

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235019**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420192**

(51) Int.Cl.
C12P 33/06 (2006.01)
C12R 1/77 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.01.2017**

(54) **Sposób wytwarzania 3 β ,7 α -dihydroksyandrost-5-en-17-onu**

(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 WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 235019 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3 β ,7 α -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 β ,7 α -dihydroksyandrost-5-en-17-on jest powstającym z DHEA (dehydroepiandrosteronu) bioaktywnym metabolitem człowieka wykazującym działanie neuroprotektoryjne (Akwa Y., Young J., Kabbadj K., Sancho M.J., Zucman D., Vourc'h C., Jung-Testas I., Hu Z.Y., Le Goascogne C., Jo D.H., 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 A.C., Nato F., Chmielewski V., Pompon D. (2000) 7 α -Hydroxy-dehydroepiandrosterone and immune response, *Annals NY Acad Sci*, 917, 971–982), przeciwzapalne (Pélissier M.A., Muller C., Hill, M, Morfin R. (2006) Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat. *Steroids* 71, 240–248; Pelissier M.A., Trap C., Malewiak M, Morfin R. (2004) Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver. *Steroids*, 69, 137–144) i antyproliferacyjne względem komórek nowotworowych (Robinson B., Michael K.K., Ripp S.L., Winters S.J., Prough R.A. (2003) Glucocorticoids inhibit interconversion of 7-hydroxy and 7-oxo metabolites of dehydroepiandrosterone: a role for 11 β -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 β ,7 α -dihydroksyandrost-5-en-17-onu z 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-onu (DHEA): – z wydajnością 22% w wyniku zastosowania szczepu *Absidia coerulea* AM93 (Milecka-Tronina N., Kotek T., Świzdor A., Panek A. (2014) Hydroxylation of DHEA and its analogues by *Absidia coerulea* AM93. Can an inducible microbial hydroxylase catalyze 7 α - and 7 β -hydroxylation of 5-ene and 5 α -dihydro C₁₉-steroids? *Bioorg. Med. Chem.* 22, 883–891), – z wydajnością 96% w wyniku zastosowania szczepu *Fusarium culmorum* (Kotek 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 (Kotek 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 α - as well as 7 β -hydroxylations of 5-ene substrates, *Org. Biomol. Chem.* 9, 5414–5422); – z wydajnością 35% w wyniku zastosowania szczepu *Gelasinospora retispora* (Koshimura M., Utsukihara T., Hara A., Mizobuchi S., Horiuchi C.A., 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 β -hydroxy-5-en-steroids by *Mucor silvaticus*, *Biocatal Biotransform.* 31, 168–174).

Istota wynalazku polega na tym, że regioselektywne wprowadzenie grupy hydroksylowej w cząsteczce substratu, którym jest 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-on (DHEA), w wyniku którego otrzymuje się 3 β ,7 α -dihydroksyandrost-5-en-17-on, reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Fusarium acuminatum* KCh S1.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Fusarium acuminatum* KCh S1. 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. 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.

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 godziny.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Fusarium acuminatum* KCh S1, następuje stereoselektywna 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 z wydajnością izolowaną na poziomie 80% (udział procentowy według GC = 97%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Metoda izolowania szczepu *Fusarium acuminatum* KCh S1

Próbkę gleby pobranej na Śmietniku – Wrocław, dzielnica Nadodrze, ul. Jedności Narodowej 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 zaszczepiono płytki agarowe (sterylne plastikowe płytki z 20 ml pożywki stałej o składzie: glukoza 3%, aminobak 1%, agar 0,8%). Z jednego z rozcieńczeń wyodrębniono czystą kulturę szczepu *Fusarium acuminatum* KCh S1, 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.

