



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **420947**

(51) Int.Cl.
C12P 33/06 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.03.2017**

(54)

Sposób wytwarzania 3 β ,6 β -dihydroksyandrost-4-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
ANNA KANCELISTA, Siechnice, PL
REGINA STEMPNIEWICZ, Wrocław, PL
MICHAŁ OSKIERA, Żyrardów, PL
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 3 β ,6 β -di-hydroksyandrost-4-en-17-onu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle chemicznym i farmaceutycznym do wytwarzania leku stosowanego w terapii hormonalnej (A.S. Clark, E.V. Harrold, A.S. Fast; Anabolic – androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav* 31, 1997, 35–46).

3 β ,6 β -Dihydroksyandrost-4-en-17-onu jest prekursorem disulfonianu 3 β ,6 β -dihydroksycholestanu, związku o wysokiej aktywności hamującej wzrost komórek ludzkiego raka prostaty (Cui J., Wang H, Huang Y, Xin Y, Zhou A, (2009) Synthesis and cytotoxic analysis of some disodium 3 β ,6 β -dihydroksy-sterol disulfates. *Steroids* 74 1057–1060).

Leki steroidowe są po antybiotykach drugą co do wielkości grupą leków, odgrywającą ważną rolę w leczeniu i zapobieganiu różnym chorobom (Zhang WQ, Shao ML, Rao ZM, Xu MJ, Zhang X, Yang TW, Li H, Xu ZH (2013) Bioconversion of 4-androstene-3,17-dione to androst-1,4-diene-3,17-dione recombinant *Bacillus subtilis* expressing ksdd gene encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* JC-12. *J Steroid Biochem Mol Biol* 135:36–42).

Biotransformacje są ekologiczną alternatywą względem klasycznej syntezy chemicznej w uzyskiwaniu aktywnych związków i są coraz częściej stosowane w przemyśle biofarmaceutycznym, zwłaszcza do produkcji leków steroidowych (M.-M. Chen, F.-Q. Wang, L.-C. Lin, K. Yao, D.-Z. Wei; Characterization and application of fusidane antibiotic biosynthesis enzyme 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase in steroid transformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 2012 133–142).

3 β ,6 β -dihydroksyandrost-4-en-17-onu był identyfikowany w niewielkich ilościach (2,5%) podczas inkubacji 7 α -DHEA w plazmie komórek nowotworowych raka piersi (Skinner S.J.M., Tobler C.J.P., Couch R.A.F. (1977) A radioimmunoassay for 7 α -hydroxydehydroepiandrosterone in human plasma. *Steroids* 30 315–330). Był również identyfikowany w moczu koni suplementowanych androst-4-en-3,6,17-trionem (G.N.W. Leung, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan, C.H.F. Wong, K.K.H. Lam, B.D. Stewart. (2010) *In vitro* and *in vivo* studies of androst-4-ene-3,6,17-trione in horses by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2010; 24: 744–751).

Nie są znane mikrobiologiczne metody uzyskiwania 3 β ,6 β -dihydroksyandrost-4-en-17-onu z 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-onu.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Trichoderma atroviride* KCh TRW. 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 trzy dni. Kolejny produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 g : 1 L.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez sześć dni.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Trichoderma atroviride* KCh TRW, następuje stereoselektywna redukcja grupy karbonylowej przy trzecim atomie węgla (C-3), która jest poprzedzona, regio- i stereoselektywnym wprowadzeniem grupy hydroksylowej przy szóstym atomie węgla (C-6), a to z kolei jest poprzedzone utlenieniem grupy hydroksylowej przy trzecim atomie węgla i izomeryzacją wiązania podwójnego z 5-en do 4-en. 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 β ,6 β -dihydroksyandrost-4-en-17-onu z wydajnością izolowaną na poziomie 23% (według GC > 31%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Metoda izolowania szczepu *Trichoderma atroviride* KCh TRW.

