

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

Cellular location of enzymes:
Mitochondria (yellow)
Cytosol/Endoplasmic reticulum (green)

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 gyulladáscsökkentés szabályozásában (glükokortikoidok) kortizol = „stresszhormon”
- nemi működésben (ösztrogének, gesztagének, tesztoszteron)

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A szteroidok bioszintézise

Cellular location of enzymes:
Mitochondria (yellow)
Cytosol/Endoplasmic reticulum (green)

A szteroidok bioszintézise

Cellular location of enzymes:
Mitochondria (yellow)
Cytosol/Endoplasmic reticulum (green)

A szteroidok bioszintézise

Cellular location of enzymes:
Mitochondria (yellow)
Cytosol/Endoplasmic reticulum (green)

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), dioszenin (mexikói növény gyökere)

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

Állati: koleszterin (epeváladék)

Szintetikus: -naftol



Kiindulási anyagok

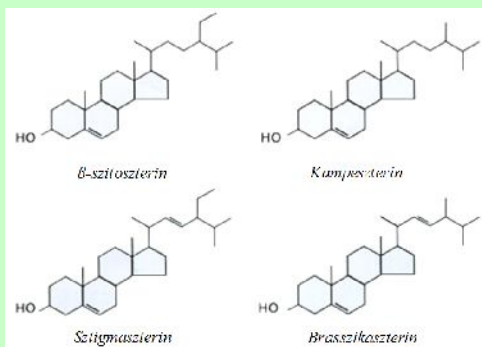
A növényi olajok finomítása során nyálkátlanító, savtalanító, derítési, valamint viasztalanító és dezodoráló lépéseket alkalmaznak. A végén, a dezodoráló lépésben elkülönített frakcióban található a fitoszterinek. Emellett nagy számtartalmú alkoholokat, zsírsavakat, tokoferolokat tartalmaz.

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

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



Növényi szteroid alapanyagok



Szteroidkonverziók

Az enzimes reakciók előfeltételei:

- Enyhe körülmények között végrehajthatók
- Sztereoszelektív 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.

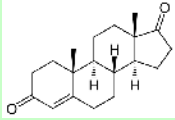
A szükséges enzimeket általában nem izolálják, hanem nyugvósejtes tenyészetben használják.



Szteroidkonverziók

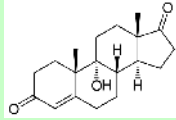
A folyamat első lépése az oldallánc lehasítása. A telített oldalláncú szteroidokat különböző mikrobákkal oxidálva 17-keto termékekhez jutunk:

AD



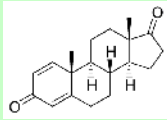
androsztén-dion

9OH-AD



9αOH-androsztén-dion

ADD



androsztén-dion



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 sztigmaszterint az oldalláncban lévő ketős kötés miatt a mikrobák nehezebben tudják lebontani, ha ez a funkcionális csoport, akkor ezt első lépésként kémiai oxidálják.



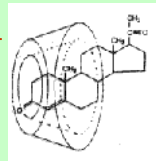
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Technológiai kérdések

A szubsztrát bevitelét különböző trükkökkel kell megoldani:

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



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

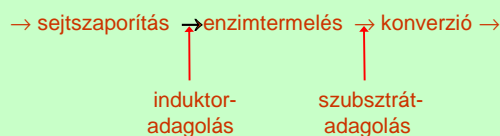


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 az extrakció.

Tipikus lépések:

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

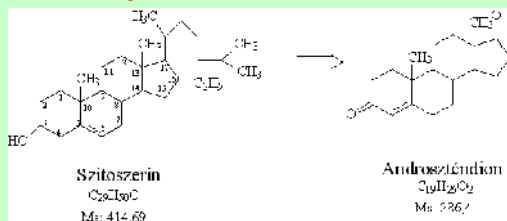


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.

