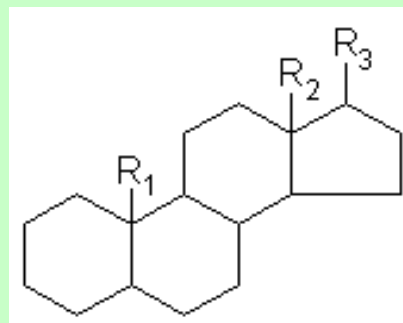
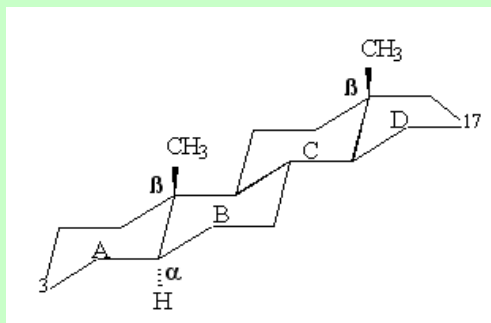


SZTEROIDKONVERZIÓK

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

R_1 és R_2 = metil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

Szteroidkonverziók

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

Az emberi szervezetben m köd szteroid hormonoknak szerepe van a:

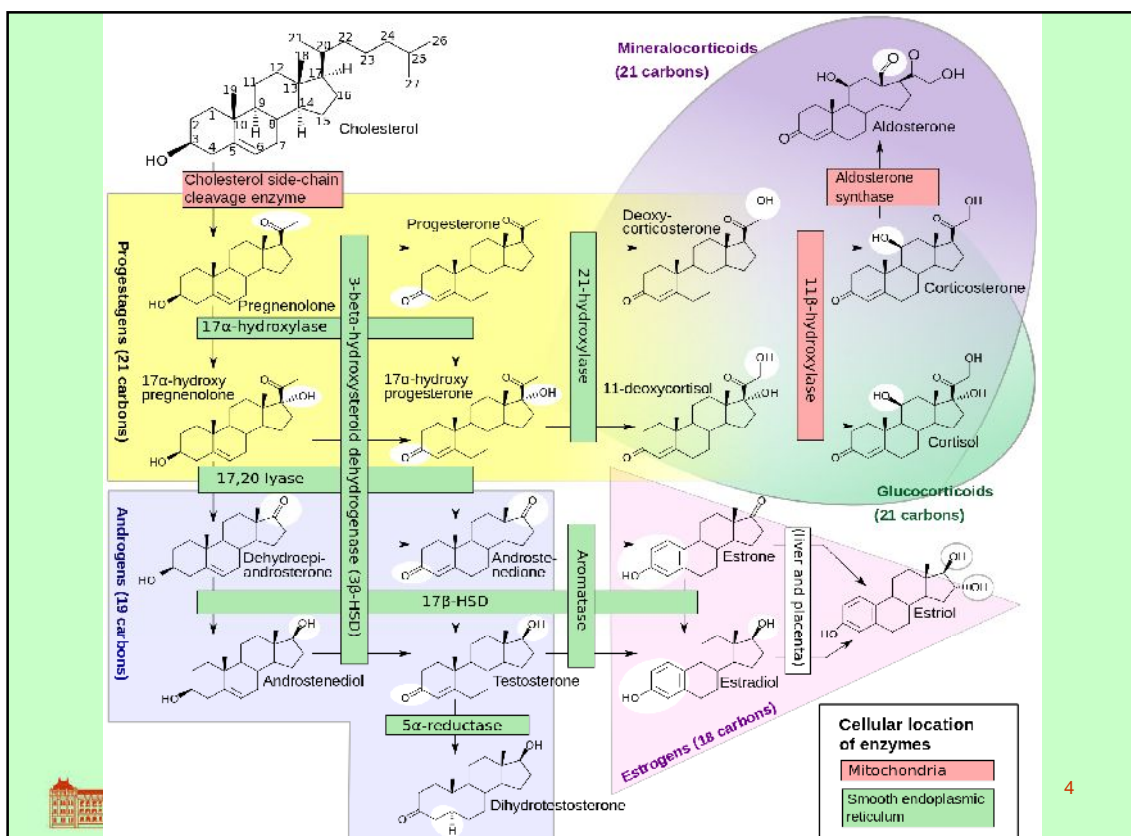
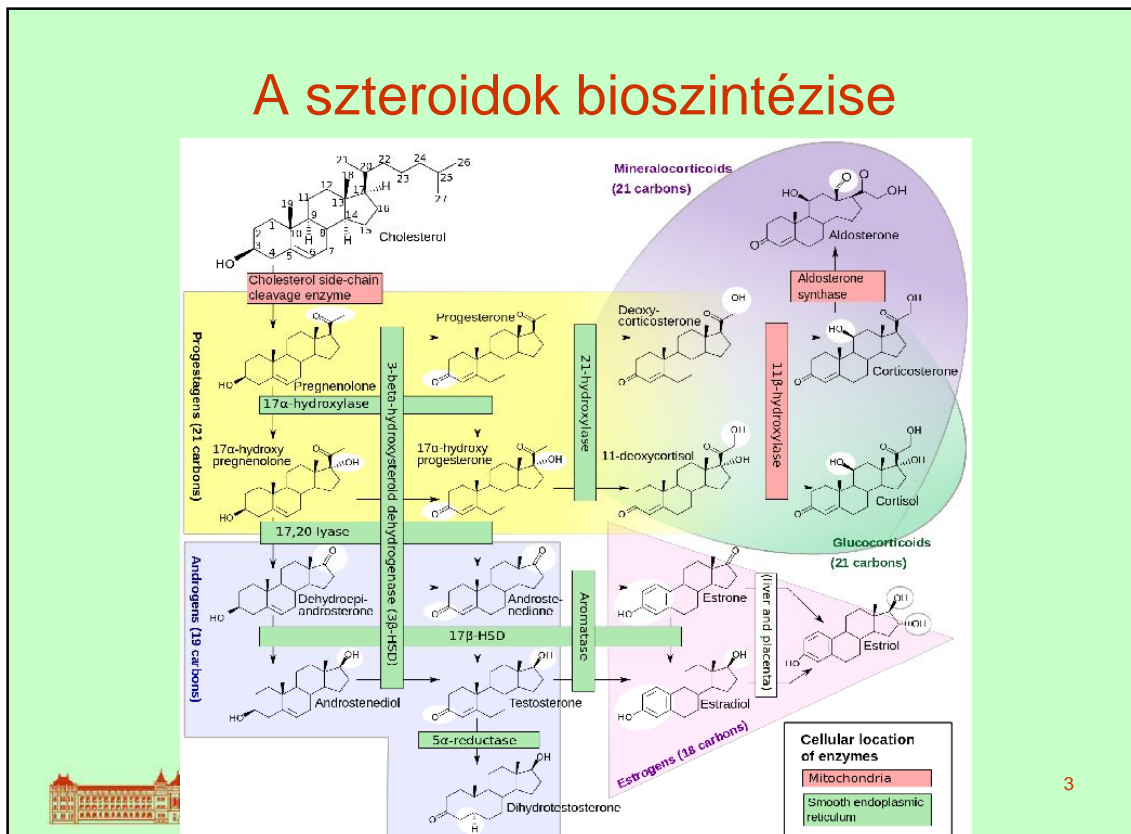
- víz- és sóháztartás szabályozásában (mineralokortikoidok)
- cukorháztartásban (glükoneogenezis) és a gyulladásos folyamatok szabályozásában (glükokortikoidok)
kortizol = „stresszhormon”
- nemi m ködésekben (ösztrogének, gesztagének, tesztoszteron)

