RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237126**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421347**

(22) Data zgłoszenia: **20.04.2017**

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

(54) **Sposób wytwarzania 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
18.12.2017 BUP 26/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.03.2021 WUP 06/21

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
EWA KOZŁOWSKA, Wrocław, PL
MONIKA DYMARSKA, Wrocław, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECZKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 237126 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leków stosowanych w stanach ujemnego bilansu azotowego, np. w oparzeniach dużych powierzchni ciała, po radioterapii, stanach niedożywienia i wyniszczenia (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).

6α-Hydroksyandrost-4-en-3,17-dion był 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).

Związek wykazuje aktywność anaboliczną i jest na liście substancji zakazanych w sporcie (C.G. Georgakopoulos, A. Vonaparti, M. Stamou, P. Kiousi, E. Lyris, Y.S. Angelis, G. Tsoupras, B. Wuest, M.W.F. Nielen, I. Panderi, M. Koupparis (2007) Preventive doping control analysis: liquid and gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007; 21: 2439–2446). Oprócz właściwości anabolicznych jest również silnym inhibitorem aromatazy. Dzięki tej właściwości nie ulega przekształceniu do estrogenów i nie wykazuje właściwości androgennych (S. Mineki, M. Iida, K. Kato, F. Fukada, K. Kita, J. Nakamura, M. Yoshihama (1995) Microbial production of hydroxy-C_{19}-steroids as estrogen synthetase (P-450 aromatase) inhibitors. J. Ferment. Bioeng. 80, 223–228). 6α-Hydroksyandrost-4-en-3,17-dion jest produktem hydroksylacji androst-4-en-3,17-dionu w komórkach wątrobowych ssaków (L. Lootens, P. Van Eenoo, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, F.T. Delbeke (2009) The uPA(+/+)-SCID mouse with humanized liver as a model for *in vivo* metabolism of 4-androstene-3,17-dione. DMD. 37: 2367–2374).

Znana jest mikrobiologiczna metoda uzyskiwania 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu z 17β-hydroksyandrost-4-en-3-onu w wyniku zastosowania szczepu *Geobacillus kaustophilus* (S. Al-Tamimi, S. Al-Awadi, S. Oommen, M. Afzal (2010) Modification of progesterone and testosterone by a food-borne thermophile *Geobacillus kaustophilus*. Int. J. Food Sci. Nutr. 61: 78–86).

Nie jest znana mikrobiologiczna metoda uzyskiwania 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu z 3β-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 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 trzy dni. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,2 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, ujawnionego w opisie wynalazku P.420947, następuje regio- i stereoselektywne wprowadzenie grupy hydroksylowej przy szóstym atomie węgla (C-6) w pozycji ekwatorialnej, 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 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu z wydajnością izolowaną na poziomie 25% (według GC > 40%), w temperaturze pokojowej i przy pH naturalnym dla szczepu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d. Do kolby Erlenmajera o pojemności 2000 cm^3, w której znajduje się 500 cm^3 sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Trichoderma atroviride* KCh TRW. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3β-hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm^3 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 2:1. 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dion znajduje się we frakcji o niższej polarności.

