

## Sposób wytwarzania mieszaniny 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu i 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania mieszaniny 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu i 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu, o wzorze 2, przedstawionym na rysunku.

Sposobem, według wynalazku, można otrzymać związki, które ze względu na swoją aktywność biologiczną i możliwość przekształcenia w inne biologicznie aktywne pochodne, mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

Androsteron (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on) i jego 5 $\beta$ -izomer, etiocholanolon, są wytwarzane w organizmie jako metabolity testosteronu. Androsteron, posiadający słabe własności androgeniczne, odpowiada częściowo za rozwój gruczołów rozrodczych, mutację głosu oraz owłosienie u mężczyzn.

Androsteron jest inhibitorem neurosteroidowym (Reddy D.S., *Prog. Brain Res.* 186: 113–137, 2010), działającym jako dodatni allosteryczny modulator receptora GABA<sub>A</sub> (Li P. et al., *Mol. Pharmacol.* 71 (6): 1582–1590, 2007), a także posiada działanie przeciwdrgawkowe (Kaminski R.M. et al., *Epilepsia* 46 (6): 819–827, 2005).

Androsteron wykazuje antyproliferacyjne działanie na komórki nowotworowe ludzkiej wątroby (Hep G2), na komórki nabłonkowe gruczołakoraka jelita grubego (Caco 2) oraz na komórki gruczołakoraka stopnia II jelita grubego (HT 29) (El Kihel L., *Steroids* 77: 10–26, 2012).

Udowodniono, że hydroksypochodne analogów androsteronu – jego 3 $\beta$ -izomeru -epiandrosteronu (3 $\beta$ -hydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu) oraz

dehydroepiandrosteronu (DHEA) wykazują większą aktywnością biologiczną niż ich substraty. 7 $\beta$ -Hydroksy-EpiA charakteryzuje się znacznie silniejszym działaniem neuroprotektorowym niż 7-hydroksypochoodne DHEA: zapobiega obumieraniu neuronów w wyniku niedokrwienia oraz wykazuje aktywność cytoprotektorową, dzięki czemu może znaleźć zastosowanie w terapii ostrych i przewlekłych chorób związanych z układem nerwowym (Pringle et al., *Eur. J. Neurosci.*, 18, 117-124, 2003; Dudas et al., *Neurobiol. Dis.*, 15, 262-268, 2004). Związek ten charakteryzuje się również wysoką aktywnością przeciwzapalną (Hennebert et al., *J Steroid Biochem* 110, 255–262, 2008). Przykłady literaturowe wskazują, że 7 $\alpha$ -hydroksy-EpiA, który produkowany jest w ludzkich migdałkach, wzmacnia układ odpornościowy (Lafaye et al., *Biochim Biophys Acta* 1472, 222-231, 1999).

Znany jest sposób otrzymywania 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu i 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu obok 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu w wyniku transformacji androsteronu przez *Beauveria bassiana* KCH 1065 (Świzdor A. et al., *Steroids* 82, 44-52, 2014). W wyniku jednodniowej transformacji uzyskano 18% 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu oraz 53% 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu.

W opisie patentowym PL219992 ujawniono szczep *Aspergillus ochraceus* AM456 gdzie stosowany był jako biokatalizator do wytwarzania 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu.

Istota wynalazku polega na tym, że do przygotowanej pożywki wprowadza się zawiesinę komórek *Aspergillus ochraceus* AM456, które wzrastały przez trzy dni na tym samym podłożu przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 22-27°C. Po trzech dniach wzrostu mikroorganizmu dodaje się androsteron w ilości 10 do 40 mg na 100 ml pożywki, rozpuszczonego w odpowiednio 0,25 do 1,25 cm<sup>3</sup> acetonu. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez kolejne 8 do 33 godzin, odpowiednio do ilości substratu, w warunkach typowych dla hodowli mikroorganizmu.

Następnie uzyskane roztwory transformacyjne ekstrahuje się trzykrotnie rozpuszczalnikiem organicznym niemieszającym się z wodą, osusza i odparowuje rozpuszczalnik, w wyniku czego otrzymuje się surowy produkt, który oczyszcza się chromatograficznie.

Korzystne jest, gdy dodaje się 30 mg substratu na 100 ml pożywki.

Korzystne jest także, gdy jako eluent stosuje się mieszaninę heksan: aceton: chloroform, w proporcji objętościowej składników 2:1:0,3.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie mieszaniny 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu i 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu z wydajnością 50% i 40%, w temperaturze pokojowej i pH bliskim obojętnemu.

Wynalazek jest bliżej objaśniony na przykładach wykonania.

Przykład 1. Do kolby Erlenmajera o pojemności 300 cm<sup>3</sup>, w której znajduje się 100 cm<sup>3</sup> sterylnej pożywki zawierającej 3 g glukozy i 1 g aminobaku, wprowadza się 2 cm<sup>3</sup> zawiesiny komórek szczepu *Aspergillus ochraceus* AM456. Hodowlę prowadzi się przez kolejne trzy dni przy stałym wstrząsaniu w temperaturze 22 - 27°C. Po trzech dniach wzrostu mikroorganizmu dodaje się 30 mg androsteronu, o wzorze 1, rozpuszczonego w 1 cm<sup>3</sup> acetonu. Transformację prowadzi się przy ciągłym wstrząsaniu przez jedną dobę w warunkach, w których prowadzona była hodowla mikroorganizmu. Następnie uzyskany roztwór transformacyjny ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem, osusza bezwodnym siarczanem magnezu i odparowuje rozpuszczalnik. Otrzymuje się 40 mg surowego produktu, który oczyszcza się chromatograficznie używając jako eluentu mieszaninę heksan: aceton: chloroform (2:1:0,3 v/v). Na tej drodze otrzymuje się 15 mg 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu (wydajność 50%) oraz 12 mg 3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroksy-5 $\alpha$ -androstan-17-onu (wydajność 40%), o wzorze 2 (sumaryczna wydajność 90%).

Przykład 2. Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że dodaje się 10 mg androsteronu, rozpuszczonego w 0,5 cm<sup>3</sup> acetonu. Transformację

