

SZTEROIDKONVERZIÓK

A szterán váz planáris, merev szerkezet, pl. a 3-as és 17-es C-ek távolsága ill. a rajtuk lev szubsztituensek távolsága pontosan meghatározott. A szteránvázas vegyületek bioszintézise soklépéses, hosszadalmas folyamat.

R_1 és R_2 = metil

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szteroidkonverziók

Gyógyszerként szteroid hormonokat, származékokat és analógokat alkalmaznak a szervezet szabályozó mechanizmusainak manipulálására.

Az emberi szervezetben működő szteroid hormonoknak szerepe van a:

- víz- és sóháztartás szabályozásában (mineralokortikoidok)
- cukorháztartásban (glükoneogenezis) és a gyulladási folyamatok szabályozásában (glükokortikoidok) kortizol = „stresszhormon”
- nem működéseiben (ösztrogének, gesztagének, tesztoszteron)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A szteroidok bioszintézise

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A szteroidok bioszintézise

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A szteroidok bioszintézise

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szteroidkonverziók

A szteroid hatóanyagokat nem kémiai totálszintézissel és nem is de novo fermentációval állítják elő, hanem természetes eredetű szteránvázas molekulák átalakításával, biokonverzióval. A kívánt szteroid kialakítása során egy-egy lépésben csak egy kis szerkezeti részt változtatnak meg. Kémiai és biológiai lépések egyaránt előfordulnak.

Száznál is több mikrobiológiai konverziót írtak már le, de a reakciók három alaptípusra korlátozódnak:

- Oxidáció (OH csoport oxidációja, bevitel, kettős kötés)
- Redukció (keto csoport, kettős kötés redukciója)
- Hidrolízis



Növényi olajok szterin tartalma

Növényi olaj	Szterin tartalom (mg/100g olaj)	
	Nyers	Finomított
Kukorica	850	730
Repce	820	770
Napraforgó	430	350
Szója	350	260



Kiindulási anyagok

Növényi: szitoszterin (szójaolaj, fagyanta, tall olaj = a cellulóz gyártás mellékterméke), sztigmaszterol (babfélék), dioszgenin (mexikói növény gyökere)

A szójaolaj eredeti nyersanyag háromféle növényi szteroidot tartalmaz: -szitoszterin, sztigmaszterin és kampeszterin. F komponens: >40% szitoszterin

Állati: koleszterin (epeváladék)

Szintetikus: -naftol



Kiindulási anyagok

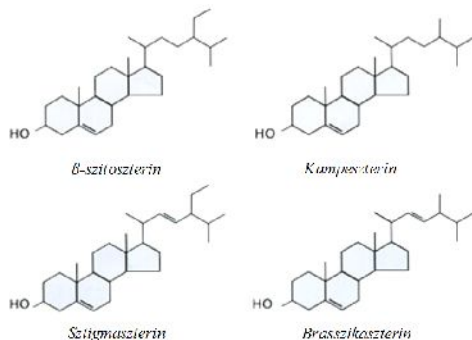
A növényi olajok finomítása során nyálkátlanító, savtalanító, derítési, valamint viasztalanító és dezodoráló lépéseket alkalmaznak. A végén, a dezodoráló lépésben elkülönített frakcióban található a fitoszterinek. Emellett nagy szénatomszámú alkoholokat, zsírsavakat, tokoferolokat tartalmaz.

Hasonló komponenseket tartalmaz a fagyanta szappan is. Ebből extrakcióval (n-pentanol, ciklohexanon) és/vagy (molekulár)desztillációval koncentrálnak a szteroidokat (50-90%).

A desztilláció előtt gyakran észterezik a szteroidok -OH csoportját a jelenlévő zsírsavakkal – megemelve a forráspontot, könnyebb a többi molekulát kihajtani mellőlük.



Növényi szteroid alapanyagok



Szteroidkonverziók

Az enzimes reakciók előnyei:

- Enyhe körülmények között végrehajthatók
- Sztereoszektív átalakítások lehetségesek
- Nem szükséges védőcsoportokat rátenni, majd levenni.