Próbkę gleby pobranej w Parku Tołpy – Wrocław, dzielnica Ołbin przeniesiono do sterylnej gilzy. Następnie w warunkach aseptycznych 1 g gleby rozpuszczono w 10 ml sterylnej wody. Pobrano 1 cm³ supernatantu i wykonano posiewy z kolejnych rozcieńczeń. Kolejnymi rozcieńczeniami badanego materiału zaszczerpiono 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 *Trichoderma*

atroviride KCh TRW, 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 *Trichoderma atroviride* KCh TRW o sekwencjach 1, 2, 3: KX538952 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 1, KX538954 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 2 oraz KX538956 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 3. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3β-hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ THF. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 6 dni. 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 3:2. 3β,6β-dihydroksyandrost-4-en-17-on znajduje się we frakcji o wyższej polarności.

Na tej drodze otrzymuje się 23,3 mg 3β,6β-dihydroksyandrost-4-en-17-onu (wydajność 23%, wydłóg GC > 31%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 0.88 (1H, ddd, *J* = 12.5, 10.9, 4.2 Hz, 9-H); 0.92 (s, 3H, 18-H); 1.21 (s, 3H, 19-H); 1.21–1.31 (m, 4H, 1-H_α, 7-H_α, 12-H_α, 14-H); 1.47 (qd, 1H, *J* = 13.3, 3.9 Hz, 11-H_β); 1.55–1.64 (m, 2H, 8-H, 15-H_β); 1.71 (ddd, 1H, *J* = 13.8, 7.0, 4.1 Hz, 11-H_α); 1.75 (dm, 1H, *J* = 14.4 Hz, 2-H_α); 1.83 (ddd, 1H, *J* = 14.3, 4.5, 3.9 Hz, 2-H_β); 1.85 (ddd, 1H, *J* = 13.2, 4.1, 2.9 Hz, 12-H_β); 1.96 (ddd, 1H, *J* = 12.4, 8.2, 5.9 Hz, 15-H_α); 2.02–2.09, 2H, 1-H_β, 7-H_β); 2.09 (dt, 1H, *J* = 19.2, 9.5 Hz, 16-H_α); 2.46 (ddd, 1H, *J* = 18.5, 8.5, 0.8 Hz, 16-H_β); 4.14 (td, 1H, *J* = 4.5, 2.0 Hz, 3-H_α); 4.29 (t, 1H, *J* = 2.8 Hz, 6-H_α); 5.73 (dd, 1H, *J* = 4.7, 1.2 Hz, 4-H).

¹³C NMR (151MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 13,95 (C-18); 20,64 (C-11); 20,83 (C-19); 21,91 (C-15); 27,94 (C-2); 29,84 (C-1); 31,59 (C-12); 32,65 (C-8); 35,97 (C-16); 37,19 (C-10); 37,81 (C-7); 47,92 (C-13); 51,24 (C-14); 53,97 (C-9); 63,81 (C-3); 74,44 (C-6); 126,66 (C-4); 149,50 (C-5); 221,18 (C-17).

TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGA
 ACCATACCAAACCTGTTGCCTCGGCGGGGTACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCCG
 CGGAGGGACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGAGCAAAAATT
 CAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
 ATAAGTAATGTGAATTGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTC
 TGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCAATTC AACCCCTCGAACCCCTCCGGGGGGTGGCGTTGGGGACCTC
 GGGAGCCCCCTAAGACGGGATCCCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCAGT
 AGTTTGCACAACCTCGACCGGAGCGCGGCGGTCCACGTCCGTAAACACCCAACCTCTGAAATGTTGA
 CCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

