

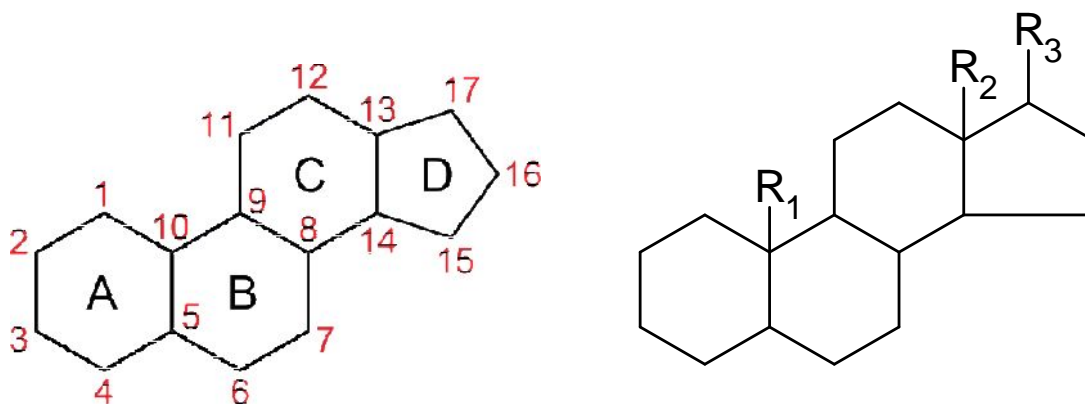
Szteroidkonverziók

A gerinces állati szervezetekben megtalálható szteroidok nagy csoportját alkotják a szteroid hormonok. Ezek közé tartoznak a nemi hormonként számon tartott szex szteroidok, melyek három fő csoportja az androgének, az ösztrogének és a gesztagének. Másik szteroid hormoncsoport a mellékvese kéreg által termelt kortikoszteroidok, melyek képviselői egyrészt a só- és vízháztartás szabályozásáért felelős mineralokortikoidok (aldoszteron), másrészt a szénhidrát anyagcserét és gyulladási folyamatokat – azaz immunfunkciókat – is befolyásoló glükokortikoidok (kortizon). A szteroid hormonok továbbá az anabolikus szteroidok, melyek az ún. androgén receptorokkal lépnek kölcsönhatásba, így fokozzák a nitrogén visszatartáson keresztül az izom- és csontszintézist.

A gyógyszeripar sok szteroid hormont és hormon-analógot állít elő, a gyártások egy része biotechnológiai lépéseket tartalmaz. Előállításuk általában soklépéses folyamat, amelyben a biokémiai és szintetikus lépések egyaránt előfordulnak. A biokémiai lépések rendszerint egyetlen enzimés átalakítást jelentenek, azaz biokonverzióról van szó. Az átalakítások során leggyakrabban nyugvósejtes fermentációt (olyan elszaporított sejttömeg, melynek nincs szénforrása, nem szaporodik) alkalmaznak.

1. Szteroidok felépítése és csoportjai

A szteroidok négy cikloalkán gyűrűs specifikus egymáshoz kapcsolódása során alakulnak ki. A molekula vázát tizenhét szénatom képezi, melyek a szoros kapcsolódó gyűrűk felépítői. Három ciklohexán – A, B és C – és egy ciklopentán –D – alkotja a gonán alapvázat (1. ábra).