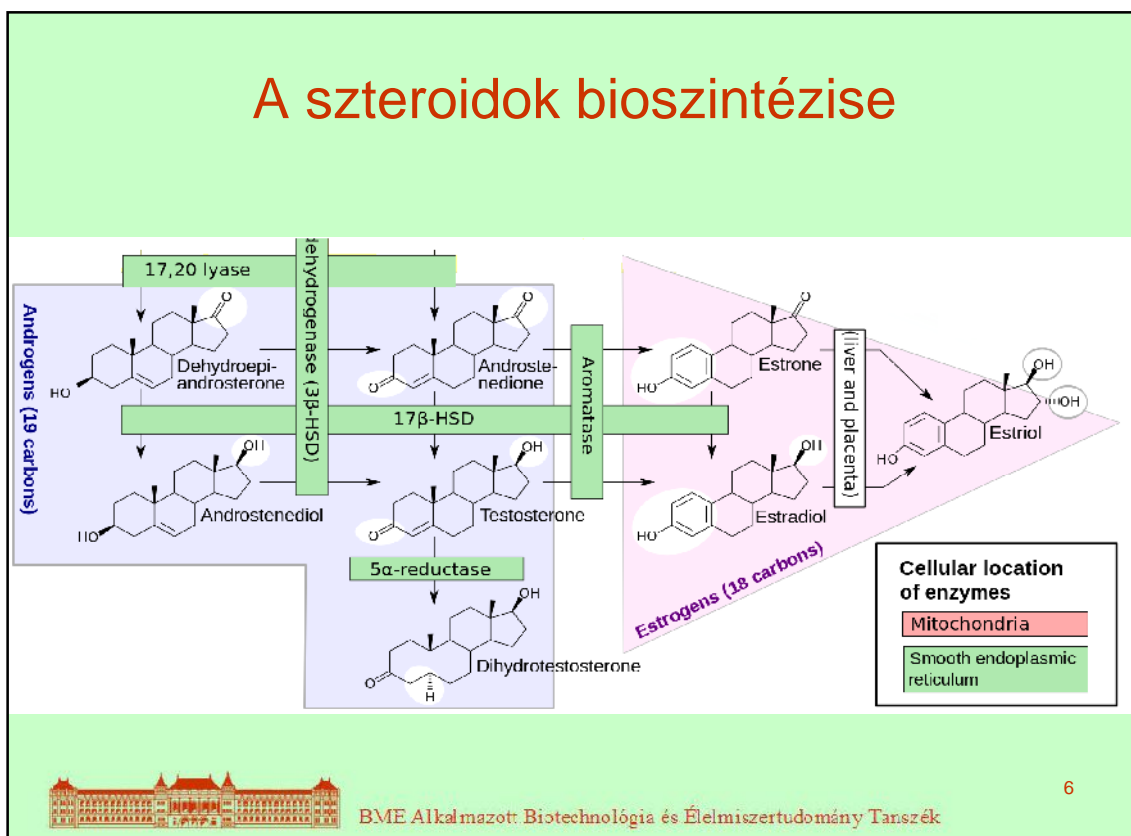
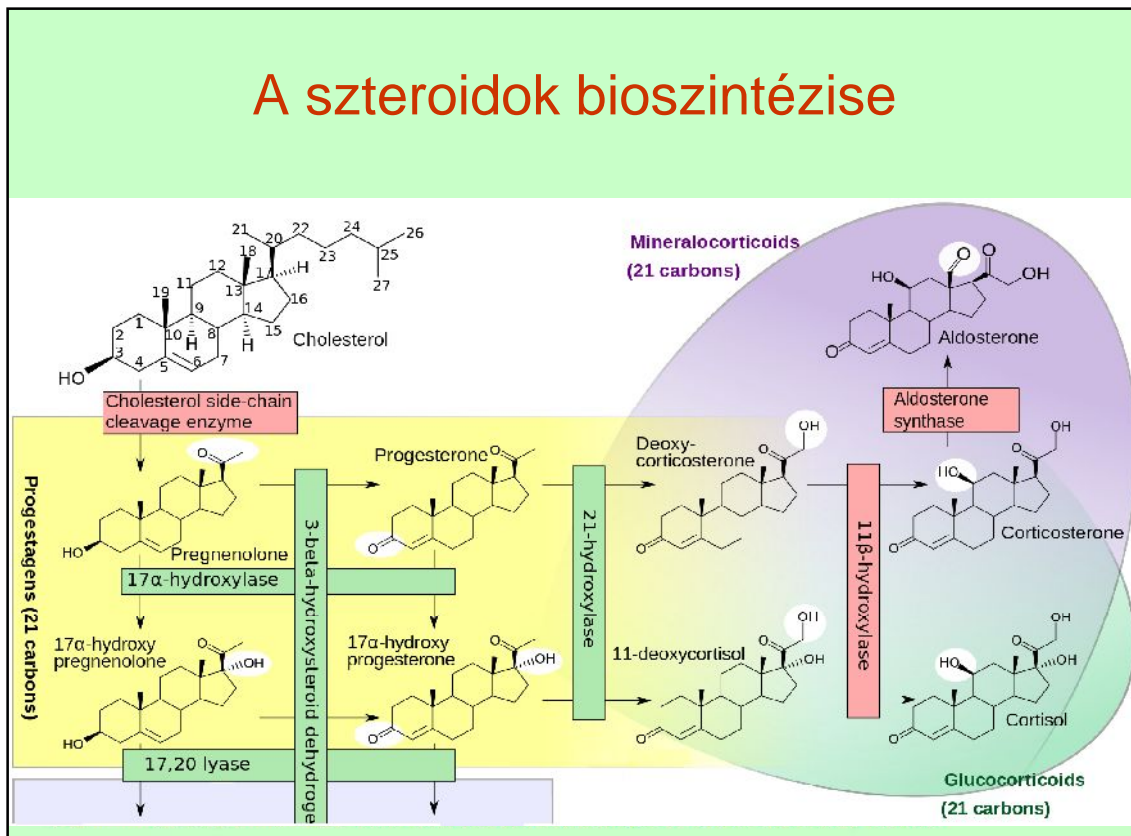


