

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241537**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **434398**

(22) Data zgłoszenia: **22.06.2020**

(51) Int.Cl.

C07J 73/00 (2006.01)

C12P 33/06 (2006.01)

C12P 33/12 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(54) **15 α -Hydroksyoksandrolon i sposób wytwarzania 15 α -hydroksyoksandrolonu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

27.12.2021 BUP 39/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.10.2022 WUP 42/22

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE
WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ALINA ŚWIZDOR, Wrocław, PL
PAULINA ŁYCZKO, Wrocław, PL
ANNA PANEK, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 241537 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest 15 α -hydroksyokсандrolon i sposób wytwarzania 15 α -hydroksyokсандrolonu, o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Sposobem według wynalazku można otrzymać nową hydroksylową pochodną biologicznie aktywnego oksandrolonu. Otrzymany produkt może znaleźć zastosowanie w wytwarzaniu nowych steroidowych związków o potencjale terapeutycznym, użytecznych w leczeniu schorzeń związanych m. in. z niedoborem masy ciała.

Oksandrolon to związek o działaniu anabolicznym będący syntetyczną pochodną dihydrotestosteronu (DHT), wykazujący znacznie niższą aktywność androgeną w porównaniu z DHT. Uważany jest za jeden z najbezpieczniejszych steroidów, ponieważ nie wpływa on w znaczący sposób na produkcję testosteronu, a także nie ulega aromatyzacji do estrogenów (Choudhary M. I et al., Steroids, 2009, 74, 1040–1044). Oksandrolon stosowany jest w leczeniu pacjentów, u których nastąpił znaczny ubytek masy ciała, m. in. chorych na AIDS, chorych po rozległych urazach i amputacjach (Sheanon N. M., Backeljauw P. F., Int. J. Pediatr. Endocrinol. 2015, 18, 1–8; Hamblin, M. R., Expert Opin. Pharmacother. 2019, 20, 305–321; Grunfeld C. et al., J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. 2006, 41, 304–314). Znajduje on także zastosowanie w terapii oparzeń, osteoporozy oraz choroby Kennedy'ego (Asehnoune K. et al., Crit. Care Clin. 2018, 35, 201–211; Real D. et al., Acta Cir. Bras. 2014, 29, 68–76).

Wprowadzenie grupy hydroksylowej do cząsteczki steroidowej może spowodować wzmocnienie lub zmianę aktywności biologicznej związku (Donova M. V., Egorova, O. V, App Microbiol Biotechnol, 2012, 94, 1423–1447; El Kihel L., Steroids 2012, 77, 10–26). Jednocześnie obecność grupy hydroksylowej wpływa na zwiększenie polarności związku oraz stwarza możliwość przeprowadzania kolejnych modyfikacji strukturalnych cząsteczki. Umożliwia to tym samym rozwój badań w kierunku poszukiwania substancji o potencjalnym działaniu leczniczym.

Chemiczna synteza leków steroidowych wymaga dużej liczby operacji technologicznych, w tym osłaniania niektórych grup reaktywnych przed niespecyficznymi co do miejsca i konformacji reakcjami chemicznymi. W przeciwieństwie do reakcji chemicznych, procesy mikrobiologiczne umożliwiają wprowadzenie grupy hydroksylowej do cząsteczki transformowanego związku jednoetapowo, z wysoką regio- oraz stereoselektywnością, przy jednoczesnym zachowaniu łagodnych warunków reakcji.

Nie jest znany żaden sposób otrzymywania 15 α -hydroksyokсандrolonu, zarówno metodami transformacji mikrobiologicznej jak i za pomocą syntezy chemicznej.

Laetiporus sulphureus to gatunek huby pasożytującej na drzewach liściastych, która znalazła praktyczne zastosowanie w medycynie. Ekstrakty z *Laetiporus sulphureus* wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, przeciwnowotworowe, cytotoksyczne, hipoglikemiczne, przeciwzapalne i przeciwutleniające (Sułkowska-Ziaja, K., Muszyńska, B., Gawalska, A., Sałaciak, K., Acta Sci. Pol. Hortoru., 2018, 17, 87–96). Grzyby z rodzaju *Laetiporus sulphureus* były wykorzystywane również w biotransformacjach, wykazując zdolność do enancjoselektywnej laktonizacji kwasu 3-metylo-4-oksooktanowego (Boratyński, F., Smuga, M., Wawrzeńczyk, C Food Chem., 2013, 141, 419–427). Szczep *Laetiporus sulphureus* AM 498 był wcześniej ujawniony w literaturze (Bartmańska, A., Tronina, T., Huszcza, E. Zeitschrift fur Naturforsch. – Sect. C J. Biosci., 2013, 68 C, 231–235).

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla wzrostu grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek *Laetiporus sulphureus* AM 498 i hodowlę prowadzi się przez kilka dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 23–27°C. Po upływie co najmniej 48 godzin dodaje się substrat, którym jest oksandrolon, o wzorze 1, w postaci zawiesiny w rozpuszczalniku organicznym. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej przez 7 dni w warunkach typowych dla hodowli mikroorganizmu. Uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, osusza i odparowuje rozpuszczalnik, w wyniku czego otrzymuje się surowy produkt, który oczyszcza się chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,25 g : 1 dm³.

Korzystnie jest także, gdy transformację prowadzi się przez 7 dni.