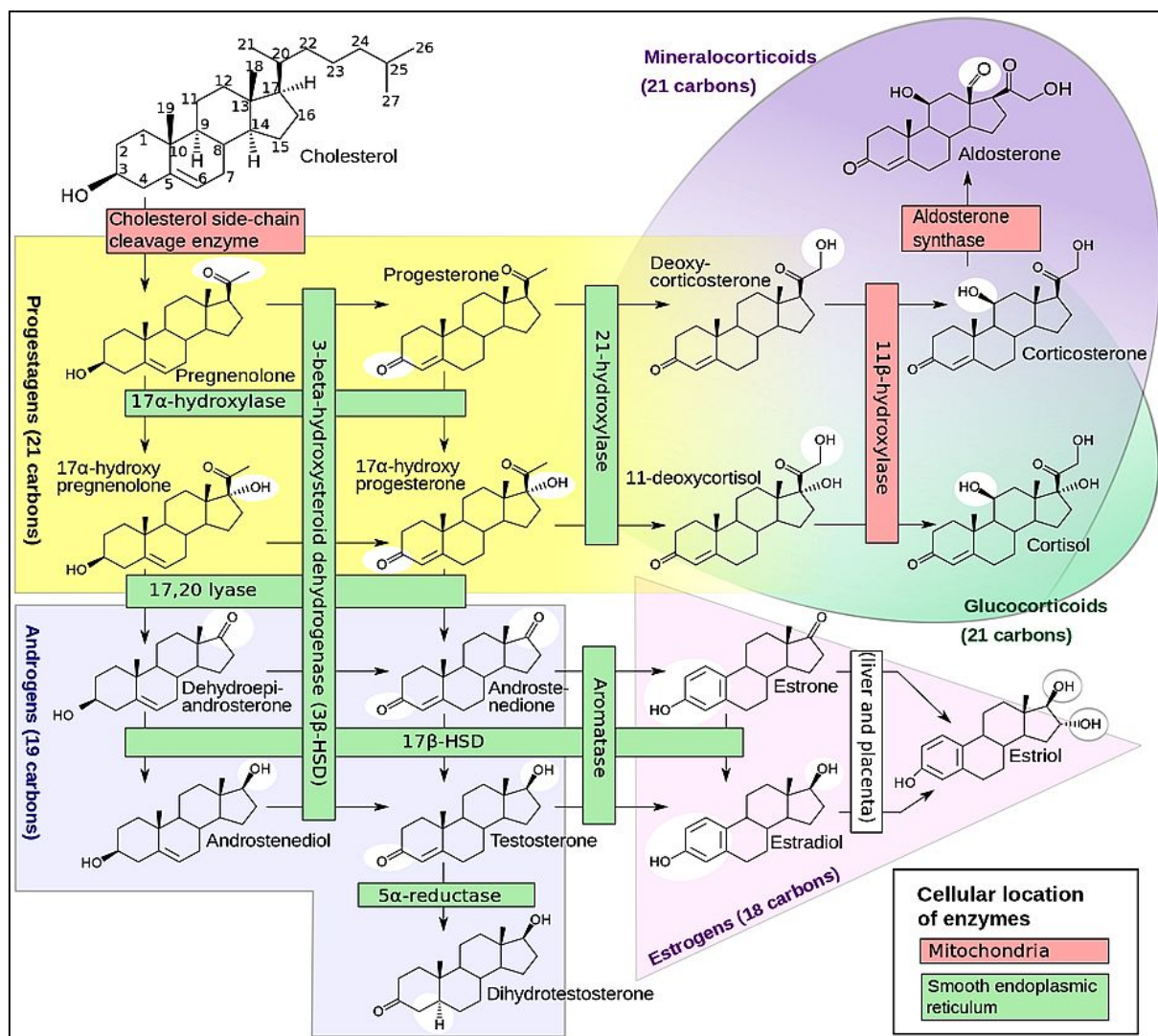


1. ábra A szterán váz felépítése

A szteroidok változatosságát a gyűrűk telítettsége és a hozzájuk kapcsolódó funkcionális csoportok adják. A biogén szteroidokban a bioszintézis a szkvalénből indul (hexaterpén) emiatt a C-10 és C-13 szénatomokhoz metilcsoportok kapcsolódnak, valamint a 17-es szénatomhoz egy nyolc-tíz tagú alkil oldallánc. A vegyületek változatosságához hozzájárul még az oldalláncok konfigurációs helyzete, a kapcsolódó metilcsoportok száma és a gyűrűn található további funkcionális csoportok. Ilyen csoport például a szterinek családjára jellemző, a C-3 szénatomon található hidroxilcsoport. A szterinek képviselőire jellemző továbbá, hogy a kolesztán molekulából származtathatók.

A szteroid konverziók tárgyalása előtt tekintsük át, hogy miként szintetizálódnak az emberi szervezetben az egyes hormonok.