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

A szteroidok bioszintézise





Szteroidkonverziók

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

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

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



Kiindulási anyagok

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

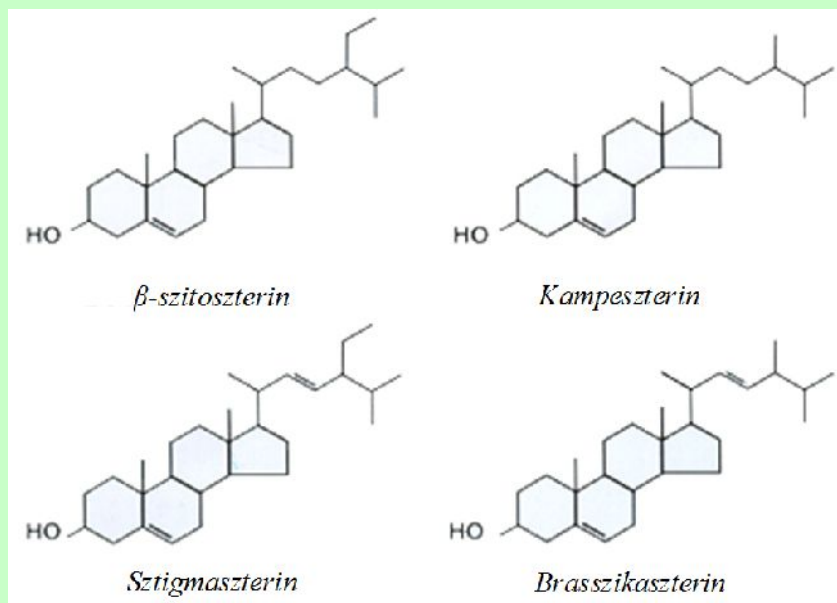
A szójaolaj eredeti nyersanyag háromféle növényi szteroidot tartalmaz: -szitoszterin, sztigmaszterin és kampeszterin. F komponens: >40% szitoszterin

Állati: koleszterin (epeváladék)

Szintetikus: -naftol



Növényi sztteroid alapanyagok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Növényi olajok sztlerin tartalma

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

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 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.



Szteroidkonverziók

Az enzimes reakciók előnyei:

- 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 mikrotörzsek keresése (screening) nem tervezhető és nagyon munkaigényes.

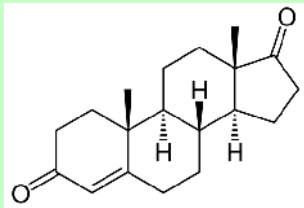
A szükséges enzimeket általában nem izolálják, hanem nyugvósejtes tenyészetben használják.



Szteroidkonverziók

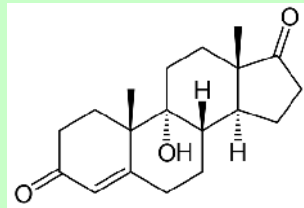
A folyamat első lépése az oldallánc lehasítása. A telített oldalláncú szteroidokat különböző mikrobákkal oxidálva 17-keto termékekhez jutunk:

AD



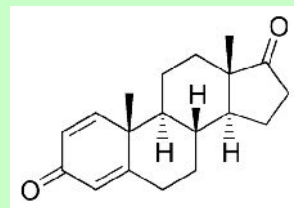
androsztén-dion

9OH-AD



9αOH-androsztén-dion

ADD



androsztén-diéndion



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

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 két szubsztitúens miatt a mikrobák nehezebben tudják lebontani, ha ez a funkcionális csoport, akkor ezt első lépésként kémiai oxidálják.

