

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237128**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422500**

(22) Data zgłoszenia: **09.08.2017**

(51) Int. Cl.
C12P 33/06 (2006.01)
C12P 33/10 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54)

Sposób wytwarzania 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

11.02.2019 BUP 04/19

(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
JORDAN SYCZ, Wałbrzych, PL
PATRYK KOWNACKI, Pawłowiczki, PL
EDYTA KOSTRZEWA-SUSŁOW, Wrocław, PL
TOMASZ JANECKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 237128 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leków o właściwościach antyzapalnych i regulujących prawidłowy rozwój ciąży.

11 α -hydroksyprogesteron jest ważnym związkiem farmaceutycznym. Ma działanie antyandrogenne i słabe właściwości estrogenne (J. Tamm, M. Seckelmann, U. Volkwein, E. Ludwig, The effect of the antiandrogen 11 α -hydroxyprogesterone on sebum production and cholesterol concentration of sebum, Br. J. Dermatol. 107 (1982) 63–70). Aktywuje procesy ułatwiające zagnieżdżeniu się zapłodnionej komórce jajowej w macicy (A.H. van der Willigen, J.D. Peereboom-Wynia, T. van Joost, E. Stolz, A preliminary study of the effect of 11 α -hydroxyprogesterone on the hair growth in men suffering from androgenetic alopecia, Acta Derm. Venereol 67(1987) 82–85; J. Nikolaus, K.T. Nguyen, C. Virus, J.L. Riehm, M. Hutter, R. Bernhardt, Engineering of CYP106A2 for steroid 9 α - and 6 β -hydroxylation. Steroids 120 (2017) 41–48). Ponadto, 11 α -hydroksyprogesteron wpływa na regulację ciśnienia krwi, powodując selektywne hamowanie dehydrogenazy 11 β -hydroksysteroidowej typu 2. Ten enzym metabolizuje kortyzol do kortyzonu u ludzi, a zatem związek ten jest ważny w regulacji równowagi elektrolitowej nerek (H. Morita, M. Zhou, M.F. Foecking, E.P. Gomez-Sanchez, E.N. Cozza, C.E. Gomez-Sanchez, 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 complementary deoxyribonucleic acid stably transfected into Chinese hamster ovary cells: specific inhibition by 11 α -hydroxyprogesterone, Endocrinol 137 (1996) 2308–2314; G.W. Souness, D.J. Morris, 11 α - and 11 β -hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, possess hypertensinogenic activity in the rat, Hypertension 27 (1996) 421–425). Ponadto jako substrat można stosować 11 α -hydroksyprogesteron do wytwarzania kortyzonu i hydrokortyzonu (J.A. Hogg, P.F. Beal, A.H. Nathan, F.H. Lincoln, W.P. Schneider, B.J. Magerlein, A. R. Hanze, R.W. Jackson, The adrenal hormones and related compounds. I. A “direct” synthesis of hydrocortisone acetate and cortisone acetate from 11 α -hydroxyprogesterone, J. Am. Chem. Soc. 77 (16) (1955) 4436–4438; J. Fried, R.W. Thoma, J.R. Gerke, J.E. Herz, M.N. Donin, D. Perlman, Oxidation of steroids by microorganisms. II. hydroxylations in position 11 and synthesis of cortisone from Reichenstein’s compound S, J. Am. Chem. Soc. 74 (15) (1952) 3962–3963). 6 β -hydroksyprogesteron może być stosowany jako substrat do syntezy 6b,14 α -dihydroksyandrost-4-eno-3,17-dionu – inhibitora wzrostu komórek raka piersi (H. Yoshioka, S. Asada, S. Fujita (1994), Process for production of 6 β , 14 α -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, European Patent 5: 99, 658). Stwierdzono również, że 6 β -hydroksyprogesteron hamuje aktywność 5 α -reduktazy steroidowej u samców szczurów. Dlatego jest on interesującym związkiem pod kątem wytwarzania nowych przeciw nowotworom gruczołu krokowego (A. Yamada, M. Yamada, Y. Fujita, T. Nishigami, K. Nakasho, K. Uematsu, Selfaugmentation effect of male-specific products on sexually differentiated progesterone metabolism in adult male rat liver microsomes, J. Biol. Chem. 276 (2001) 4604–S4610).