A sémából látható, hogy a szerkezet-hatás kapcsolatok nem különülnek el élesen, sőt



2. ábra A humán sztteroid hormonok bioszintézise

egyféle aktivitású hormonnól kialakulhat egy más hatású sztteroid. Így a férfihormon (androgén) tesztoszteronnól létrejöhet női hormon, az ösztadiol; a női hormon progesteronnól anyagcserére ható kortikoszteron és a vesére ható aldoszteron. Általánosságban elmondhatjuk, hogy a sztteroidok hatásspektruma nem tiszta, a fő hatásuk mellett mindig észlelhetünk egyéb, más sztteroidokra jellemző mellékhatásokat is. A sztteroid kutatás egyik fő iránya, hogy olyan molekulákat állítsanak elő, amelyek a célzott hatás mellett minimálisan befolyásolják, terhelik az emberi szervezetet.

2. El állítás, alapanyagok

A teljes sztteroidán váz kémiai szintézise lehetséges ugyan, de bonyolult és drága, ezért a gyártások a természetből „készen” vett vázból indulnak ki, és ezt alakítják át sok lépésben a kívánt vegyületté.

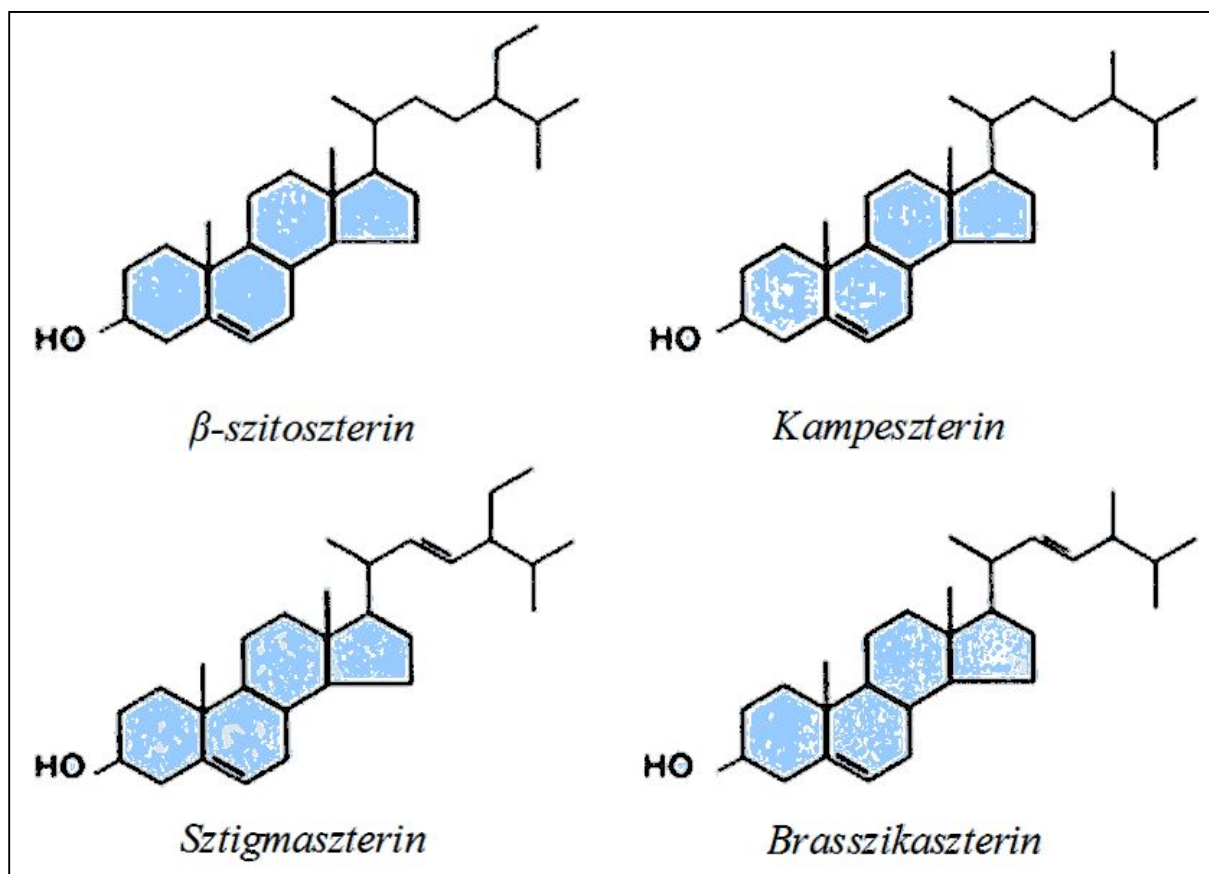
A sokféle sztteroid hormon előállítására a gyógyszeripar különböző kiindulási vegyületeket alkalmaz. Ezek közül a legjellemzőbbek a növényi sztterinek közé tartozó sztigmatsterin, szitoszterin és kampezsterin, továbbá a dioszgenin, a szolaszodin, és a hecogenin mint a szapogeninek képviselői, vagy az állati eredetű koleszterin. Két oka van, hogy a gazdaságilag megvalósítható folyamatok fejlesztése az előbbi szubsztrátokon alapszik. Egyrészt az ala-