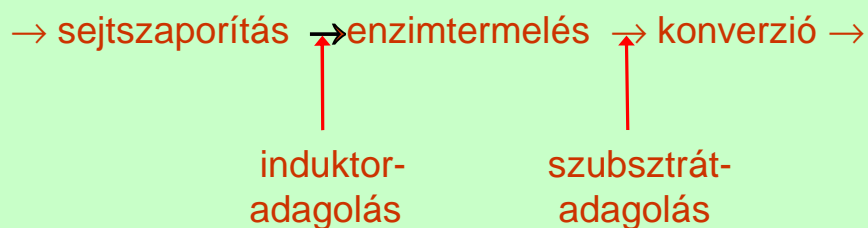


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

Technológiai kérdések

A sokféle konverziós technológia közös elemei összefoglalhatók egy sémába:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

Technológiai kérdések

1. A szteroidok rosszul oldódnak vízben:

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

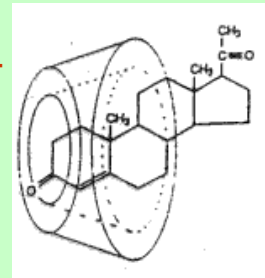


BME Alkalmazott

Technológiai kérdések

A szubsztrát bevitelét különböző trükkökkel kell megoldani:

- A szubsztrátot oldószerben (alkohol) veszik fel, a fermentorba lassan becsorgatva kikristályosodik
- Tenzidekkel, detergenssekkel megolvasztva stabil emulziót készítenek, lehetséges apró kristályok keletkeznek
- Ciklodextrinek – molekuláris csomagolás



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



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 lehajtása
4. Szelektív extrakció: pontosan beállított polaritású oldószer(keverék)kel egy komponens kioldására törekednek a sok közül.

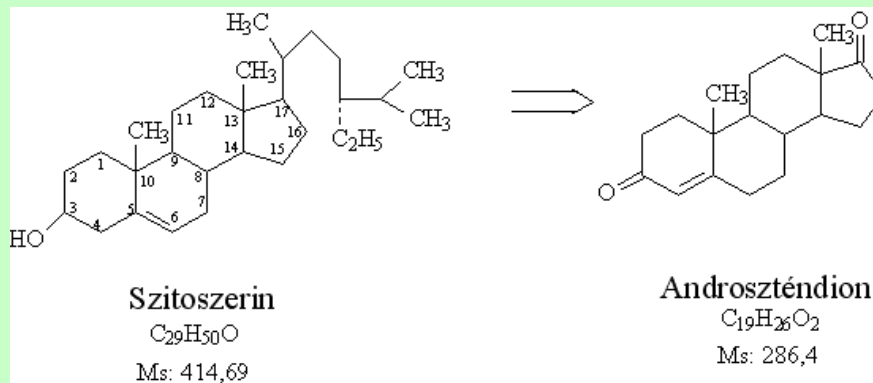


Szitoszterinből el állított vegyületek

Androsztén-dion (AD): több hatóanyag intermediere.

Piaca > 1000 t/év

A szitoszterin oldalláncának a lebontását a *Mycobacterium phlei* törzsszel végzik.

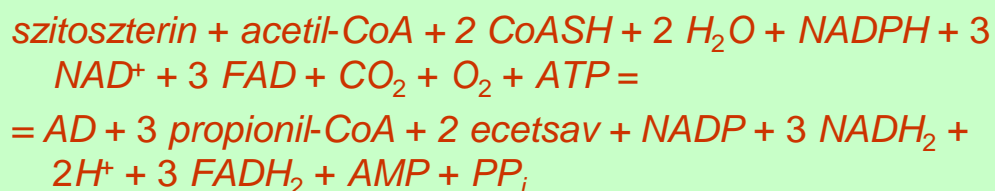


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

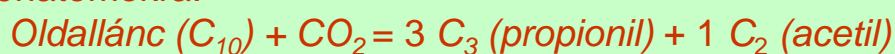
19

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 konverzió hatásfoka kb. 70%-os:

24 g/l szitoszterinből kb. 10 g/l AD + 3 g/l szitoszterin + 1g/l egyéb anyag keletkezik.

Az oldott CO₂ koncentráció javítja a kihozataalt, emiatt a túlzott levegő ztetés hátrányos.

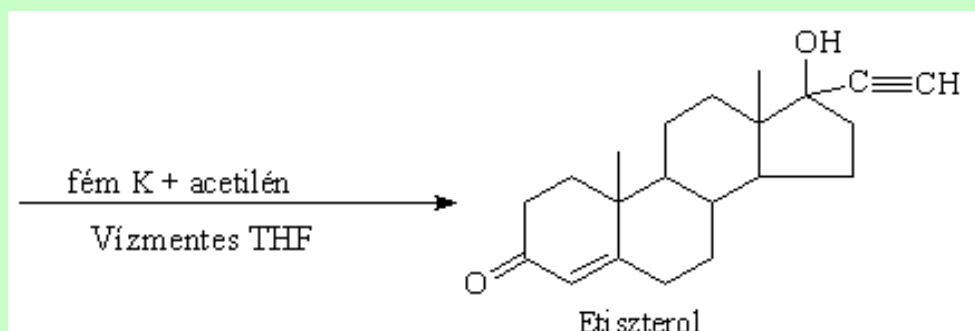
Totálextrakció: a teljes fermentlevet extrahálják diklór-metánnal, majd lehajtják az oldószert.

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



AD technológia

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



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

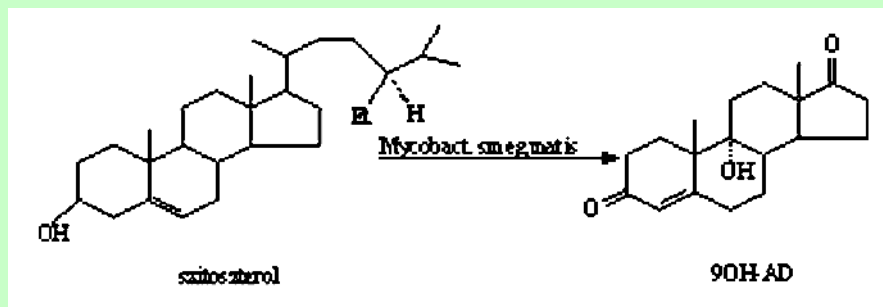
23

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

24

A szubsztrát bevitele

A szitoszterinb 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 sterilizálják. A kétszeri hőkezelés során a tenzidek jelenlétében a szitoszterin átkristályosodik és igen apró szemcseméretű lapos, illetve tetraédrikus kristályok képződnek.