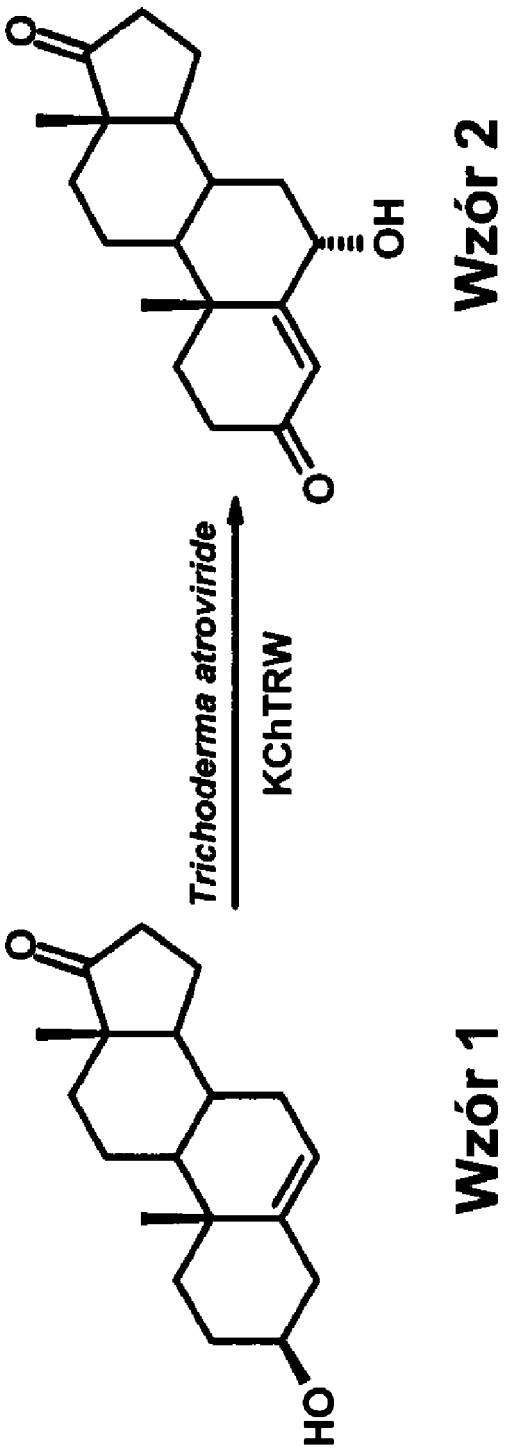
Na tej drodze otrzymuje się 24,9 mg 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu (wydajność 25%, według GC > 40%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

^{1}H NMR (600MHz) (ppm) ($CDCl_3$) δ: 0.92 (s, 3H, 18-H); 1.00 (ddd, 1H, *J* = 13.8, 9.3, 4.0 Hz, 9-H); 1.16 (q, 1H, *J* = 12.1 Hz, 7-Hα); 1.21 (s, 3H, 19-H); 1.28 (t, 1H, *J* = 13.2, 4.1 Hz, 12-Hα); 1.35 (ddd, 1H, *J* = 11.7, 10.5, 5.4 Hz, 14-H); 1.43 (qd, 1H, *J* = 13.2, 4.1 Hz, 11-Hβ); 1.60 (tt, 1H, *J* = 12.5, 9.2 Hz, 15-Hβ); 1.70 (ddd, 1H, *J* = 13.6, 6.9, 4.1 Hz, 11-Hα); 1.74-1.84 (m, 2H, 8-H, 1-Hα); 1.87 (ddd, 1H, *J* = 12.9, 3.9, 2.8 Hz, 12-Hβ); 2.00 (ddd, 1H, *J* = 11.4, 8.6, 5.9 Hz, 15-Hα); 2.05 (ddd, 1H, *J* = 13.4, 4.9, 3.7 Hz, 1-Hβ); 2.12 (dt, 1H, *J* = 19.4, 9.1 Hz, 16-Hα); 2.29 (ddd, 1H, *J* = 11.9, 5.5, 3.5 Hz, 7-Hβ); 2.37 (br dt, 1H, *J* = 16.8, 4.1 Hz, 2-Hα); 2.43 (ddd, 1H, *J* = 16.7, 14.2, 4.9 Hz, 2-Hβ); 2.49 (dd, 1H, *J* = 19.8, 8.7 Hz, 16-Hβ); 4.37 (ddd, 1H, *J* = 12.2, 5.5, 1.8 Hz, 6-Hβ); 6.20 (d, 1 H, *J* = 1.3 Hz, 4-H).

^{13}C NMR (1.51MHz) (ppm) ($CDCl_3$) δ: 13,84 (C-18); 18,41 (C-19); 20,45 (C-11); 21,89 (C-15); 31,28 (C-12); 33,86 (C-2); 33,89 (C-8); 35,84 (C-16); 36,42 (C-1); 39,19 (C-10); 40,16 (C-7); 47,69 (C-13); 50,71 (C-14); 53,91 (C-9); 68,45 (C-6); 120,19 (C-4); 170,79 (C-5); 199,37 (C-3); 220,11 (C-17).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 6α-hydroksyandrost-4-en-3,17-dionu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Trichoderma atroviride* KCh TRW, 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 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