csony nyersanyagköltségek, másrészt a rájuk jellemző egyszer átalakíthatóság.

Növényi eredetű szteroid a **szitoszterin**, mely a szójaolajban és egyes fafajták anyagában található, illetve a **sztigmaszterin**, amely a babfélékben fordul elő. A **koleszterint** állatok epeváladékából nyerik, míg szintetikus úton hasonló vegyületeket pl. β -naftol és borostyánkősav-anhidrid reakciójával állíthatunk elő.

2.1 A fitoszterinek képviselői, kinyerése és felhasználása

A fitoszterinek – vagy növényi szterinek – olyan természetesen előforduló vegyületek, melyek szerkezetükben igen nagy hasonlóságot mutatnak a koleszterinnel. Mindkettőnek a négy gyűrűs rendszer adja az alapvázát, kapcsolódik hozzájuk 3 helyzetben hidroxilcsoport, és igen gyakori a 5 és 6 helyzetű szénatomokat összekapcsoló kettős kötés. A szerkezetük mellett biológiai szerepük is hasonló, tekintve a sejtek foszfolipid membránjában kifejtett stabilizáló hatásukat. A legjelentős különbséget jelent az, hogy amíg a koleszterinen található oldallánc nyolc szénatomból áll, addig a fitoszterinek jellemzően kilenc vagy tíz szénatom nagyságú oldalláncot tartalmaznak. Növényfajokból eddig több mint száz különbözőféle fitoszterint azonosítottak, melyek közül a leggyakoribb képviselők (3. ábra) a szitoszterin, a sztigmaszterin, az ergoszterin és a kampezszerin.



3. ábra A leggyakoribb növényi szteroidok

2.2 Források

A növényi szterinek ipari léptékben történő izolálásának két nyersanyaga van, a növényi olajok feldolgozásakor keletkező dezodorálási iszap és a fagyanta, amely a faiparnak egy mellékterméke. A kinyert anyagot – eredetére való tekintet nélkül – felhasználják a gyógyszer- és élelmiszeriparban. A nyers növényi olajokat több lépéses kezelésnek kell alávetni, hogy megtisztítsák azokat szennyező összetevőiktől. A növényi olajok finomításában nyálkátlanító, savtalanító, derítési, valamint viasztalanító és dezodoráló lépéseket alkalmaznak. A fitoszterinek elkülönítése a dezodoráló lépésben következik be. Ez a művelet nyújt lehetőséget az egyébként kis százalékban jelenlévő szterinek koncentrálására (1. táblázat). Szterinek kinyerése céljából felhasznált nyersolajok közt a leggyakoribb a kukoricaolaj, a kukoricarost olaj, a búzacsíra olaj és a szójaolaj.

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

1. táblázat Növényi olajok szterin tartalma

2.2.1 Kinyerés dezodorálási párlatból

A fitoszterinek szterin tartalmú anyagokból való kinyerésére több módszert is alkalmaznak. Ezeket felképp az határozza meg, hogy a szterinek egy része észter formában van jelen a forrásaiban. Ilyen esetekben a kiindulási anyagot hidrolízisnek vetik alá, minek hatására a szterinek felszabadulnak az észter formából. A szteroid-észter tartalmú anyagok hidrolízise megvalósulhat vizes közegben, nagy nyomáson (1,5-50 Mpa) és magas hőmérsékleten (200°C) vagy elszappanosítással, melynél enyhe túlnyomást, magas hőmérsékletet és keverést alkalmaznak. Utóbbi módszer egyúttal kapcsolja össze a hidrolízist és az elszappanosítást. Az összetevők elválasztását és koncentrálását extrakcióval vagy (molekuláris) desztillációval végzik.

