

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235287**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **420186**

(51) Int.Cl.
C12P 33/02 (2006.01)
C12R 1/66 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.01.2017**

(54)

Sposób wytwarzania androst-1,4-dien-3,17-dionu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.12.2017 BUP 26/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

15.06.2020 WUP 07/20

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 235287 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania androst-1,4-dien-3,17-dionu.

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).

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 by 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 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). Wprowadzenie wiązania podwójnego między pierwszym i drugim atomem węgla w pierścieniu A związku steroidowego może zwiększyć aktywność biologiczną nowo powstałego związku. Chemiczne metody otrzymywania 1-en-steroidów są wielostopniowe i mogą prowadzić do spontanicznej aromatyzacji pierścienia A (Y. Li, F. Lu, T. Sun, L. Du; Expression of *ksdD* gene encoding 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol*, 44, 2007, 563–568).

Znane są mikrobiologiczne metody uzyskiwania androst-1,4-dien-3,17-dionu z androst-4-en-3,17-dionu w wyniku zastosowania szczepów bakterii z rodzaju: *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter* (L.F. de las Heras, R. van der Geize, O. Drzyzga, J. Perera, J.M.N. Llorens, Molecular characterization of three 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase isoenzymes of *Rhodococcus ruber* strain Chol-4, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 132 (2012) 271–281; M. Kisiela, A. Skarka, B. Ebert, E. Master, Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – a bioinformatic perspective, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 129 (1–2) (2012) 31–46).

Znana jest metoda uzyskania androst-1,4-dien-3,17-dionu z 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-onu z zastosowaniem szczepu grzyba strzępkowego *Fusarium oxysporum* SC 1301, jednak w metodzie tej androst-1,4-dien-3,17-dion jest produktem pośrednim i ulega dalszemu przekształceniu do testolaktonu (H. Zhang, J. Ren, Y. Wang, C. Sheng, Q. Wu, A. Diao, D. Zhu. Effective multi-step functional biotransformations of steroids by a newly isolated *Fusarium oxysporum* SC1301. *Tetrahedron* 69 (2013) 184–189).

Istota wynalazku polega na tym, że regioselektywne wprowadzenie podwójnego wiązania między pierwszym i drugim atomem węgla jest poprzedzone utlenieniem grupy hydroksylowej przy trzecim atomie węgla i izomeryzacją wiązania podwójnego z 5-en do 4-en w substracie, którym jest 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-on (DHEA), w wyniku tych przekształceń otrzymuje się androst-1,4-dien-3,17-dion, proces prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Aspergillus versicolor* KCh TJ1.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Aspergillus versicolor* KCh TJ1. 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 96 godzin. 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 144 godziny.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Aspergillus versicolor* KCh TJ1, następuje regioselektywne wprowadzenie podwójnego wiązania między pierwszym i drugim atomem węgla 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 androst-1,4-dien-3,17-dionu z wydajnością izolowaną na poziomie 48% (według GC > 56%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

Metoda izolowania szczepu *Aspergillus versicolor* KCh TJ1

Próbkę powietrza pobraną z pokoju autoklawowego Katedry Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50–375 Wrocław w warunkach aseptycznych zaszczerpiono płytki agarowe (sterylne plastikowe płytki z 20 ml pożywki stałej o składzie: glukoza 3%, aminobak 1%, agar 0,8%). Wyodrębniono czystą kulturę szczepu *Aspergillus versicolor* KCh TJ1, 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.

Przykład

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 *Aspergillus versicolor* KCh TJ1 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 tetrahydrofuranu. 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 2:1.

Na tej drodze otrzymuje się 48,0 mg androst-1,4-dien-3,17-dionu (wydajność 48%, według GC > 56%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

¹H NMR (600MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 0.93 (s, 3H, 18-H); 1.06-1.16 (m, 2H, 7-H_α, 9-H); 1.25 (s, 3H, 19-H); 1.23-1.29 (m, 2H, 12-H_α, 14-H); 1.58 (tt, 1H, J = 12.4, 9.2 Hz, 15-Hβ); 1.68 (qd, 1H, J = 13.3, 4.3 Hz, 11-Hβ); 1.80 (td, 1H, J = 11.1, 3.6 Hz, 8-H); 1.82-1.88 (m, 2H, 11-H_α, 12-Hβ); 1.95 (ddd, 1H, J = 12.4, 8.5, 6.2 Hz, 15-H_α); 2.04-2.12 (m, 2H, 7-Hβ, 16-H_α); 2.41 (ddd, 1H, J = 13.2, 3.7, 3.0 Hz, 6-H_α); 2.46 (dd, 1H, J = 19.4, 9.0 Hz, 16-Hβ); 2.50 (dt, 1H, J = 13.5, 4.9 Hz, 6-Hβ); 6.08 (br s, 1H, 4-H); 6.23 (dd, 1H, J = 10.2, 1.2 Hz, 2-H); 7.04 (d, 1H, J = 10.2 Hz, 1-H).

¹³C NMR (151MHz) (ppm) (CDCl₃) δ: 13,92 (C-18), 18,83 (C-19), 22,02 (C-15), 22,20 (C-11), 31,30 (C-12), 32,41 (C-7), 32,65 (C-6), 35,22 (C-8), 35,74 (C-16), 43,54 (C-10), 47,79 (C-13), 50,53 (C-4), 52,40 (C-9), 124,24 (C-4), 127,82 (O2), 155,43 (C-1), 168,44 (C-5), 186,33 (C-3), 220,03 (C-17).

```
CGGAGGACATTACTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACC
CGTGAATACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAACCCCTCGGGGGCGAG
CCGCCGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTG
AATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGGCATCGA
TGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGAGTGAA
TCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATG
CCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCCG
TCGTCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCC
GGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCGCTCGACTAGGGCCGGCCGG
GCGCCAGCCGACGTCTCCAACCATTTTTCTTCAGGTTGA
```

Sekwencja 1

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania androst-1,4-dien-3,17-dionu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Aspergillus versicolor* KCh TJ1 o sekwencji 1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest 3β-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 6 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