Znane są mikrobiologiczne metody otrzymywania 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu z progesteronu: – z wydajnością 65.5% w wyniku zastosowania szczepu *Rhizomucor pusillus* (Habibi Z, Yousefi M, Ghanian S, Mohammadi M, Ghasemi S. Biotransformation of progesterone by *Absidia griseolla* var. *igachii* and *Rhizomucor pusillus*. Steroids 77 (2012) 1446–1449.); – w wyniku zastosowania 10 mg progesteronu w kulturze szczepu *Acremonium chrysogenum* oraz *Absidia griseolla* uzyskano odpowiednio 2,72 i 3,73 mg (Yousefi M, Mohammadi M, Habibi Z, Shafiee A. Biotransformation of Progesterone by *Acremonium chrysogenum* and *Absidia griseolla* var. *igachii*. Biocatalysis and Biotransformation, 2010; 28(4): 254–258.); – z wydajnością 21% w wyniku zastosowania szczepu *Mucor* M881 (Kolet SP, Nilofarjahan S, Halder S, Gonnade R, Thulasiram HV. Biocatalyst mediated production of 6b, 11a-dihydroxy derivatives of 4-ene-3-one steroids. Steroids 78 (2013) 1152–1158); – w kulturach czterech szczepów z rodzaju *Trichoderma* (*T. aureoviride*, *T. hamatum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*) (El-Kadi I.A., Eman Mostafa M. Hydroxylation of Progesterone by Some *Trichoderma* Species. Folia Microbiol. 49 (3), (2004) 285–290); – z wydajnością 17% w wyniku zastosowania szczepu *Beauveria bassiana* (Świzdor A, Kołek T, Panek A, Białońska A Microbial Baeyer-Villiger oxidation of steroidal ketones using *Beauveria bassiana*: Presence of an 11 α -hydroxyl group essential to generation of D-homo lactones. Biochimica et Biophysica Acta 1811 (2011) 253–262).

Istota wynalazku polega na tym, że regioselektywne wprowadzenie dwóch grup hydroksylowych w cząsteczce substratu, którym jest progesteron, w wyniku którego otrzymuje się 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteron, a reakcję prowadzi się w wodnej kulturze szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1.

Istota wynalazku polega na tym, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1. Po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest progesteron o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszącym się z wodą. Transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 12 godzin. Kolejno produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.

Korzystnie jest, gdy stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.

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

Dodatkowo, korzystnie jest, gdy transformację prowadzi się przez 24 godziny.

Postępując zgodnie z wynalazkiem, w wyniku działania układu enzymatycznego zawartego w komórkach szczepu *Isaria farinosa* KCh KW1.1, następuje stereoselektywna hydroksylacja przy atomie węgla C-6 i C-11. Uzyskany w ten sposób produkt wydziela się z wodnej kultury mikroorganizmu, znanym sposobem, przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą (chloroform).

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu z wydajnością izolowaną na poziomie 20% (konwersja substratu według GC = 100%; udział procentowy w mieszaninie reakcyjnej > 80%), 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 cm³, w której znajduje się 500 cm³ sterylnej pożywki zawierającej 5 g aminobaku i 15 g glukozy, wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1. Po 72 godzinach jego wzrostu dodaje się 100 mg 3 β -hydroksyandrost-5-en-17-onu o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm³ DMSO. Transformację prowadzi się w 25 stopniach Celsjusza przy ciągłym wstrząsaniu przez 24 godziny. 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 20 mg 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu (wydajność 20%, konwersja substratu według GC = 100%; udział procentowy w mieszaninie reakcyjnej > 80%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