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



Feldolgozás

A fermentációban ~ 12 g/l 9αOH-AD

~ 1-4 g/l szitoszterin

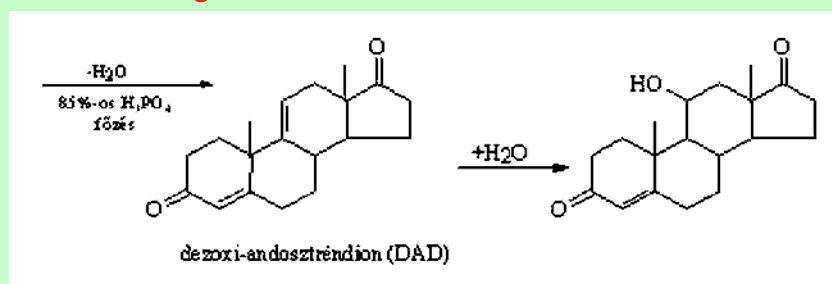
~ 1-3 g/l egyéb szteroid melléktermék

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)



Kémiai reakciólépések

Dezoxi-androsztén-dion (DAD) gyártása: a vízelvonáshoz 85%-os H_3PO_4 -ban fűzik, melynek hatására a 9 és a 11 szénatom között kettős kötés alakul ki, erre később könnyen addicionáltathatunk pl. vizet, vagy HF-ot. Addíciónál az elektronszívó csoport a 11 C atomra kötődik. Ez a substitúció szükséges a kortikoszteroidoknál.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

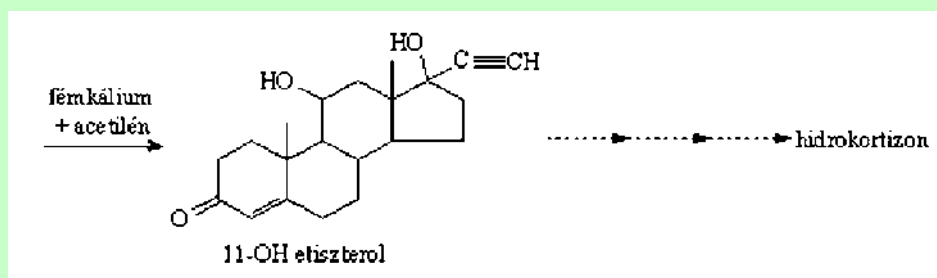
27

Kémiai reakciólépések

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

C2 egység bevitele: Mint az etiszterolnál

Az oldallánc többlépcsős átalakításával hidrokortizon



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Gyulladásgátló szteroidok

A hidrokortizon (= kortizol)

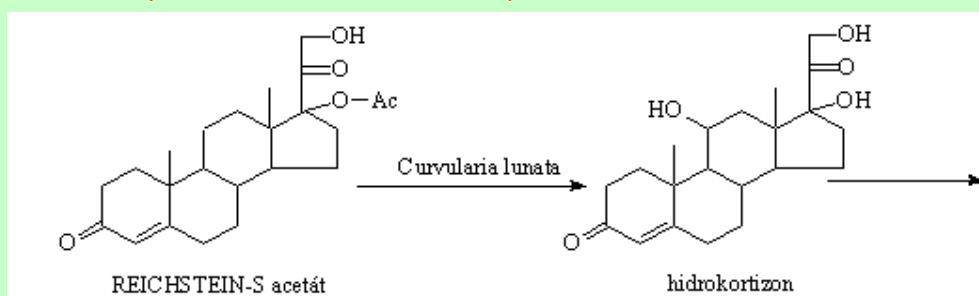
A kortizolnak gyulladáscsökkentő hatása mellett sok egyéb aktivitása van:

- „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.



Gyulladásgátló szteroidok

A hidrokortizon klasszikus előállítása Reichstein-S-acetátból történik (direkt 11-hidroxilezés).



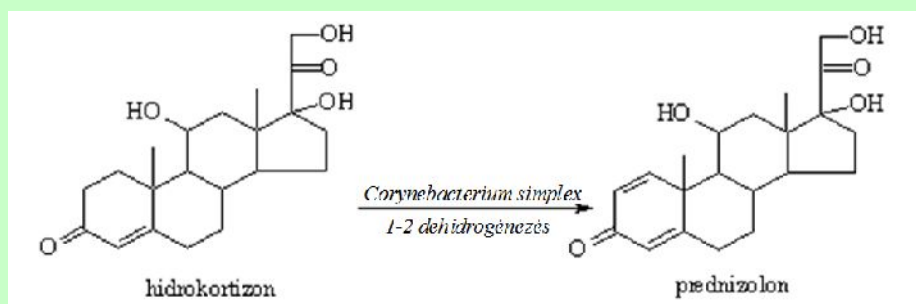
Nem kívánt egyéb hatásai miatt prednizolont állítottak elő helyette, amely szintén gyulladásgátló, de kevesebb a mellékhatása



Gyulladásgátló szteroidok 2.

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

Feldolgozás: extrakció etilacetáttal, bepárlás



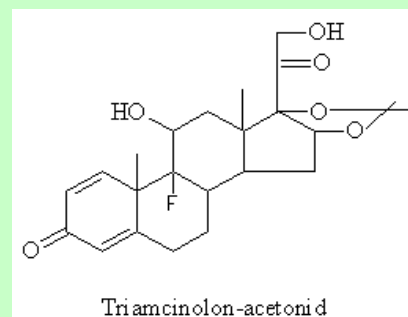
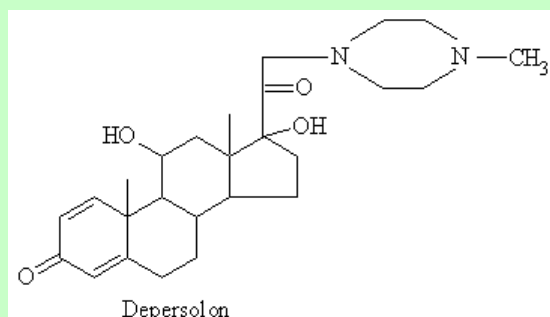
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Gyulladásgátló szteroidok 3.