2.2.2 Kinyerés fagyantából

Fitoszterinek kinyerésére szolgáló másik forrás a folyékony fagyanta, amely a fa- és cellulózipar egyik mellékterméke. Elsősorban, de nem kizárólag, a fenyőfélékből származó puhafa feldolgozása során képződik. A nyers fagyanta el nem szappanosítható összetevőinek aránya jellemzően 5-35% között változik, a fafajtájától függően. Ilyen alkotók például a viaszok, a hosszúlán-cú alkoholok, a zsírsavészterek, a szterinek és a szteroid észterek. Ezen belül az összes szterin kiteheti a teljes tömeg 3-7%-át, felképp észterezett formában.

A termelés vagy fagyanta szappanból vagy fagyanta szurokból történik, mindkét anyagban vannak elnyei és hátulütői is. Szterinek feldolgozását az utóbbi anyagból már az '50-es években leírták. A szurokban a szterinek mellett előforduló szennyezők nagy molekulású savak – olajsav, sztearinsav – és a nagy molekulású alkoholok, melyek nehezen választathatók el a szterinektől.

A korábbi évtizedekben különböző oldószeres extrakcióval történt a szterinek kinyerése és tisztítása ebből a nyersanyagforrásból. Ezek a módszerek egyre kevésbé fejleszthetők, kö-

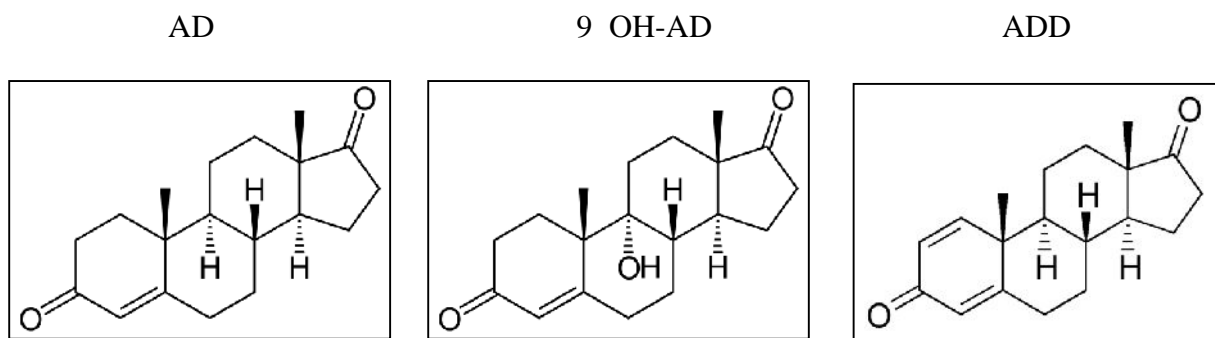
szönhet en az oldószeres használatára vonatkozó szigorú szabályozásoknak. A nagy tisztaságú végtermékkel kapcsolatos elvárások nehezen is teljesültek. Utóbbi okok vezettek a desztilláción alapuló eljárások kifejlesztéséhez.

A szterin frakción belül a β -szitoszterin a legáltalánosabban használható vegyület. Ennek dúsítására, tisztítására további lépésekre van szükség. Jellemzően frakcionált kristályosítást alkalmaznak, a szterin frakciót forró szerves oldószerben (pentanol, ciklohexanon, vizes alkoholok) oldják, és fokozatosan lehűtik, néha oltókristállyal gyorsítják a kristályok kiválását. A tiszta anyag elállítása csak több lépésben lehetséges, emiatt nagyon drága. Emiatt az ipari technológiákban gyakran beérik 70-80%-os tisztaságú, de olcsóbb alapanyaggal, különösen, ha a mellékkomponensek is hasonló szerkezetű, hasznosítható szteroidok.

A sztigmaszterint gyakran előbb progeszteronná oxidálják kémiai eljárással, mivel a benne található C22-es kettős kötés gátolja az alkalmazott mikroorganizmusok metabolizmusát.