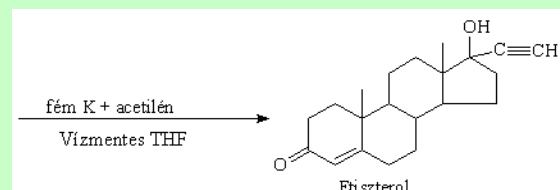


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

AD technológia

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

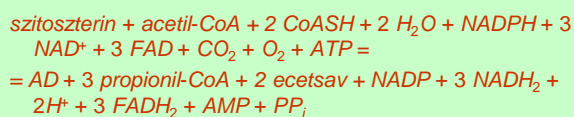


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

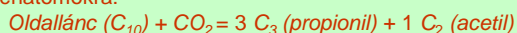
22

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

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

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 kihozatalát, emiatt a túlzott levegőztetés hátrányos.

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

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

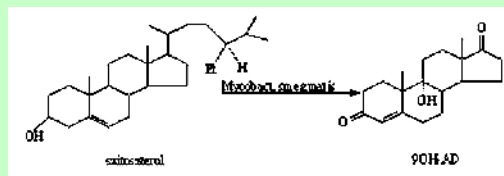


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

9 OH-androszténdion technológia

A 9-OH AD a prednizolon gyártás intermediere.
A *Mycobacterium smegmatis* enzimsziszteme 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

24

A szubsztrát bevitele

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

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

Beállítják a pH-t, majd 121 C°-on sterilizelik. A kétszeri hőkezelés során a tenzid jelenlétében a szitoszterin átkristályosodik és igen apró szemcseméretű lapos, illetve térszerű kristályok képződnek.

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

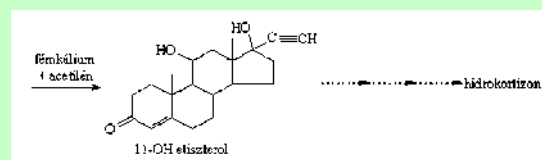


Kémiai reakciólépések

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

C2 egység bevitele: Mint az etiszterolnál

Az oldallánc többlépcsős átalakításával hidrokortizon



Feldolgozás

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

1. Totalextrakció 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)

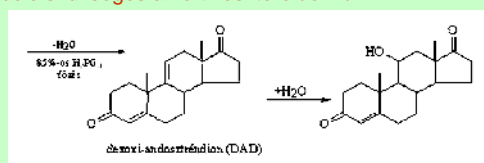
A kortizolnak gyulladáscsökkentő hatása mellett sok egyéb aktivitása van:

- „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.
- Elyom egyes immunfolyamatokat.



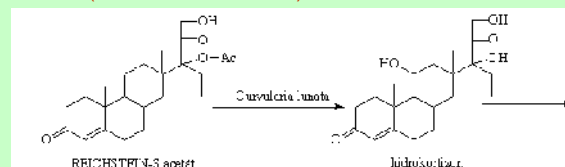
Kémiai reakciólépések

Dezoxi-androsztén-dion (DAD) gyártása: a vízelvonáshoz 85%-os H₃PO₄-ban történik, melynek hatására a 9 és a 11 szénatom között képződő kötés alakul ki, erre később könnyen addicionáltathatunk pl. vizet, vagy HF-ot. Adiciónál 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).



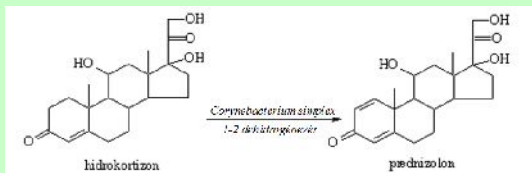
Nem kívánt egyéb hatásai miatt prednizolont állítottak elő helyette, amely szintén gyulladásgátló, de kevesebb a mellékhatása



Gyulladásgátló szteroidok 2.

