

(12) **Opis zgłoszeniowy wynalazku**
(z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **442098**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.26**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.03.04 BUP 10/2024**

(51) MKP:

C12P 33/10 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(71) Zgłaszający:
**UNIwersytet PRZYRODniczy
WE WROCLAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y):
**PAULINA ŁYCZKO, Wrocław, PL
ALINA ŚWIZDOR, Wrocław, PL
ANNA PANEK, Wrocław, PL**

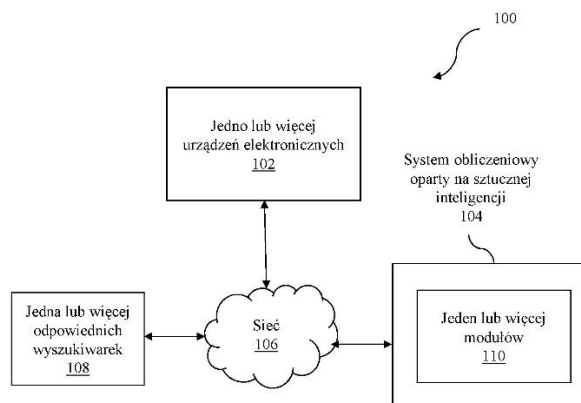
(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu

(57) Skróć opisu:

Zgłoszenie dotyczy sposobu wytwarzania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu, o wzorze 2, na drodze mikrobiologicznej hydroksylacji substratu, którym jest 19-nortestosteron, o wzorze 1, przy użyciu systemu enzymatycznego grzyba strzępkowego *Beauveria bassiana* KCH 1065.



Sposób wytwarzania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu, o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Sposobem, według wynalazku, można otrzymać związek, który ze względu na swoją aktywność biologiczną może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym oraz stanowić prekursor nowych steroidów o potencjale terapeutycznym.

19-Nortestosteron (nandrolon) jest syntetycznym steroidem o aktywności anabolicznej i androgennej. Związek ten znalazł zastosowanie w terapii osteoporozy oraz schorzeń mięśniowych spowodowanych przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) i chorobami nerek (Tatem A., et al., *Transl. Androl. Urol.* 2020, 9, 186-194). Badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że związek ten może również łagodzić stany lękowe (Kouvelas D. et al, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008, 11, 925-34).

Wprowadzenie grupy hydroksylowej do cząsteczki steroidowej może skutkować wzmocnieniem lub zmianą aktywności biologicznej cząsteczki (Donova M.V., Egorova O.V., *App. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 94, 1423-1447; El Kihel L., *Steroids*, 2012, 77, 10-26). Obecność grupy hydroksylowej powoduje jednocześnie wzrost polarności związku i ułatwia przeprowadzanie kolejnych przemian strukturalnych cząsteczki.

11 α -Hydroksysteroidy są jednymi z najważniejszych produktów pośrednich w światowej produkcji glukokortykoidów (Felpeto-Santero C. et al., *Microb. Biotechnol.* 2021, 14, 2514–2524). 11 α -Hydroksy-19-nortestosteron charakteryzuje się niską aktywnością endokrynną i wykazuje silne właściwości immunomodulacyjne. W badaniach dotyczących leczenia drobiu wykazano, że związek ten znacząco wpływa na ochronę przed

wystąpieniem samoistnego autoimmunologicznego zapalenia tarczycy (Schuurs A. H. W. M. et al., *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1992, 97, 337–344).

Chemiczna synteza leków steroidowych wymaga zwykle przeprowadzania licznych operacji technologicznych, związanych m. in. Z koniecznością osłaniania niektórych grup funkcyjnych przed niespecyficznymi co do miejsca i konformacji reakcjami chemicznymi. W przeciwieństwie do metod chemicznych, transformacje mikrobiologiczne ze względu na wysoką regio- oraz stereoselektywność reakcji pozwalają modyfikować strukturę cząsteczek jednoetapowo. Przykładowo, mikrobiologiczna 11 α -hydroksylacja progesteronu prowadzona w kulturze *Rhizopus nigricans* umożliwiła redukcję liczby etapów procesu otrzymywania kortyzonu z 36 do 11, co znacząco wpłynęło na obniżenie ceny tego leku (Sarett L. H., 1947, U. S. Patent 2,462,133; Hogg, J. A. *Steroids* 1992, 57, 593–616).

Z opisu US 2,686,792 znany jest sposób otrzymywania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu jako jednego z dwóch produktów mikrobiologicznej hydroksylacji nortestosteronu przez *Rizopus reflexus*. W innym znanym przykładzie podczas transformacji 19-nortestosteronu w kulturze *Beauveria bassiana* AM446 uzyskano 11 α -hydroksy-19-nortestosteron z wydajnością 40,5% (Huszczka E. et al, *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 2005, 60, 103-108). Po czternastu dniach transformacji nandrolonu przy wykorzystaniu *Trichoderma hamatum* 11 α -hydroksy-nandrolon otrzymywany był z wydajnością 16% jako jeden z trzech produktów (Bartmańska A, Dmochowska – Gładysz J., *Enzyme Microb. Technol.* 2007, 40, 1615-1621).