Sekwencja 1

CGTTACACTTTTGCTTCTACACTTTCCCATTTGCGTCTGACCAATACACCCATCGGAAGAGATGGTAAGCTG
 GCGAAGCCTCGACAGCTCCACAACACACACTGGGGTTTTGGTGTGCCCGGCTGAGACCCCTGAAGGTCAAG
 CTTGTGGTCTGGTCAAGAATTTGTCTCATGTGCTACGTCAGTGTGGATCTCCTTCTGAGCCTTTGATCG
 AGTTTATGATCAACAGAGGTATGGAAGTCGTTGAGGAGTATGAGCCACTGAGGTATCCCCATGCTACAAA
 GATCTTTGTGAATGGTGTCTGGGTTGGAATCCACCAAGACCCCAAGCATCTGGTAAACCAAGTTTTGGATA
 CTCGTCGCAAACTCTATCTGCAGTACGAGGTCTCTGATCAGAGAAATTCGAGACCAAGAATTCAAAATC
 TTCTGACGCCGGCGTGTATGCGTCCCGTCTTCACTGTACAGCAGGAAGATGACCCGGAACGGGTA
 TCAACAAGGGCCACCTGGTTTTGACCAAGGACCTTGTAATAGACTGGCCAAAGAGCAGGCTGAGCCTCC
 AGAAGACCCCAAGCATGAAGCTCGGATGGGAAGGGCTGATTAGAGCTGGTGCAGTGGGAATATCTCGACGC
 CGAGGAAGAAGAAACGTCCATGATTTGCATGACACCGGAGGATCTGGAGCTCTATCGTCTTCAAAGGCC
 GGCATTGCCACGGATGAAGACATAGGAGACGATCAAATAAGCGTCTCAAGACCAAGACAAATCCGACA
 ACTCATATGATACGCATTGCGAGATTCACCCGAGTATGATCTTAGGTATCTGTGCTAGTATCATTCCTTTC
 CCCGATCACAACCAGGTATGTCAACCCGAGAAGCTATCCTTTTCCCCCTTTGTCCAACCTTTTCTAGTCCCCTAC
 GGTGAGATCGCTAATTGATGCTATACAGTCCCCCGTAACACCTACCAAGTCTGCCATGGGTAAACAAGCCA
 TGGGCTTCTTCTAACCAACTATTCTCGGCGTATGGACACCATGGCCAATATCCTCTACTACCCCTCAGAAAC
 CGCTGGGCACTACTCGTCTATGGAGTTTTTGAATTCGTTGAGCTGCCAGCCGGACAAAACGCC

Sekwencja 2

TGTCGACAATTCTGCTCAGTCTTGTCAATTTTTTCTCGCAGCATCACACCCCGCTTTACCTGTCTACCC
 CTCCTTTGGCACAGCAAAATTTCTGGCTGCCTTGTGGCTTTTAGTGGGGTGCCAACCTTTTTTTGTTTGG
 CTGCAACCCCGCTATCGCCACTGTCCCGTCCCAACGAATTGACTCAATTGCATCGTCTTCTCCATCTCTGTG
 TGGTTCATTGTGCTAATCATGCTTCAATCAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGCAAGGGTCTTTCAAGTATG
 CGTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTT
 CGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTCGCTTTTCTCATTGATACTTGGAGACCAAG
 ATTCTAACGTGCCGCTCTGTAGACGCTCCCGGTACCGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCC
 CAGGCTGACTGCGCTATCCTGATTATCGCTGCCGCTACTGGTGGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATG
 GCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACCCCTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAG
 ATGGACACTGCCAACTGGGCCGAGGCTCGTTACCTTGAGATCATCAAGGAGACCTCAAACCTTCAACAAG
 AGGTCGGCTTCAACCCCAAGACCGTTGCCCTCGTCCCATCTCCGGCTTCAACGGCGACAACATGTTGGCT
 GCCTCCAACTGCCCTGTACAAGGGCTGGGAGAAGGAGACCAAGGCTGGCAAGTCCACCCGGCAAG
 ACCCTTCTCGAGGCCATTGACGCCATTGAGCCCCCAAGCGTCCACAGACAAGCCCCCTCGTCTTCCCCTT
 CAGGATGTTTACAAGATCGGTGGTATTGGAACAGTCCCTGTCCGGCGTATCGAGACTGGTATCCTCAAGC
 CCGGTATGGTGGTTACCTTCGCTCCCTCAACGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTTGAGATGCACCACGAG
 CAGCTCGTCGAGGGTGTCCCGGTGACAACGTTGGATTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGATATCC
 GCCGTGGTAAACGTTGCCGGTACTCCAAGAACGACCCCCCATGGGTGCCGCTTCTTCAACGCCCAAGGTC
 ATCGTCATGAACCACCTGGCCAGGTCGGTGCCGGATA

Sekwencja 3

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 3 β ,6 β -dihydroksyandrost-4-en-17-onu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Trichoderma atroviride* KCh TRW o sekwencjach 1 2, 3: KX538952 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 1, KX538954 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 2 oraz KX538956 przedstawionej na rysunku jako sekwencja 3, 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 najmniej 3 dni, 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 0,2 g : 1 L.
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 6 dni.

Rysunek