Hátránya:

Minden konverziós lépéshez külön enzimet (= törzset) kell keresni. A konverzióhoz használt enzimek szubsztrátja eredetileg nem szteroid, hanem valamilyen más, analóg molekula = régióspecifikus enzimek.

Emiatt a megfelelő mikrobatörzsek keresése (screening) nem tervezhető és nagyon munkaigényes.

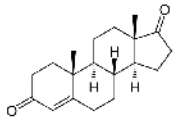
A szükséges enzimeket általában nem izolálják, hanem nyugvósejtes tenyészetben használják.



Szteroidkonverziók

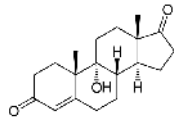
A folyamat első lépése az oldallánc lehasítása. A telített oldalláncú szteroidokat különböző mikrobákkal oxidálva 17-keto termékekhez jutunk:

AD



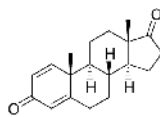
androsztén-dion

9OH-AD



9αOH-androsztén-dion

ADD



androsztén-diéndion



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

Technológiai kérdések

1. A szteroidok rosszul oldódnak vízben:

→ kristályfermentáció: a szubsztrát és a termék egyaránt kristályos formában van jelen, látszólag nem történik semmi.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Szteroidkonverziók

Ez a három vegyület sokféle további gyártás alapanyaga, az első két éves piaca egyenként is ezer tonna fölött van.

A sztimmaszerint az oldalláncban lévő kettős kötés miatt a mikrobák nehezebben tudják lebontani, ha ez a funkcionális komponens, akkor ezt első lépésként kémiai oxidálják.



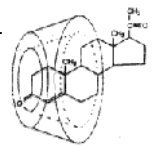
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Technológiai kérdések

A szubsztrát bevitelét különböző trükkökkel kell megoldani:

- A szubsztrátot oldószerben (alkohol) veszik fel, a fermentorba lassan becsorgatva kikristályosodik
- Tenzidekkel, detergenssel megolvasztva stabil emulziót készítenek, lehetővé téve apró kristályok keletkezését
- Ciklodextrinek – molekuláris csomagolás



Ha *Mycobacterium*okat használnak, akkor a viaszos falú sejtek rátapadnak a szteroid kristályokra.

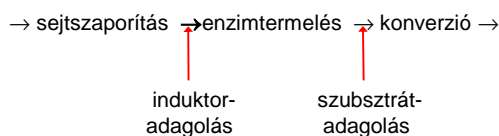


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

17

Technológiai kérdések

A sokféle konverziós technológia közös elemei összefoglalhatók egy sémába:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Technológiai kérdések

Feldolgozás: az apoláros szteroidok izolálásának jellemzője a kivétel az extrakció.

Tipikus lépések:

1. Teljes extrakció: „erős” oldószerrel (pl. halogénezettek) minden szteroidot és lipidet kivonnak
2. Fázisok szétválasztása
3. Oldószer lehasítása
4. Szелеktív extrakció: pontosan beállított polaritású oldószer(keverék)kel egy komponens kioldására törekednek a sok közül.

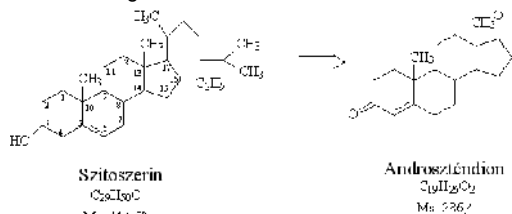


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

Szitoszterinből el állított vegyületek

Androsztén-dion (AD): több hatóanyag intermediere.
Piaca > 1000 t/év
A szitoszterin oldalláncának a lebontását a *Mycobacterium phlei* törzssel végzik.

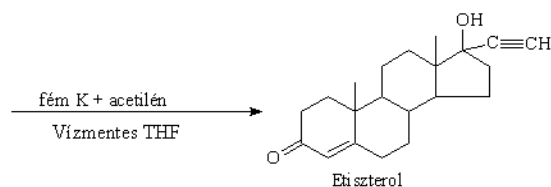


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

AD technológia

A következő reakciólépés kémiai szintézis, vízmentes THF-ben hajtják végre fém kálium és acetilén gáz jelenlétében.