A prednizolon vízoldhatósága növelhető, különböző szubsztitúensek hozzákapcsolásával:

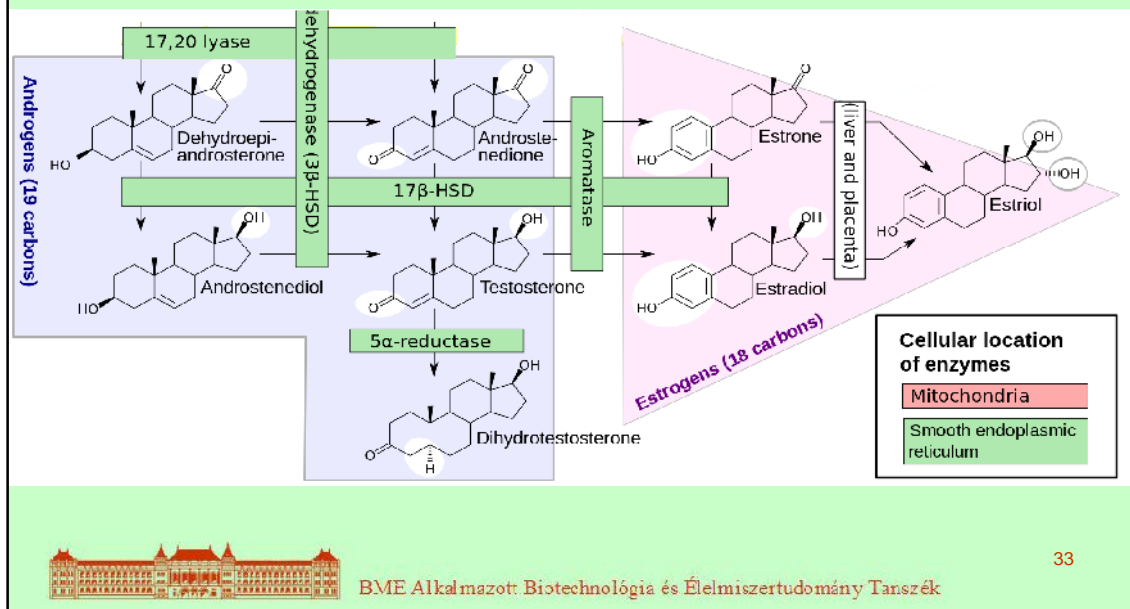
A prednizolonból állítják elő a FTOROCORT kenőcs hatóanyagát, a triamcinolon-acetonid



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

Androgén szteroid hormonok



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

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 vércsejt (+ 10-20%, androgén többlet)

Anabolikus hatás

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

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



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



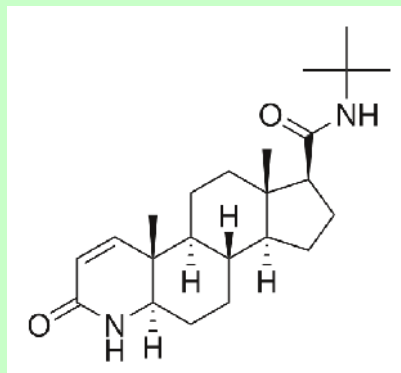
Finaszterid

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



Anabolikus szteroidok

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

Ezeket sportolók és testépítők doppingszerként is alkalmazzák. (Sztanozolol, Nandrolon)

Magyarországon gyártott szer a Nerobol →

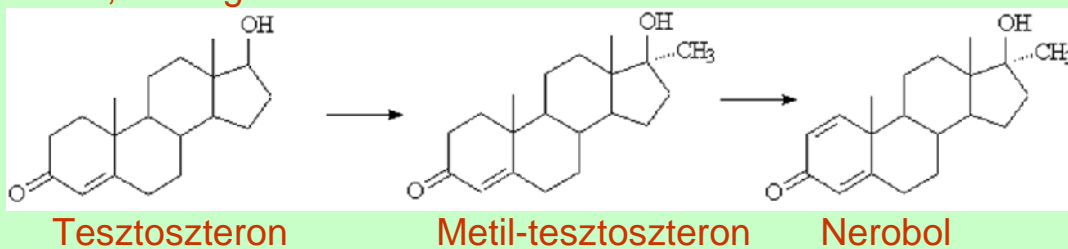


Anabolikus szteroidok

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

Metilezés → metil-tesztoszteron

1-2 dehidrogénezés, ugyanolyan, mint a hidrokortizon prednizolon átalakításánál. Az A gyűrű három konjugált kötése miatt síkba merevedik. Eredmény: anabolikus hatás marad, androgén hatás csökken.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

39

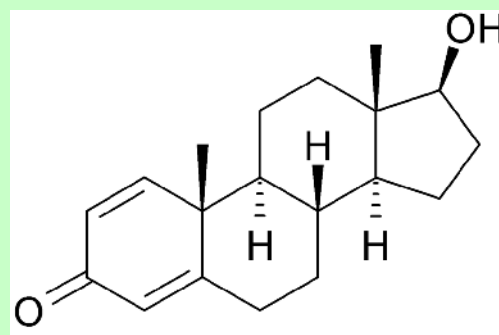
Anabolikus doppingerek

Boldenon:

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

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

Nagyon hosszú ideig marad a szervezetben, még 18 hónap után is kimutatható.
Gyártás: egy lépés ADD-ből, vagy tesztoszteronból