A vízben rosszul oldódó hidrokortizon szubsztát bevitelére 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 hímivarsejtekéréséhez
- Több vörös vércsejt (+ 10-20%, androgén többlet)

Anabolikus hatás

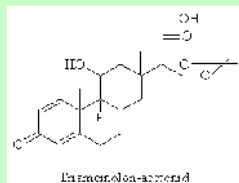
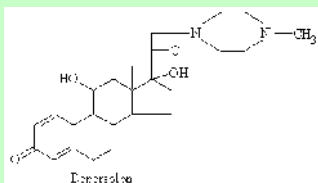
- Nitrogént tart vissza a szervezetben fehérjék formájában
- Izomtömeg növelése
- Fékezik a katabolizmust és a lebontó folyamatokat



Gyulladásgátló szteroidok 3.

A prednizolon vízoldhatósága növelhető, különböző szubsztitúensek hozzákapcsolásával:

A prednizolonból állítják elő a FTOROCORT ke-
n cs hatóanyagát, a triamcinolon-acetonid



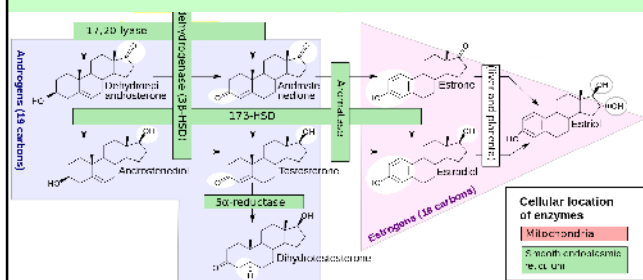
Az androgén szteroidok hatása

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

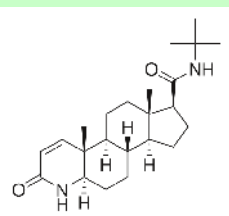
A finaszterid kompetitív inhibitorként akadályozza a:
tesztoszteron dihidrotesztoszteron

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

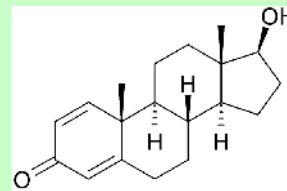
Anabolikus dopingszerek

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

Anabolikus szteroidok

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

Ezeket sportolók és testépít k dopingszerként is alkalmazzák. (Sztanozolol, Nandrolon)

Magyarországon gyártott szer a Nerobol →



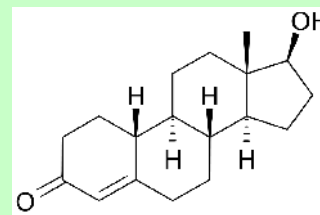
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

Anabolikus dopingszerek

Nandrolone (19-nortestosterone)

Csontritkulásra, vérsze-
génységre és roborálás-
ra adják id sebb hől-
gyeknek.
Az általános anabolikus
hatások.
A szexuális m ködést
mindkét nben károsít-
ja.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

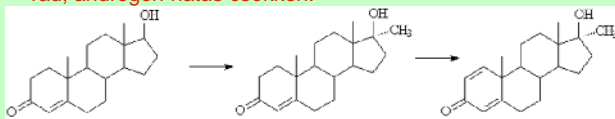
41

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.



Testoszteron

Metil-tesztoszteron

Nerobol



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

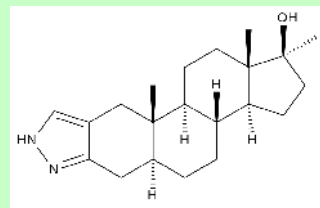
39

Anabolikus dopingszerek

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.

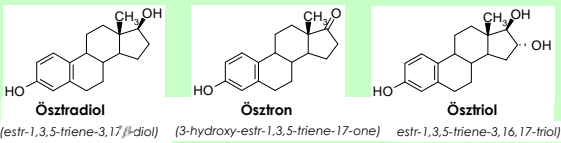


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

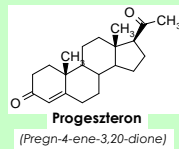
42

N i nemi szteroid hormonok

Természetes ösztrogének



Természetes gesztagén



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.