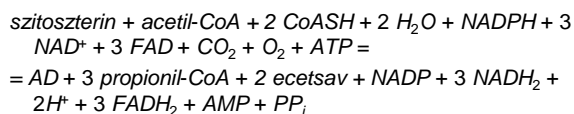
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

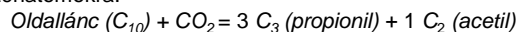
22

AD technológia

A szitoszterin átalakítása nem egy lépéses folyamat, összesen 11 enzim játszik szerepet, 14 egymást követő lépésben. A reakció összesített sztöchiometriai egyenlete:



Szénatomokra:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

20

AD technológia

A keletkezett etiszterol maga is gyógyszerhatóanyag (progeszteron hatású) de további hatóanyagok gyártásának kiindulási anyaga is:

finaszterid (jóindulatú prosztata megnagyobbodás ellen)

progeszteron származékok (két szénatomos egység a D gy r n) pl. drosprienon, ami fogamzásgátlók hatóanyaga

spironolakton (aldoszteron antagonistá = vízajtó)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

AD technológia

A konverzió hatásfoka kb. 70%-os:
24 g/l szitoszterinből kb. 10 g/l AD + 3 g/l szitoszterin + 1 g/l egyéb anyag keletkezik.
Az oldott CO₂ koncentráció javítja a kihozatalt, emiatt a túlzott levegőztetés hátrányos.

Totál-extrakció: a teljes fermentlevet extrahálják diklórmetánnal, majd lehajtják az oldószert.

A szelektív extrakciót 85%-os metanollal végzik, amely az androszténdiont oldja, de a szitoszterint nem.

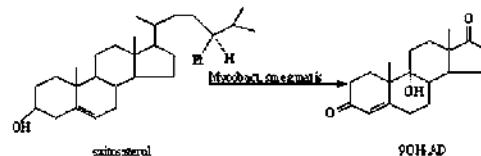
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

9 OH-androszténdion technológia

A 9-OH AD a prednizolon gyártás intermediere.
A *Mycobacterium smegmatis* enzimrendszere egy fermentációs lépésben távolítja el a szitoszterin oldalláncát és alakítja ki szelektíven a 9 α -OH csoportot.
Konverzió ~70%, 30 g/l bevitt szitoszterinből elméletileg 14,5 g/l, üzemben 10-11 g/l-es termékszint érhető el.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

A szubsztrát bevitele

A szitoszterinből a szénforrásként alkalmazott glicerinnel és különböző tenzidekkel (Tween-80, Struktol, polipropilén-glikol) együtt vizes rendszerben intenzív keverés mellett 121 °C-on (sterilizációs hőfok) az olvadékból emulziót készítenek.

A szuszpenziót kiegészítik az egyéb táptalaj-komponensekkel (szójaliszt, NH₄Cl, KH₂PO₄, CaCO₃) = tápoldat.

Beállítják a pH-t, majd 121 °C-on sterilizálják. A kétszeri hőkezelés során a tenzidek jelenlétében a szitoszterin átkristályosodik és igen apró szemcseméretű lapos, illetve téglalap alakú kristályok képződnek.

A fermentáció során a szaporodó *Mycobacterium* megkötődik a szitoszterin kristályok felületén, és ott megy végbe a biokonverzió.

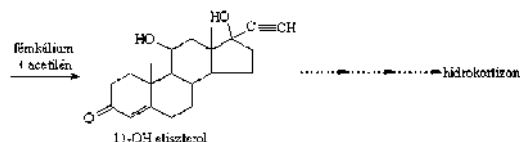


Kémiai reakciólépések

HF addíció 11-F származékok „szuperkortikoidok” = hatékony gyulladásgátlók.