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

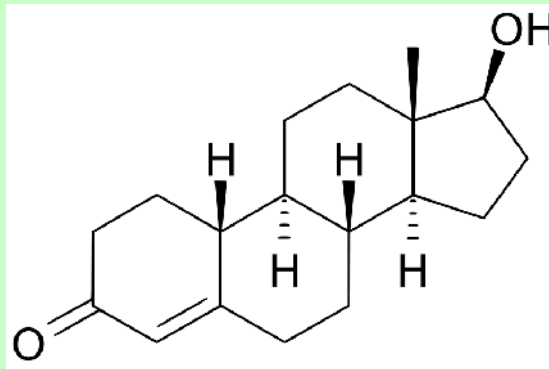
Anabolikus doppingerek

Nandrolone (19-nortestosterone)

Csontritkulásra, vérszegénységre és roborálásra adják id sebb hölgyeknek.

Az általános anabolikus hatások.

A szexuális m ködést mindkét nemben károsítja.



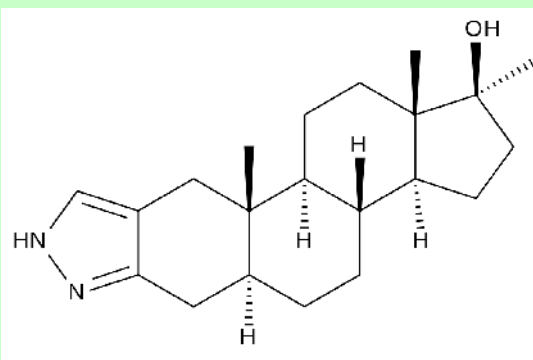
Anabolikus doppingerek

Stanozolol

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

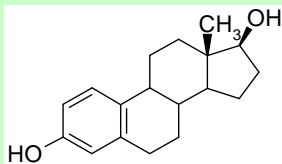
A szokásos anabolikus hatások, embernél és állatoknál.

Gyártás: kémiai szintézissel, több lépésben dihidrotesztoszteronból.



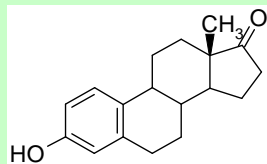
Női nemi szteroid hormonok

Természetes ösztrogének



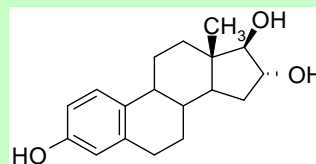
Ösztradiol

(estr-1,3,5-triene-3,17 β -diol)



Ösztron

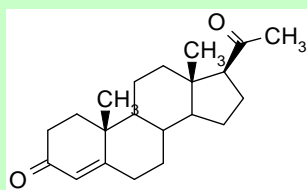
(3-hydroxy-estr-1,3,5-triene-17-one)



Ösztriol

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

Természetes gesztagén



Progeszteron

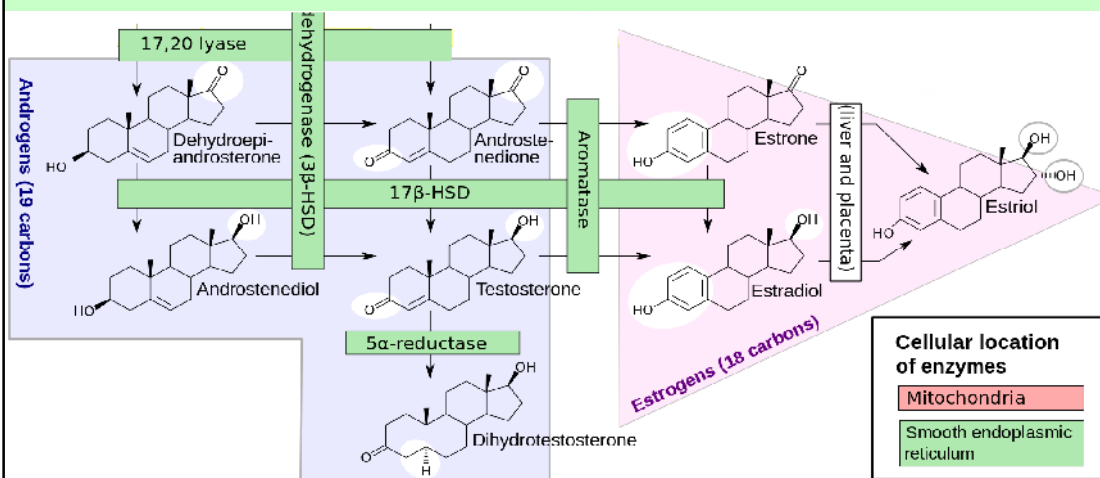
(Pregn-4-ene-3,20-dione)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Az ösztrogének bioszintézise



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

44

N i nemi szteroid hormonok

A természetes ösztrogének fiziológiai szerepe

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

A természetes gesztagének fiziológiai szerepe

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



Fogamzásgátló szteroidok

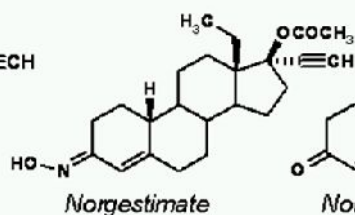
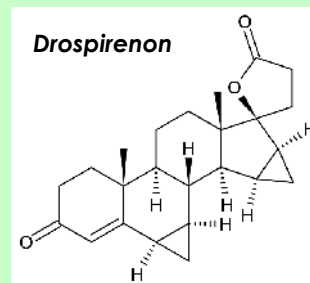
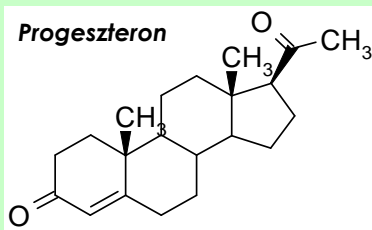
A hormonális fogamzásgátlás a gesztagén hatáson alapul: a szintetikus progeszterin analógok „elhitetik” a szervezettel, hogy a fogamzás megtörtént, így az újabb peteérésre nincs szükség.