2.2.3 Az oldallánc lehasítása

A szitoszterin (a gyakorlatban β -szitoszterin és kampezterin keveréke) és a koleszterin oldalláncát mikrobiálisan bontják le, és oxidálják 17-ketoszterinekké, elsősorban androszt-4-én-3,17-dionná (AD), 9-OH-AD-ná és androszt-1,4-dién-3,17-dionná (ADD).



4. ábra androsztén-dion

9 OH-androsztén-dion

androsztén-dién-dion

Ez a három vegyület sokféle további gyártás alapanyaga, az elsőkettő éves világpiaca egyenként is ezer tonna fölött van.

A kiválasztott szteroid alapanyagból a kívánt gyógyszerhatóanyag kialakítása többlépcsős folyamat, amelynek során a szterán váz megváltozásával mindig csak egy-két funkcionális csoportot alakítanak át, vagy kettős kötetést hoznak létre. Egyes lépéseket kémiai úton is meg lehet valósítani, de számos esetben a biokonverzió előnyösebb. A szteroid gyártó üzemek így szintetikus és fermentációs átalakításokra egyaránt alkalmasak, a kémiai és biológiai üzemegységek egymásnak adják az intermediereket.

A biokonverzió előnyei:

- enyhe kémiai és hőmérsékleti körülmények közt mennek végbe
- sztereoszelektív átalakítások lehetségesek
- nem szükséges védőcsoportokat rákapcsolni, majd eltávolítani.

Hátrányai:

- Minden konverziós lépéshez külön enzimet (=törzset) kell keresni. Az alkalmazott törzsek nagyon sokfélék, lehetnek baktériumok, élesztők, fonalas gombák. A bennük azonosított, és a technológiában kihasznált enzimek eredeti szubsztrátja sokszor nem

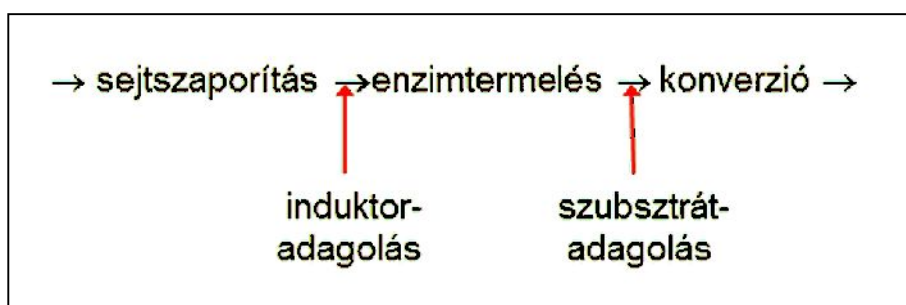
is az átalakítandó szteroid, hanem valamilyen más molekula, csak a szerkezeti hasonlóság miatt az enzim a szteránváz bizonyos régióját ismeri fel, köti meg és alakítja át = régióspecifikus enzimek.

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

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

3. A konverziók általános lefolyása

Számos különböző technológia létezik, az alábbiakban egy olyan „állatorvosi ló” technológia kerül bemutatásra, amely az összes lehetséges technológiai lépést, megoldást tartalmazza. A folyamat lépései tehát:



5. ábra A biokonverziós technológia lépései

A technológia ugyanúgy egy vagy több oltótenyészet szaporításával indul, mint bármely más fermentáció. A megfelelő sejtszámú és állapotú inokulummal oltják a fermentációt.

Ennek első szakasza a sejtszaporítás a törzs igényeinek megfelelő tápoldaton.

A sejtek elszaporodása és a táptalaj részleges kimerülése után a konverzióhoz szükséges enzimet indukálják - induktor anyagot adagolnak. Ez lehet a szteroid szubsztrát kis adagja, lehet egy olcsóbb szteroid molekula vagy egy szintetikus molekula, pl. naftol-származék. Az indukció hatékonyságát enzimaktivitás mérésével lehet ellenőrizni. Az aktivitás általában 10-24 óra alatt eléri a kívánt szintet.