C2 egység bevitele: Mint az etiszterolnál

Az oldallánc többlépéses átalakításával hidrokortizon



Feldolgozás

A fermentáció során ~ 12 g/l 9αOH-AD
 ~ 1-4 g/l szitoszterin
 ~ 1-3 g/l egyéb szteroid melléktermék

1. Totálextrakció diklór-metánnal (mindent kiold, ronda emulzió, nehéz szétválasztani)
2. Bepárlás (vákuumban)
3. Szelektív extrakció diizopropil-éterrel (a 9αOH-AD-t oldja, a maradék szitoszterint nem)
4. A maradék szelektív extrakciója metanollal (a szitoszterint oldja, a 9αOH-AD-t nem)



Gyulladásgátló szteroidok

A hidrokortizon (= kortizol)

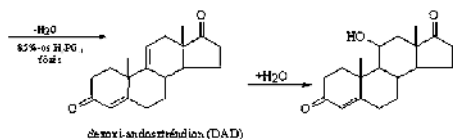
A kortizolnak gyulladáscsökkentő hatása mellett sok egyéb aktivitása van:

- „stresszhormon” – a stressz növeli a hormonszintet
- glükoneogenezis – növeli a cukorszintézist más szénvázakból, mobilizálja a glükózt, emeli a vércukorszintet.
- befolyásolja az ion- és vízháztartást mind a vesékben, mind a bél nyálkahártyáján.
- Elnyom egyes immunfolyamatokat.



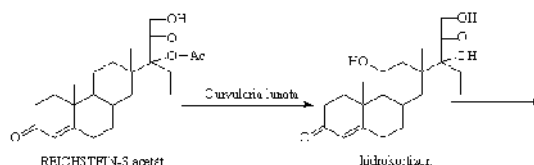
Kémiai reakciólépések

Dezoxi-androsztén-dion (DAD) gyártása: a vízelvonáshoz 85%-os H₃PO₄-ban történik, melynek hatására a 9 és a 11 szénatom közötti kettős kötés alakul ki, erre később könnyen addicionálhatunk pl. vizet, vagy HF-ot. Addicionál az elektronszívó csoport a 11 C atomra kötődik. Ez a szubsztitúció szükséges a kortikoszteroidoknál.



Gyulladásgátló szteroidok

A hidrokortizon klasszikus előállítását ReichsteinS-acetáttól történik (direkt 11-hidroxilezés).



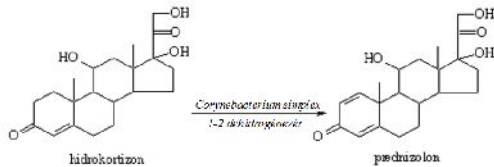
Nem kívánt egyéb hatásai miatt prednizolont állították elő helyette, amely szintén gyulladásgátló, de kevesebb a mellékhatása



Gyulladásgátló szteroidok 2.

A vízben rosszul oldódó hidrokortizon szubsztát bevitelére a ciklodextrin zárványkomplex segítségével valósítható meg. Az átalakulás csaknem 100%-os, kevés melléktermék keletkezik.

Feldolgozás: extrakció etilacetáttal, bepárlás



Az androgén szteroidok hatása kettős

Androgén hatás

- A férfi nemi szervek kifejlődése és növekedése
- A normális férfi szexuális működés fenntartása
- A másodlagos nemi jellegek kialakítása
- Szükségesek a hímivarsejtek éréséhez
- Több vörös vérséjt (+ 10-20%, androgén többlet)

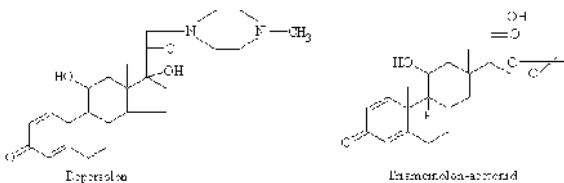
Anabolikus hatás

- Nitrogént tart vissza a szervezetben fehérjék formájában
- Izomtömeg növelése
- Fékezik a katabolizmust és a lebontó folyamatokat

Gyulladásgátló szteroidok 3.

