

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246161 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442097**

(22) Data zgłoszenia: **2022.08.26**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.12.09 WUP 50/2024**

(51) MKP:

C12P 33/20 (2006.01)

C12P 33/12 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:

PAULINA ŁYCZKO, Wrocław, PL

ALINA ŚWIZDOR, Wrocław, PL

ANNA PANEK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób wytwarzania 19-nortestololaktanu

PL 246161 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 19-nortestolaktonu, o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Sposobem, według wynalazku, można otrzymać związek, który jako steroidowy lakton może znaleźć zastosowanie jako terapeutyk lub prekursor nowych steroidowych pochodnych o potencjale terapeutycznym.

Cząsteczki steroidowe z ugrupowaniem laktonowym w pierścieniu D wykazują aktywność przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną, antyhipercholesterolemiczną i antyandrogeniczną (Brodie A.M.H. and Njar V.C. O., J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 1998, 66, 1–10; Bydal P. et al., Eur. J. Med. Chem. 2009, 44, 632–644). Lakton 1-dehydrotestosteronu (testolakton) należy do inhibitorów aromatazy (Lone S. H. et al., New J. Chem. 2018, 42, 4579–4589) – związków, które hamują rozwój hormono-zależnych nowotworów i stosowane są w terapii dolegliwości związanych z zaburzeniami równowagi hormonalnej, np. w ginekomastii i przedwczesnym dojrzewaniu (Serafini G. E., Moslemi S., Mol. Cell. Endocrinol. 2001, 178, 117–131).

19-Nortestosteron jest syntetycznym steroidem o aktywności anabolicznej i androgennej. Związek ten stymuluje wzrost tkanek mięśniowych, dlatego znalazł zastosowanie m.in. w terapii rozległych oparzeń i osteoporozy. Wykorzystywany jest w leczeniu zaniku mięśni spowodowanym przez schorzenia takie jak przewlekła obturacyjna choroba płuc (POChP), przewlekła niewydolność nerek czy AIDS. (Tatem A., et al., Transl. Androl. Urol. 2020, 9, 186–194; Wu C. Kovac J. R., Curr Urol Rep. 2016, 17, 72). Badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że związek ten może również łagodzić stany lękowe (Kouvelas D. et al., Int. J. Neuropsychopharmacol. 2008, 11, 925–34).

Jedną z metod wprowadzenia do cząsteczki ugrupowania laktonowego jest chemiczna reakcja Baeyera-Villigera, polegająca na utlenianiu ketonów za pomocą nadkwasów albo nadtlenków. Utleniacze takie są często toksyczne i niestabilne, dlatego ich stosowanie skutkuje zanieczyszczaniem środowiska naturalnego. Dodatkowo w reakcjach, w których substratem jest związek zawierający inne wrażliwe na utlenianie grupy funkcyjne, stosowanie metody chemicznej związane jest z powstawaniem produktów ubocznych reakcji.

Alternatywą wobec utleniania chemicznego jest otrzymywanie laktonów na drodze mikrobiologicznej, z wykorzystaniem aparatu enzymatycznego drobnoustrojów zdolnych do przeprowadzania reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera. Dodatkową zaletą utleniania enzymatycznego jest wysoka selektywność reakcji i często brak produktów ubocznych.

Znany jest sposób otrzymywania 19-nortestolaktonu jako jednego z pięciu produktów 72 godzinnej reakcji mikrobiologicznego utleniania 19-nortestosteronu przez *Aspergillus tamarii*. 19-Nortestolakton powstawał w tej reakcji z wydajnością 69% (McCurdy J. T. and Garrett R. D., J. Org. Chem. 1968, 33, 660–661).

W innym znanym przykładzie, podczas kilkudniowej transformacji 19-nortestosteronu w kulturze *Penicillium notatum* uzyskano 19-nortestolakton z wydajnością 93% (Bartmańska A. et al., Steroids 2005, 70, 193–198).

Z kolei opis patentowy Pat.239842 ujawnia otrzymanie 19-nortestolaktonu z 19-nortestosteronu z wydajnością 90%, po sześciu dniach transformacji przy wykorzystaniu *Penicillium vinaceum* AM110.

Aktywność biokatalityczna szczepu *Fusicoccum amygdali* AM258 w reakcji utlenienia typu Baeyera-Villigera była wcześniej ujawniona w literaturze. Szczep ten wykorzystany był do otrzymywania steroidowego laktonu (3 β -hydroksy-17 α -oksa-D-homo-androst-5-en-7,17-dionu) z 7-okso-DHEA.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla wzrostu grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek *Fusicoccum amygdali* AM258 i inkubuje się ją przez kilka dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 24–27°C. Po upływie co najmniej 4 dni dodaje się substrat: 19-nortestosteron, 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 g : 1 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 19-nortestolaktanu jako jedyne go produktu w krótkim czasie 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 cm³ zawiesiny komórek *Fusicoccum amygdali* AM258. Hodowlę prowadzi się przez kolejne cztery dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 24–27°C. Następnie do hodowli mikroorganizmu dodaje się 25 mg 19-nortestosteronu, o wzorze 1, w postaci zawiesiny w 0,5 cm³ 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. Wydajność otrzymania surowego produktu według danych chromatograficznych (GC) wynosi 96%. Po oczyszczeniu surowego produktu za pomocą chromatografii kolumnowej, stosując jako eluent mieszaninę heksan : aceton w proporcji objętościowej składników 2:1, otrzymuje się 23 mg 19-nortestolaktanu (wydajność izolowana 92% mol.), o wzorze 2.

Uzyskany produkt 19-nortestolaktan charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1,36 (s, 3H, 18-H); 2,60 (m, 1H, 16α-H); 2,69 (m, 1H, 16β-H); 5,84 (s, 1H, 4-H);

¹³C NMR (CDCl₃) δ (ppm): 199,1 (C-17); 171,2 (C-3); 164,8 (C-5); 124,9 (C-4); 83 (C-13); 48,4 (C-9); 45,0 (C-14); 42,6 (C-12); 42,1 (C-10); 38,6 (C-8); 36,4 (C-2); 35,2 (C-6); 29,4 (C-7); 28,5 (C-16); 26,7 (C-11); 26,2 (C-1); 20,1 (C-15); 19,7 (C-18).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 19-nortestolaktanu na drodze transformacji mikrobiologicznej, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się zawiesinę komórek *Fusicoccum amygdali* AM258, następnie po upływie co najmniej 4 dni 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 się i odparowuje rozpuszczalnik, w wyniku tych operacji otrzymuje się 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.

Rysunek