P r z y k ł a d. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Fusarium acuminatum* KCh S1 o sekwencji 1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3β-hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ 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 80 mg 3β,7α-dihydroksyandrost-5-en-17-onu (wydajność 80%, udział procentowy według = 97%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 0.87 (s, 3H, 18-H); 1.01 (s, 3H, 19-H); 1.11 (td, 1H, *J* = 13.4, 3.8 Hz, 1-Hα); 1.23-1.31 (m, 2H, 9-H, 12-Hα); 1.49 (td, 1H, *J* = 13.1, 4.3 Hz, 11-Hα); 1.50-1.60 (m, 2H, 2-Hα, 15-Hα); 1.64–1.72 (m, 2H, 8-H, 11-Hβ); 1.78 (td, 1H, *J* = 12.1, 5.3 Hz, 14-H); 1.80-1.89 (m, 3H, 1-Hβ, 2-Hβ, 12-Hβ); 2.07-2.17 (m, 2H, 15-Hβ, 16-Hα); 2.29 (br t, 1H, *J* = 12.3 Hz, 4-Ha); 2.35 (ddd, 1H, *J* = 13.3, 4.8, 2.0 Hz, 4-Hβ); 2.33 (dd, 1H, *J* = 13.1, 4.6 Hz, 16-Hβ); 3.56 (tt, 1H, *J* = 11.3, 4.7 Hz, 3-Hα); 3.96 (br t, 1H, *J* = 3.8 Hz, 7-Hβ); 5.63 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.2 Hz, 6-H).

¹³C NMR (151MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 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).

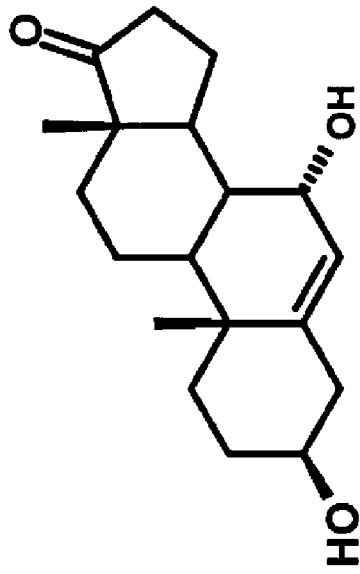
Sekwencja 1

TCTACTGATCCGAGGTCACATTCAGAAGTTGGGGTTTTACGGCATGG
CCGCGCCGCGTTCCAGTTGCGAGGTGTTAGCTACTACGCAATGGAG
GCTGCAGCGAGACCGCCAATGTATTTCTGGGGGCGGCACCGCCCAGA
AGGGCAGAGCCGATCCCCAACACCAAACCCGGGGGCTTGAGGGTTG
AAATGACGCTCGAACAGGGCATGCCCGCCGGAATACCAGCGGGCGC
AATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACAT
TACTTATCGCATTTTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGA
TCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTTATTTGTTTGTCTTACTCAGAAGTTAC
AATAAGAAACATTAGAGTTTGGGTCCTCTGGCGGGCCGTCCTCGTTTT
ACGGGGCGCGGGCTGATCCGCCGAGGCAACATTAAGGTATGTTAC
AGGGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCA
CCAAC

Zastrzeżenia patentowe

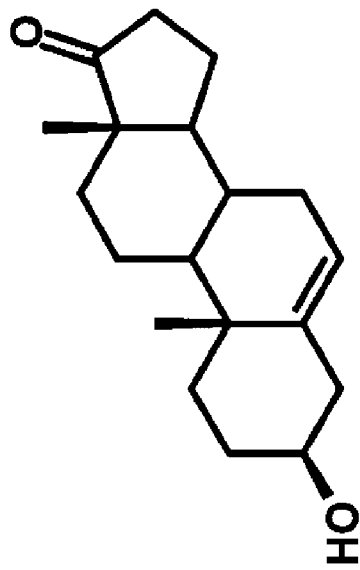
1. Sposób wytwarzania 3 β ,7 α -dihydroksyandrost-5-en-17-onu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Fusarium acuminatum* KCh S1 o sekwencji 1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-on o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, 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 β 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 zastrz. 1, **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 12 godziny.

Rysunek



Wzór 2

Fusarium acuminatum
KCh S1



Wzór 1