Korzystne jest również, gdy jako ekstrahent stosuje się chloroform.

Korzystne jest także, gdy jako eluent w chromatografii stosuje się mieszaninę chloroform : metanol, w proporcji objętościowej składników 10 : 1.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 15 α -hydroksyokсандrolonu z wydajnością 72%, w temperaturze pokojowej i pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Do kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml, w której znajduje się 100 ml sterylnej pożywki zawierającej 3 g glukozy i 1 g aminobaku, wprowadza się 2 cm³ zawiesiny komórek szczepu *Laetiporus sulphureus* AM 498. Hodowlę prowadzi się przez kolejne trzy dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 24–26°C. Następnie do hodowli mikroorganizmu dodaje się 25 mg oksandrolonu, o wzorze 1, w postaci zawiesiny w 0,6 cm³ acetonu. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez siedem dni w warunkach, w których prowadzona była hodowla mikroorganizmu. Następnie uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Po chromatograficznym oczyszczeniu surowego produktu z wykorzystaniem jako eluentu mieszaniny chloroform : metanol, w proporcji objętościowej składników 10 : 1, otrzymuje się 18 mg 15 α -hydroksyoksandrolonu (wydajność izolowana 72% mol.) o wzorze 2.

Uzyskany 15 α -hydroksyoksandrolon charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

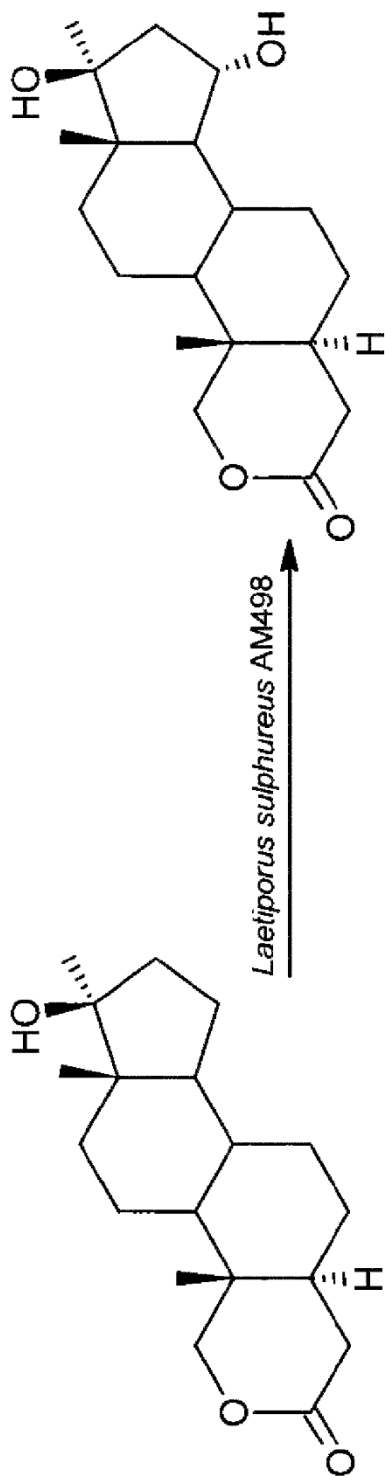
¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 0,87 (s, 3H, 18-H); 1,01 (s, 3H, 19-H); 1,35 (s, 3H, 20-H); 2,02 (dm, 1H, 7 β -H); 2,22 (dd, $J = 13,0$ Hz, $J = 18,8$ Hz, 1H, 4 β -H); 2,42 (dd, $J = 9,7$ Hz, $J = 14,6$ Hz, 1H, 16 β -H); 2,52 (dd, $J = 5,9$ Hz, $J = 18,8$ Hz, 1H, 4 α -H); 3,92 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H, 1 α -H); 4,07 (td, $J = 3,4$ Hz, $J = 9,3$ Hz, 1H, 15 β -H); 4,22 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H, 1 β -H).

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 10,2 (C-19); 15,4 (C-18); 20,8 (C-11); 26,1 (C-20); 27,0 (C-6); 31,2 (C-12); 31,3 (C-7); 33,7 (C-4); 34,7 (C-10); 35,1 (C-8); 40,2 (C-5); 46,5 (C-13); 49,5 (C-9); 50,3 (C-16); 57,9 (C-14); 72,3 (C-15); 79,1 (C-17); 80,9 (C-1); 170,4 (C-3).

Zastrzeżenia patentowe

1. 15 α -Hydroksyoksandrolon o wzorze 2.
2. Sposób wytwarzania 15 α -hydroksyoksandrolonu na drodze transformacji mikrobiologicznej **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek szczepu *Laetiporus sulphureus* AM 498, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli dodaje się oksandrolon o wzorze 1, w postaci zawiesiny w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 23°C do 27°C przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej 7 dni, po czym produkt ekstrahuje się trzykrotnie rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, ekstrakt osusza i odparowuje rozpuszczalnik, otrzymuje się surowy produkt, który oczyszcza się chromatograficznie.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,25 g : 1 dm³.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 7 dni.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że ekstrakcję wykonuje się chloroformem.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jako eluent stosuje się mieszaninę chloroform : metanol, w proporcji objętościowej składników 10 : 1.

Rysunek



WZÓR 1

WZÓR 2