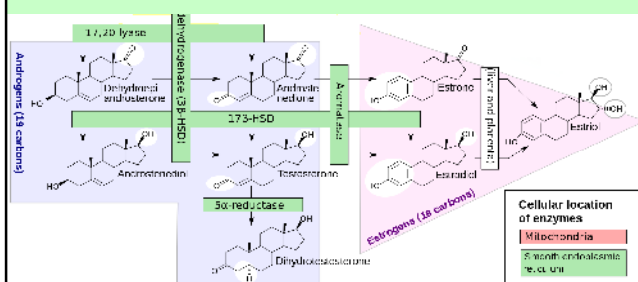
Ezek részben 19-nor-szteroidok (a 19-es metil csoport hiányzik), illetve más, szintetikusan el állított származékok.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

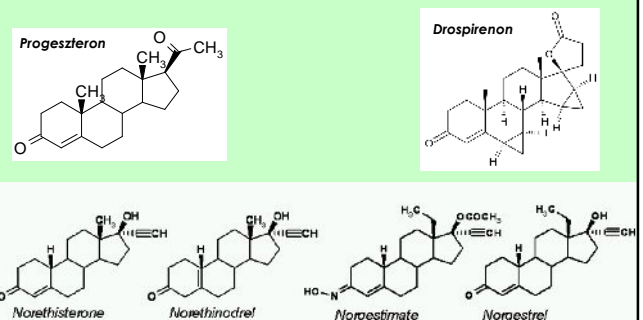
Az ösztrogének bioszintézise



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

Progesztagén szteroidok



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



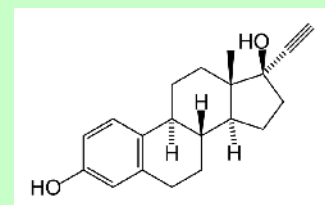
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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-ösztradiol:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48

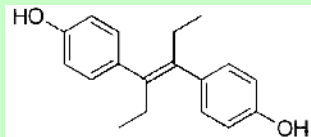
Szintetikus szteroidok

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-nál több.
- Fiúk: csökkent a férfias jelleg.

1971 óta nem adható terhesség esetén.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

49

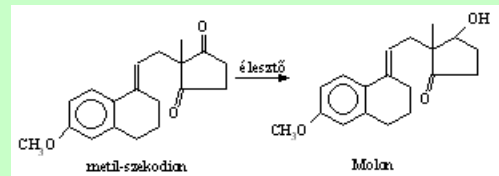
Molon gyártása

A 17 ketocsoport redukciója élesztővel történik. Analóg az AD-Testoszteron 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 szórólépcső extrakciója etilacetáttal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

52

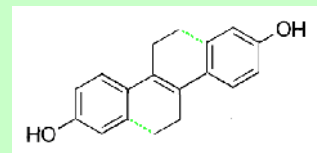
Szintetikus szteroidok

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-nál több.
- Fiúk: csökkent a férfias jelleg.

1971 óta nem adható terhesség esetén.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

50

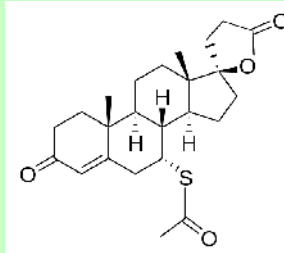
Mineralokortikoid antagonisták

Spironolakton

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

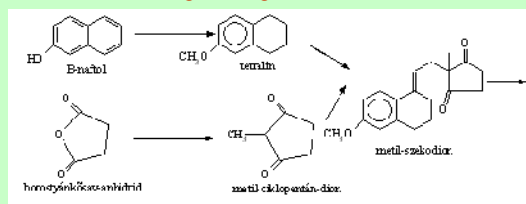
Szintetikus nor-szteroidok

Nor-szteroidok: a 19-es metil csoport hiányzik

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

Szintetikus gyártás: -naptól és borostyánkősav-anhidrid

A termékek fontos fogamzásgátlók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

51

Genetikai törzsfejlesztés

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