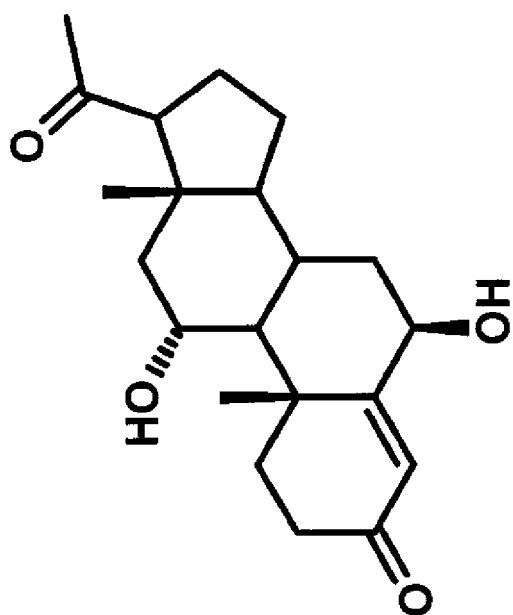
¹H NMR (600MHz) (ppm) (CDCl₃) δ : 0.73 (s, 3H, 18-H); 1.10 (t, 1H, J = 10.3 Hz, 9-H); 1.27-1.32 (m, 2H, 14-H, 15-H β); 1.50 (s, 3H, 19-H); 1.51 (t, 1H, J = 11.4 Hz, 12-H α); 1.67-1.78 (m, 2H, 15-H α , 16-H α); 1.92 (td, 1H, J = 14.4, 4.4 Hz, 1-H α); 1.99 (dt, 1H, J = 13.9, 3.0 Hz, 7-H α); 2.01-2.07 (qd, 1H, J = 11.9, 2.7 Hz, 8-H); 2.13 (s, 3H, 21-H); 2.16-2.23 (m, 1H, 16-H β); 2.28-2.40 (m, 3H, 2-H α , 7-H β , 12-H β); 2.51-2.58 (m, 2H, 2-H β , 17-H α); 2.79 (ddd, 1H, J = 13.7, 4.8, 3.0 Hz, 1-H β); 4.09 (td, 1H, J = 10.6, 4.8 Hz, 11-H β); 4.34 (t, 1H, J = 2.8 Hz, 6-H α); 5.81 (s, 1H, 4-H).

¹³C NMR (151 MHz) (ppm) (CDCl₃) δ : 14,67 (C-18); 20,33 (C-19); 23,14 (C-16); 24,32 (C-15); 28,50 (C-8); 31,45 (C-21); 34,55 (C-2); 37,66 (C-7); 39,11 (C-1); 39,39 (C-10); 44,40 (C-13); 50,52 (C-12); 55,44 (C-14); 59,10 (C-9); 63,27 (C-17); 69,02 (C-11); 73,19 (C-6); 127,17 (C-4); 168,41 (C-5); 201,14 (C-3); 209,06 (C-20).

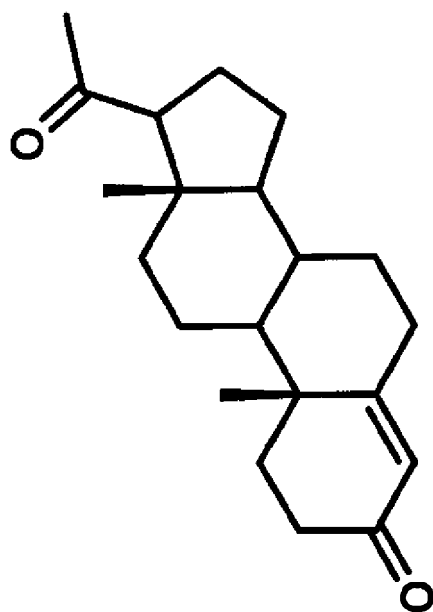
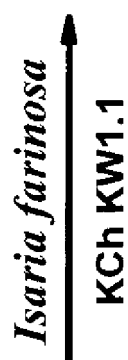
Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania 6 β ,11 α -dihydroksyprogesteronu, **znamienny tym**, że do podłoża odpowiedniego dla grzybów strzępkowych wprowadza się szczep *Isaria farinosa* KCh KW1.1, następnie po upływie co najmniej 48 godzin do hodowli wprowadza się substrat, którym jest progesteron o wzorze 1, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszącym się z wodą, transformację prowadzi się w temperaturze od 20 do 30 stopni Celsjusza, przy ciągłym wstrząsaniu, co najmniej 12 godzin, po czym produkt ekstrahuje się rozpuszczalnikiem organicznym niemieszącym się z wodą i oczyszcza chromatograficznie.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosunek masy dodawanego substratu do objętości hodowli wynosi 0,1 mg : 1 mL.
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 24 godziny.

Rysunek



Wzór 2



Wzór 1