A prednizolon vízoldhatósága növelhető, különböző szubsztitúensek hozzákapcsolásával:

A prednizolonból állítják elő a FTOROCORT kenőcs hatóanyagát, a triamcinolon-acetonidot

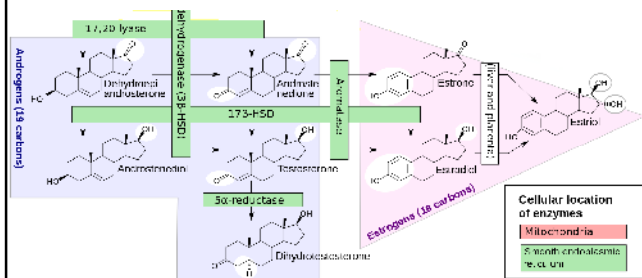


Az androgén szteroidok hatása

A szteroid hormonok androgén hatásának összehasonlítása:

Hormon	%
tesztoszteron	100
5-dihidrotesztoszteron (DHT)	90-500
Androsztándiol	60
Androszténdion	20
Dehidro-epi-androszteron	10
Androszteron	10

Androgén szteroid hormonok



Antiandrogének

Orvosilag egyes esetekben szükség lehet az androgén hatás ellensúlyozására. Ez többféle mechanizmussal valósítható meg:

- Szerkezetanalóg molekulákkal lefedni az androgén receptorokat (lehetnek szteroid és nem-szteroid vegyületek)
- Megakadályozni az androgének képződését.
Pl.: finaszterid

Finaszterid

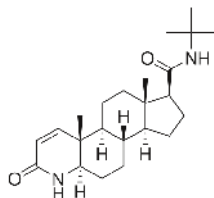
A finaszterid kompetitív inhibitorként akadályozza a:
tesztoszteron dihidrotesztoszteron
átalakulást.

Csökkenti a jóval nagyobb androgén aktivitású DHT termelését.

Jóindulatú prosztata megnagyob-
bodás ellen alkalmazzák.

Biokonverziós lépések:

- Progeszteron el állítása
- (tiszán kémiai reakciók), vagy
- az 1-2 kett s kötés kialakítása *Corynebacterium simplex*-el



37

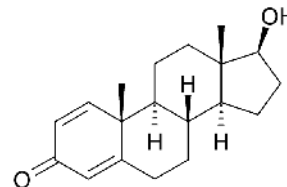
Anabolikus doppingszerek

Boldenon:

lovak számára kifejlesztett anabolika, emberi használata nem engedélyezett (mégis szedik).

- nitrogén visszatartás,
- fehérjeszintézis,
- vörös vérszám n .

Nagyon hosszú ideig marad a szervezetben, még 18 hó-
nap után is kimutatható.
Gyártás: egy lépés ADD-b I,
vagy tesztoszteronból



40

Anabolikus szteroidok

Orvosilag lehet cél az anabolikus hatás (roborálás).
Olyan származékokat keresnek, amelynél az anabo-
likus hatás nagyobb, az androgén pedig kisebb.

Ezeket sportolók és testépít k doppingszerként is al-
kalmazzák. (Sztanozolol, Nandrolon)

Magyarországon gyártott szer a Nerobol →

38

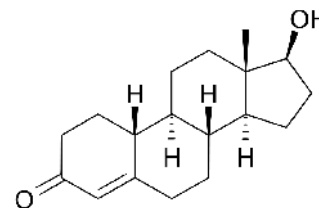
Anabolikus doppingszerek

Nandrolone (19-nortestosterone)

Csontritkulásra, vérsze-
génységre és roborálás-
ra adják id sebb höl-
gyeknek.

Az általános anabolikus
hatások.

A szexuális m ködést
mindkét nemben káro-
sítja.



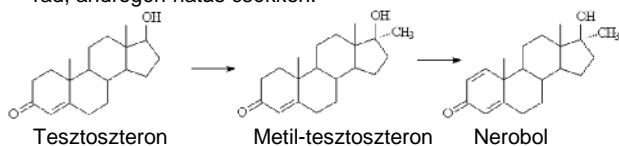
41

Anabolikus szteroidok

A tesztoszteront egy lépésben ketoredukcióval állítják el
az androszténdionból, közvetve szitoszterinb I.

