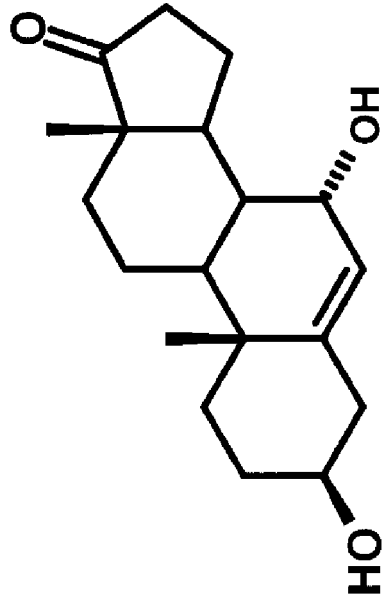
GTCAGCTGCACGATTGTCAGCGTACCGCATAACCCTTTTGTGAACAT  
ACCTATCGTTGCTTCGGCGGACTCGCCCCAGCGTCCGGCCGGCCCC  
GCGCCGGCCGCGGCCTGGATCCAGGCGGCCGCGGAGACCCCCAA  
ACTCTGTATTCTCAGTATCTTCTGAATCCGCCGCAAGGCAAAACAAT  
GAATCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGCATTCTGGCGGGC  
ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCGACTTCCCTTTGGGGAAAT  
CGGCGTTGGGGACCGGCCGTATACCGCCGGCCCCGAAATGAAGTG  
GCGGCCCGTCCGCGGCGACCTCTGCGTAGTAATCCAACCTCGCACCG  
GAACCCCGACGTGGCCACGCCGTAAAACCCCGACTTCTGAACGTT  
GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAA

### Sekwencja 1

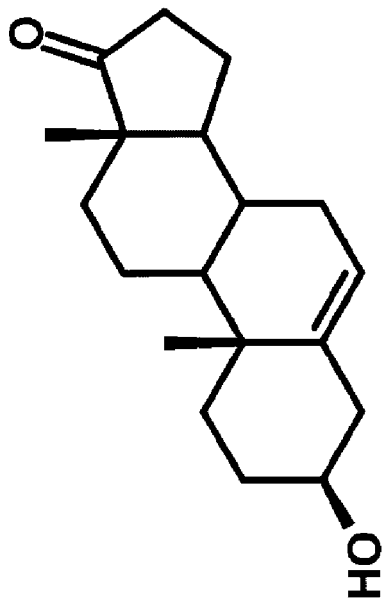
#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -dihydroksyandrost-5-en-17-onu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1 o sekwencji 1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3 $\beta$ -hydroksyandrost-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 najwyżej 9 godzin, 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 mg : 1 mL.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces prowadzi się w temperaturze 25 stopni Celsjusza.
4. Sposób według zastrzeżenia 1., **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 12 godzin.

## Rysunki



*Isaria farinosa*  
KCh KW1.1



**Wzór 2**

**Wzór 1**