Biotransformacje steroidów z udziałem szczepów należących do gatunku *Beauveria bassiana* prowadzą do otrzymania hydroksylowych i polihydroksylowych pochodnych (Kozłowska E. et al., *Sci. Rep.*, 2018, 8, 1-11; Gonzalez R et al., *Biocatal. Biotransformation*, 2017, 35, 103-109, Kollerov V. et al. *Phytochemistry*, 2019, 169, 112160; Hussain Z. et al., *RSC Advances* 2020, 10, 451-460). Hydroksylacje te zachodzą najczęściej w

pozycjach C-11 oraz C-7 szkieletu steroidowego. Szczep *Beauveria bassiana* KCH 1065 był ujawniony w literaturze jako biokatalizator w syntezie steroidowych 11α -hydroksy-D-laktonów.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla wzrostu grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek *Beauveria bassiana* KCH 1065 i inkubuje się ją przez kilka dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze $24-27^{\circ}\text{C}$. Po upływie co najmniej 48 godzin dodaje się substrat: nortestosteron, o wzorze 1, jako zawiesinę w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej przez 24 godziny w warunkach typowych dla hodowli mikroorganizmu. Uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, osusza i odparowuje rozpuszczalnik. W ten sposób otrzymuje się surowy produkt, który następnie oczyszcza się chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi $0,25\text{ g} : 1\text{ L}$.

Korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 24 godziny.

Korzystne jest, gdy jako ekstrahent stosuje się chloroform.

Korzystne jest także, gdy jako eluent stosuje się mieszaninę heksan:aceton, w proporcji objętościowej składników 2:1.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 11α -hydroksy-19-nortestosteronu jako jedyne produktu reakcji z wydajnością 92%, w temperaturze pokojowej i pH bliskim obojętnemu.

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 cm^3 zawiesiny komórek *Beauveria bassiana* KCH 1065. Hodowlę prowadzi się przez kolejne trzy dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze $24-27^{\circ}\text{C}$. Następnie do hodowli mikroorganizmu dodaje się 25 mg 19-nortestosteronu, o wzorze 1, w postaci zawiesiny w $0,5\text{ cm}^3$ acetonu.

Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez 24 godziny w warunkach, w których prowadzona była hodowla mikroorganizmu. Następnie uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Po oczyszczeniu surowego produktu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent mieszaninę heksan:aceton w proporcji objętościowej składników 2:1, otrzymuje się 23 mg 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu (wydajność izolowana 92% mol.), o wzorze 2.

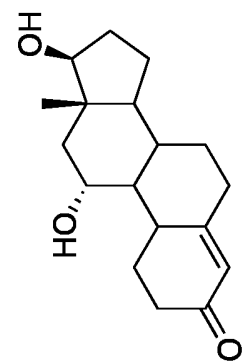
Uzyskany produkt 11 α -hydroksy-19-nortestosteron charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 0,82 (s, 3H, 18-H); 3.69-3,72 (m, 1H, 17 α -H); 3,87-3.91 (m, 1H, 11 β -H); 5,83 (s, 1H, 4-H);

^{13}C NMR (CDCl_3) δ (ppm): 200,6 (C-3); 167,2 (C-5); 124,5 (C-4); 81,1 (C-17); 72,1 (C-11); 54,8 (C-9); 48,9 (C-14); 48,1 (C-12); 44,0 (C-10); 43,7 (C-13); 40,1 (C-8); 36,2 (C-2); 36,0 (C-6); 31,5 (C-7); 30,5 (C-16); 29,7 (C-1); 23,1 (C-15); 12,0 (C-18).

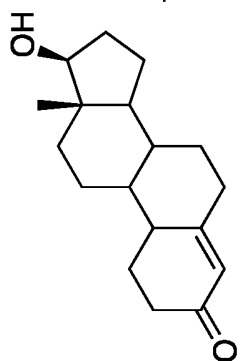
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 11 α -hydroksy-19-nortestosteronu na drodze transformacji mikrobiologicznej **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek *Beauveria bassiana* KCH 1065, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli dodaje się 19-nortestosteron o wzorze 1, jako zawiesinę w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 24°C do 27°C, przy ciągłym wstrząsaniu co najmniej 24 godziny, po czym produkt ekstrahuje się trzykrotnie rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, ekstrakt osusza i odparowuje rozpuszczalnik, otrzymując surowy produkt, który oczyszcza się chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,25 g:1 L.
3. Sposób według zastrz. 1., **znamienny tym**, że transformację prowadzi się przez 24 godziny.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako ekstrahent stosuje się chloroform.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako eluent stosuje się mieszaninę heksan:aceton, w proporcji objętościowej składników 2:1.



Wzór 2

Beauveria bassiana
KCH 1065



Wzór 1

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR **P.442098**

Klasyfikacja zgłoszenia: C12P 33/10, C12R 1/645		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: C12P C12R		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: STNext, EPODOC WPI (via EPOQUENET), bazy UPRP (e-wyszukiwarka), zasoby Internetu (via google.com)		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Huszcza E. et al., "Transformations of steroids by Beauveria bassiana.", Z Naturforsch C J Biosci. 2005, 60(1-2), pp. 103-108 doi: 10.1515/znc-2005-1-219	1-5
A	Świzdor A. et al., "Microbial Baeyer–Villiger oxidation of 5 α -steroids using Beauveria bassiana. A stereochemical requirement for the 11 α -hydroxylation and the lactonization pathway.", Steroids 2014, 82, pp. 44-52 doi: 10.1016/j.steroids.2014.01.006	1-5
A	Hussain Z. et al., "Seven new metabolites of drostanolone heptanoate by using Beauveria bassiana, and Macrophomina phaseolina cell suspension cultures.", RSC Advances 2020, 10, pp. 451-460 doi: 10.1039/c9ra05878h	1-5
A	WO2004011663 A2 (SCHERING AG; ZORN LUDWIG; BOHLMANN ROLF; GALLUS NORBERT; KUENZER HERMANN; MUHN HANS-PETER; NUBBEMEYER REINHARD) 05-02-2004	1-5
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a:

 Jolanta Gajewska
 Ekspert

Data:

28.04.2023

Podpis:

 /podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
 Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń z dnia 26 sierpnia 2022 roku.