Metilezés → metil-tesztoszteron

1-2 dehidrogénezés, ugyanolyan, mint a hidrokortizon
prednizolon átalakításánál. Az A gy r a három konjugált kö-
tés miatt síkba merevedik. Eredmény: anabolikus hatás ma-
rad, androgén hatás csökken.



39

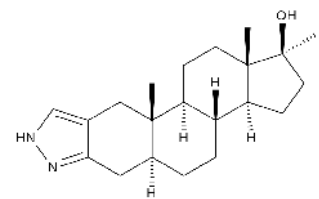
Anabolikus doppingszerek

Stanozolol

A 17-metil csoport miatt
a máj nem bontja le.

A szokásos anabolikus
hatások, embernél és
állatoknál.

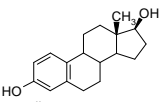
Gyártás: kémiai szinté-
zissel, több lépésben
dihidrotesztoszteronból.



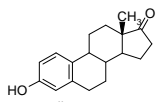
42

N i nemi szteroid hormonok

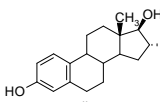
Természetes ösztrogének



Ösztradiol
(estr-1,3,5-triene-3,17)-diol

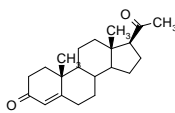


Ösztroon
(3-hydroxy-estr-1,3,5-triene-17-one)




Ösztriol
(estr-1,3,5-triene-3,16,17-triol)

Természetes gesztagén



Progészteron
(Pregn-4-ene-3,20-dione)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék


43

Fogamzásgátló szteroidok

A hormonális fogamzásgátlás a gesztagén hatáson alapul: a szintetikus progeszterin analógok „elhitetik” a szervezettel, hogy a fogamzás megtörtént, így az újabb peteérésre nincs szükség.

Az egykomponens tabletták csak progesztagén hatóanyagot tartalmaznak.

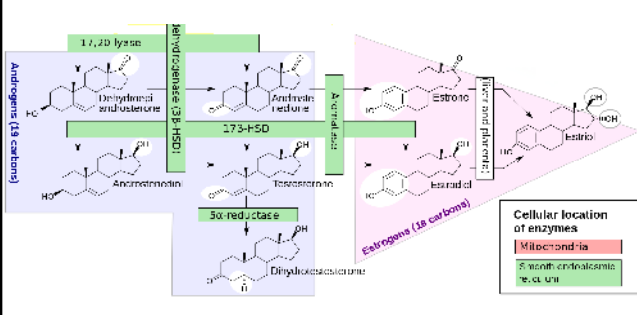
Ezek részben 19-nor-szteroidok (a 19-es metil csoport hiányzik), illetve más, szintetikusan el állított származékok.




BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

Az ösztrogének bioszintézise

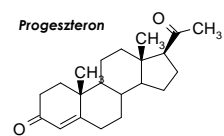




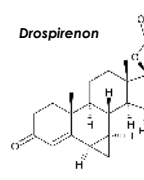
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

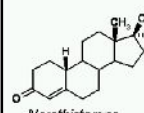
Progésztagén szteroidok



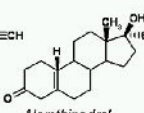
Progészteron



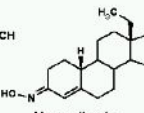
Drospirenon



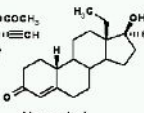
Norethisterone




Norethindrol



Norgestimate



Norgestrel



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

N i nemi szteroid hormonok

A természetes ösztrogének fiziológiai szerepe

- A n i nemi szervek kifejl dése
- A másodlagos nemi jellegek kialakítása (n i + férfi)
- A peteérésben és a fogamzásban
- A csont r ség szabályozásában (n i + férfi)
- Anyagcserében

