

## Sposób wytwarzania octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu.

Metoda, według wynalazku może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym do wytwarzania leków stosowanych w kulturystyce (R.M. Duffy, B.D. Kelly; Steroids, psychosis and poly-substance abuse. *Irish Journal of Psychological Medicine*, 32, 2015, 227–230).

Biotransformacje są ekologiczną alternatywą względem klasycznej syntezy chemicznej w uzyskiwaniu aktywnych biologicznie związków i są coraz częściej stosowane w przemyśle farmaceutycznym, 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- $\Delta^1$ -dehydrogenase in steroid transformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 2012, 133–142). Wprowadzenie wiązania podwójnego między pierwszym i drugim atomem węgla w pierścieniu A octanu androst-4,6-dien-3-on-17-olu prowadzi do powstania octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu, związku o aktywności anabolicznej i/lub androgennej. Dodatkowo jest skutecznym inhibitorem aromatazy stosowanym podczas suplementowania innymi związkami

steroidowymi o wysokiej aktywności anabolicznej (M.K. Parr, G. Fußhöller, N. Schlörer, G. Opfermann, T. Piper, G. Rodchenkov, W. Schänzer. Metabolism of androsta-1,4,6-triene-3,17-dione and detection by gas chromatography/mass spectrometry in doping control. Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 2009, 207-218).

Chemiczne metody otrzymywania 1-en-steroidów są wieloetapowe i mogą prowadzić do spontanicznej aromatyzacji pierścienia A (Y. Li, F. Lu, T. Sun, L. Du; Expression of *ksdD* gene encoding 3-ketosteroid- $\Delta^1$ -dehydrogenase from *Arthrobacter simplex* in *Bacillus subtilis*. Lett Appl Microbiol, 44, 2007, 563–568).

Znana jest chemiczna metoda otrzymywania androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu z dehydroepiandostendionu (DHEA). W wyniku reakcji z 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinonu (DDQ) z DHEA z konwersją 61%. otrzymano androst-1,4,6-trien-3,17-dion, który poddaje się redukcji glinowodorkiem litu i otrzymuje androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu z konwersją 53% (E. Kim, E. Ma; Chemoselective reduction of 1,4,6-cholestatrien-3-one and 1,4,6-androstatriene-3,17-dione by various hydride reagents. *Steroids* 72, 2007, 360-367).

W dostępnej literaturze nie znaleziono metody mikrobiologicznego uzyskiwania octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu.

Istota wynalazku polega na tym, że regioselektywne wprowadzenie podwójnego wiązania między pierwszym i drugim atomem węgla w substracie, którym jest octan androst-4,6-dien-3-on-17-olu, w wyniku

którego otrzymuje się octan androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu, prowadzi się przy zastosowaniu preparatu enzymatycznego o aktywności Acmb pochodzącego natywnie ze szczepu bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S DSM: 13999 o sekwencji SEQ ID 1 albo pochodzącego z dowolnego mikroorganizmu wytwarzającego białko enzymatyczne o sekwencji aminokwasowej oznaczonej w bazie GenBank kodem akcesyjnym ABV59992.1, tj. o sekwencji zgodnej z SEQ ID 1 albo przy zastosowaniu preparatu enzymatycznego o sekwencji aminokwasów zgodnej w minimum 75% z sekwencją SEQ ID 1, która to sekwencja została zmieniona przez co najmniej jedną delecję, insercję, substytucję albo kombinację wyżej wymienionych, niezależnie od mikroorganizmu, w którym podlegał on ekspresji bądź nadekspresji. Stosuje się od 0,1 do 1 mg substratu na 1 ml preparatu. Substrat, rozpuszczony w rozpuszczalniku organicznym mieszającym się z wodą, wprowadzany jest do mieszaniny reakcyjnej złożonej z buforu utrzymującego pH w granicach od 6,0 do 7,5; akceptora elektronowego enzymu: heksacyjanożelazianu III potasu o stężeniu od 5 do 20mM oraz z 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny o stężeniu objętościowym od 2 do 10%, po czym produkt oczyszcza się metodą chromatograficzną.

Korzystne jest, gdy stężenie heksacyjanożelazianu III potasu wynosi 12,5mM.

Korzystne również jest, gdy stężenie 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny wynosi 8%.

Korzystne także jest, gdy oczyszczanie prowadzi się metodą SPE z polimerowymi kolumnkami chromatograficznymi Strata-X, stosując izopropanol jako eluent.

Korzystne również jest, gdy proces dehydrogenacji prowadzi się w temperaturze od 20 do 45°C.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu, o wysokiej aktywności inhibicyjnej względem aromatazy steroidowej, jako jedyne produktu reakcji, z wydajnością izolowaną 73% (konwersja według GC >99%), w temperaturze pokojowej.

Przykład 1. Procedura przygotowania preparatu enzymatycznego poprzedzona jest dwoma etapami prowadzącymi do pozyskania natywnego preparatu enzymatycznego z aktywnością Acmb: hodowlą bakteryjną oraz izolowaniem z masy bakteryjnej preparatu enzymatycznego o aktywności Acmb.

Hodowlę bakterii *Sterolibacterium denitrificans* Chol-1S (DSM: 13999) prowadzi się w środowisku beztlenowym według procedury opisanej w literaturze (Y.-R. Chiang, W. Ismail, M. Müller, G. Fuchs; Initial steps in the anoxic metabolism of cholesterol by the denitrifying *Sterolibacterium denitrificans*. J Biol Chem. 282, 2007, 13240–13249). Preparat enzymatyczny o aktywności Acmb pozyskuje się w warunkach tlenowych w formie homogenatu bakteryjnego (preparat enzymatyczny „homogenat” stanowiący białka rozpuszczalne i solubilizowane), otrzymanego w wyniku

rozbicia komórek, solubilizacji białek z błony i ultrawierwienia celem odseparowania frakcji błonowej.