Az egykomponens tabletták csak progesztagén hatóanyagot tartalmaznak.

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



Progesztagén szteroidok



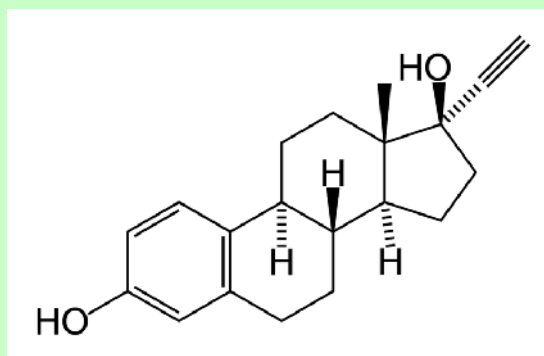
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

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

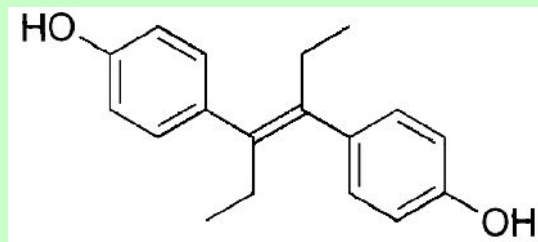
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

1940-70 között használták ösztrogén analóggént, 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

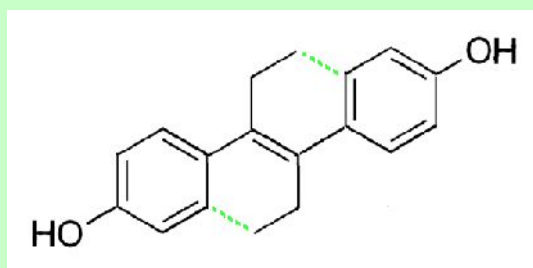
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

1940-70 között használták ösztrogén analóggént, 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

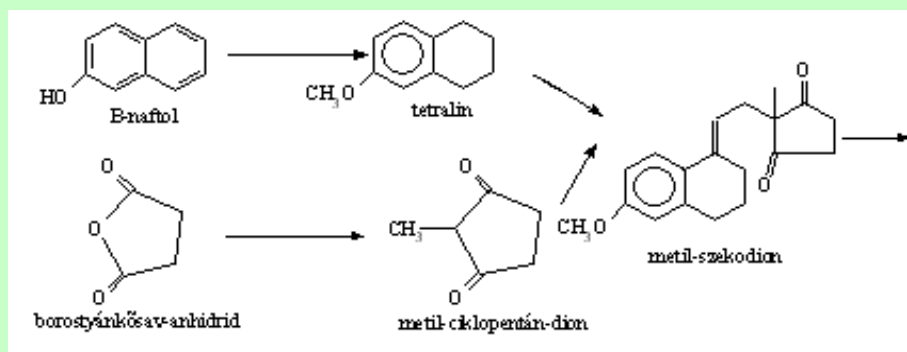
Szintetikus nor-szteroidok

Nor-szteroidok: a 19-es metil csoport hiányzik

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

Szintetikus gyártás: -naftol és borostyánkő sav-anhidrid

A termékek fontos fogamzásgátlók



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

51

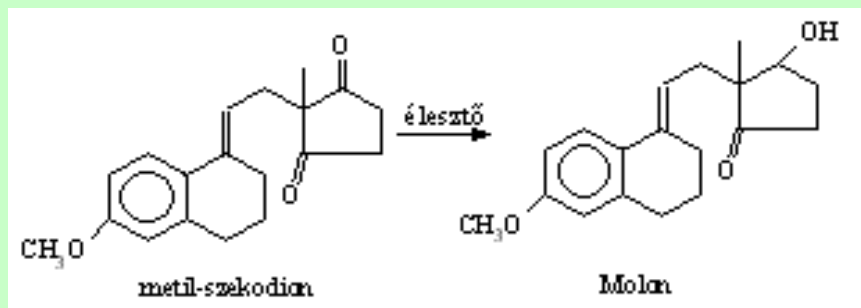
Molon gyártása

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: szűrés, a szűrlépcső extrakciója etilacetáttal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

52

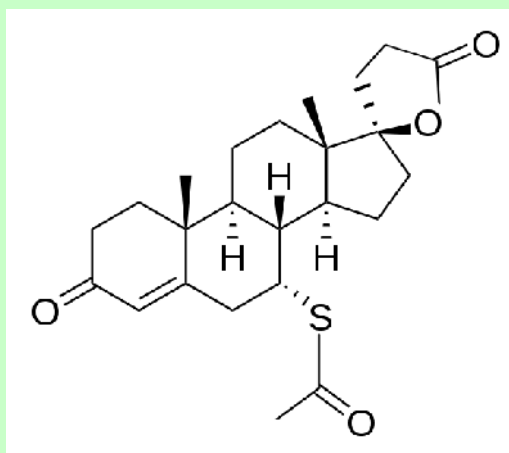
Mineralokortikoid antagonista

Spironolakton:

Lefedi az aldoszteron receptorokat a vesében, szerkezetalóg kompetitív inhibitor. Vízhajtó hatású, de K^+ veszteség nélkül.

Gyártás: etiszterolból több kémiai lépéssel:

- lánchosszabbítás CO_2 kötéssel,
- hidrogénezés,
- gy r zárás,
- reakció tioecetsavval.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Genetikai törzsfeljesztés

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

54

Génmanipuláció

Nagy áttörést jelentett a hidrokortizon de novo bioszintézisének megoldása élesztősejtek manipulálásával. Nyolc emlős gén beépítésével (heterológ expresszió) és öt saját gén inaktiválásával a törzs ~10 g/l kortizolt termelt



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