A természetes gesztagének fiziológiai szerepe

- A terhesség megtartása
- A peteérés és ovuláció gátlása
- A spontán méhösszehúzódnások gátlása



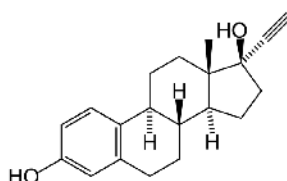
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

Fogamzásgátló szteroidok

A kétkomponens tabletták a progesztagén hatóanyag mellett egy ösztrogén típusú molekulát is tartalmaznak. Ezek változó arányával (két, illetve három szakasz) jobban modellezik a n i hormonális ciklust.

Etinil-öszttradiol:





BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

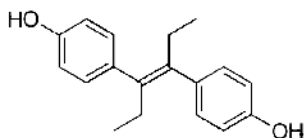
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

1940-70 között használták ösztrogén analógnaként, több célra, pl. terhes nőknek adták a vetélés kockázatának csökkentésére. Mellékhatások az így született gyermekeknél:

- Lányok: egyes adenokarcinómák gyakorisága 40x n tt.
- Fiúk: csökkent a férfias jelleg.

1971 óta nem adható terhesség esetén.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

49

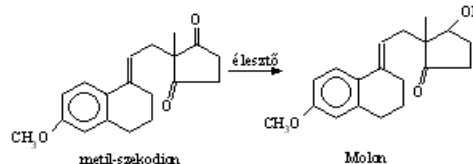
Molon gyártása

A 17 ketocsoport redukciója élesztővel történik. Analóg az AD Tesztoszteron átalakítással.

Konverzió: 85-95%-os, 20-22 g/l termék

Az Etolon ezzel mindenben azonos, csak annál a 18-as helyen etil csoport van.

Feldolgozás: szórás, a szórólépcsény extrakciója etilacetáttal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

52

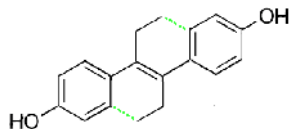
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

1940-70 között használták ösztrogén analógnaként, több célra, pl. terhes nőknek adták a vetélés kockázatának csökkentésére. Mellékhatások az így született gyermekeknél:

- Lányok: egyes adenokarcinómák gyakorisága 40x n tt.
- Fiúk: csökkent a férfias jelleg

1971 óta nem adható terhesség esetén.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

50

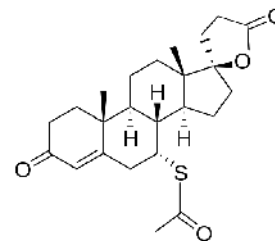
Mineralokortikoid antagonisták

Spirololakton:

Lefedi az aldosteron receptorokat a vesében, szerkezetenalóg kompetitív inhibitor. Vízhajtó hatású, de K⁺ veszteség nélkül.

Gyártás: etiszterolból több kémiai lépéssel:

- lánchosszabbítás CO₂ kötéssel,
- hidrogénezés,
- gyűrűzárás,
- reakció tioecetsavval.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

51

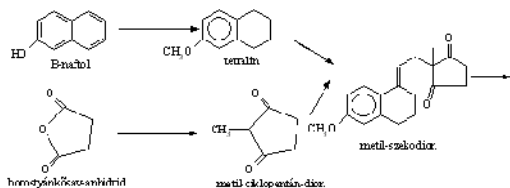
Szintetikus nor-szteroidok

Nor-szteroidok: a 19-es metil csoport hiányzik

Szeko-szteroidok: a C gyűrű nyitott, a 8-14 kötés hiányzik

Szintetikus gyártás: -naftol és borostyánkősav-anhidrid

A termékek fontos fogamzásgátlók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

51

Genetikai törzsfelkészítés

Az egyenzimes biokonverzióknál a genetikai fejlesztések az adott enzim aktivitásának maximalizálására irányulnak:

- növelni lehet az enzimfehérje kópiaszámát (pl.: erősebb promotérral)
- induktívól konstitutívá lehet tenni a gént.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

54