Do bioreaktora o pojemności 15ml, zawierającego 100mM buforu fosforanowego o pH 7,5; wprowadzono 12,5mM heksacyjanożelazianu potasu, 8% 2-hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny (w/v) oraz 2,44mg octanu androst-4,6-dien-3-on-17-olu rozpuszczonego w 2-metoksyetanolu, tak by finalne stężenie 2-metoksyetanolu w reaktorze wyniosło 1,25% (v/v) oraz 0,3ml preparatu enzymatycznego o aktywności Acmb „homogenat”. Transformację prowadzi się w temperaturze pokojowej przy ciągłym wstrząsaniu przez 5 dni. Produkt oczyszczano metodą SPE stosując polimerowe kolumny chromatograficzne Strata-X, z 40% izopropanol/H<sub>2</sub>O i 100% izopropanolem jako czynnik elucyjny.

Na tej drodze otrzymano 1,78 mg octanu androst-1,4,6-trien-3-on-17-olu (wydajność 73%, stopień konwersji >93%).

Uzyskany produkt charakteryzuje się następującymi danymi spektralnymi:

<sup>1</sup>H NMR (600MHz) (ppm) (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 0.92 (s, 3H, 18-H); 1.20 (s, 3H, 19-H); 1.32–1.21 (m, 2H, 12-Ha, 14-H); 1.44 (ddd, 1H,  $J$  = 12.6, 10.1, 3.5 Hz, 9-H); 1.67–1.50 (m, 3H, 11-He, 15-He, 16-He); 1.88–1.79 (m, 3H, 11-Ha, 12-He, 15-Ha); 2.24 (ddd, 1H,  $J$  = 12.9, 9.5, 4.9 Hz, 16-Ha); 2.32 (t, 1H,  $J$  = 10.6 Hz, H-8); 4.65 (t, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, 17-Ha); 6.03 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz, 7-H); 6.04 (s, 1H, 4-H); 6.28 (d, 2H,  $J$  = 9.8 Hz, 2-H, 6-H); 7.09 (d, 1H,  $J$  = 10.2 Hz, 1-H). <sup>13</sup>C NMR (151MHz) (ppm) (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 186.26 (C-3), 171.02 (C-5), 162.19 (C-20), 152.69 (C-1), 137.20 (C-7), 128.23 (C-6),

128.01 (C-2), 124.02 (C-4), 81.97 (C-17), 48.34 (C-9), 48.28 (C-14), 43.08 (C-13), 41.16 (C-10), 37.88 (C-8), 36.50 (C-16), 27.45 (C-12), 23.08 (C-15), 21.40 (C-11), 21.09 (C-21), 20.76 (C-19), 12.06 (C-18),

Przykład 2: Alternatywną metodą otrzymywania enzymu Acmb jest przeprowadzenie hodowli *E.coli* (np. *E. coli* K38/pGP1-2) genetycznie zmodyfikowanej tak, by uzyskała zdolność do syntezy enzymu np. zgodnie z protokołem opisanym w publikacji (Y.-R. Chiang, W. Ismail, S. Gallien, D. Heintz, A. Van Dorsselaer, G. Fuchs; Cholest-4-en-3-one- $\Delta$ 1-dehydrogenase, a flavoprotein catalyzing the second step in anoxic cholesterol metabolism. *Appl Environ Microb*, 74, 2008, 107–113). Rekombinowany enzym oczyszczony na kolumnie powinowactwa typu Ni-NTA a następnie odsolony na kolumnie PD-10 jest bezpośrednio używany do reakcji.

Dalej postępuje się jak w przykładzie 1. Otrzymuje się produkt jak w przykładzie 1.

Przykład 3: Preparat enzymatyczny otrzymany jak w przykładzie 1, przy czym zmieniono kod genetyczny mikroorganizmu w wyniku czego otrzymano białko o sekwencji zgodnej w 75% z SEQ ID 1.

Dalej postępuje się jak w przykładzie 1. Otrzymuje się produkt jak w przykładzie 1.

Przykład 4: Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym że preparat enzymatyczny o aktywności Acmb pozyskany w warunkach tlenowych w formie homogenatu bakteryjnego, podczyszcza się w punkcie przebicia

kolumny na złożu DEAE-Sepharose (preparat enzymatyczny „po oczyszczeniu”) jak w artykule (J. Dermer, G. Fuchs; Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. J Biol Chem. 287, 2012, 36905–36916).

Przykład 5: Postępuje się jak w przykładzie 2, z tym że preparat enzymatyczny o aktywności Acmb pozyskany w warunkach tlenowych w formie homogenatu bakteryjnego podczyszcza się w punkcie przebicia kolumny na złożu DEAE-Sepharose (preparat enzymatyczny „po oczyszczeniu”) jak w artykule (J. Dermer, G. Fuchs; Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. J Biol Chem. 287, 2012, 36905–36916).

Przykład 6: Postępuje się jak w przykładzie 3, z tym że preparat enzymatyczny o aktywności Acmb pozyskany w warunkach tlenowych w formie homogenatu bakteryjnego podczyszcza się w punkcie przebicia kolumny na złożu DEAE-Sepharose (preparat enzymatyczny „po oczyszczeniu”) jak w artykule (J. Dermer, G. Fuchs; Molybdoenzyme that catalyzes the anaerobic hydroxylation of a tertiary carbon atom in the side chain of cholesterol. J Biol Chem. 287, 2012, 36905–36916).

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY  
WE WROCŁAWIU  
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław

RZECZNIK PATENTOWY  
  
dr inż. Anna Olszewska  
Nr upr. 3330