A szteroid szubsztrát beadagolása. Komoly problémát jelent, hogy a szteroidok rosszul oldódnak vízben, ezért a szubsztrát kristályok formájában van jelen a lében, a víz-fázis telített oldatnak tekinthető. Az enzim/mikroba az oldatból felveszi a szubsztrátot, átalakítja, és leadja a terméket. A termék is rosszul oldódó szteroid, koncentrációja gyorsan eléri az oldhatósági határt, és ez is kikristályosodik a fermentálékban. Ezt a jelenséget kristályfermentációnak nevezik. Látványosan nem történik semmi, a mikroszkóp

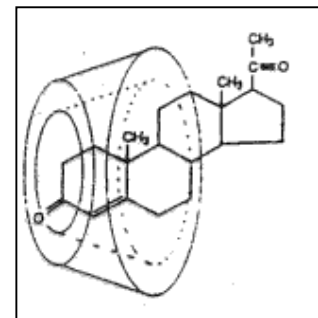


6. ábra Szteroid kristályok mikroszkópos képe (300x)

alatt a sejtek mellett kristályokat látunk. A folyadékban a kristályok mennyisége nem változik, a szubsztrát és a termék koncentrációja állandó (telítési), a konverzió mégis folyik. Végtermékgátlás nem lép fel, hátránya viszont, hogy tömegátadási problémák léphetnek fel. Két folyamat működik egyidejűleg, az enzim fogyasztja a szubsztrátot, ettől az oldat koncentrációja kissé lecsökken a telítéshez képest, és a kristályok oldódása pótolja az átalakított anyagot. Az egymást követő folyamatok közül mindig a leglassabb a sebességmeghatározó. A mérnöki cél az, hogy használjuk ki teljes mértékben az enzim kapacitását, tartsuk fenn a maximális (telítési) koncentrációt, az átalakítás sebessége legyen a meghatározó (=reakció rezsim). Ehhez viszont minél nagyobbra kell növelni az oldódás sebességét – ez pedig a kristályok fajlagos felületének megnövelésével érhető el. Ez indokolja, hogy a szubsztrát bevitelénél a mikrokristályos szerkezet elérésére törekednek. Ennek elérésére kétféle technikát is alkalmaznak, mindkettő azon alapul, hogy a folyadékot sokkal egyszerűbben diszpergálni, mint a szilárd anyagokat.

- A szubsztrátot felveszik oldószerben (olyan szerves oldószer kell, amely a vízzel elegyedik, és emellett nem károsítja a tenyésztetet, pl.: etanol), és lassan a fermentorba engedik. Az alkohol kihígulása következtében a szteroid kikristályosodik, megfelelő kivitelezéssel igen apró, nagy felületű kristályokat kapunk.
- Olajokkal, glicerinnel, tenzidekkel és detergenssekkel megolvasztják a szteroidot (lesterilezik), és az olvadt anyag apró cseppekre diszpergálható (emulzió képzés). Lehetővé teszi az apró cseppekben a szemcsék/kristályok lesznek, nagy fajlagos felülettel.

A szubsztrát bevitel megoldható ciklodextrinokkal is. A ciklodextrinek molekulája alkalmas apoláris jellegű molekulák befogadására, így a szteroidokkal is zárványvegyületet képez. Ez egy reverzibilis folyamat, a szabad és kötött molekulák kémiai egyensúlyban vannak. Ahogy az átalakulás során a szabad szubsztrát molekulák fogynak, a komplex feloszpadva folyamatosan pótlódnak, így végbemehet a teljes konverzió.



7. ábra Szteroid-ciklodextrin komplex

Lipofil szubsztrátot és termékeket tartalmazó folyamatok produktivitását igen gyakran kétfázisú rendszerekkel szokták javítani. A megosztlás révén a vízoldhatatlan szerves fázis egyaránt tárolja a szubsztrátot és a terméket is. A szubsztrát koncentráció a vizes fázisban közel állandó értéken van, mivel annak oldhatósága a szerves fázisban sokkal magasabb. Hasonlóképp oszlik meg a képződött termék is a két fázis közt, következésképpen a termékkinyerés igen egyszerű.

Fitoszterin szubsztrát esetében szójaolajat, napraforgó olajat, PPG-t és szilikonolajat használtak a szteroid feloldására és bevitelére. A szerves fázis jelentősen növelte a fitoszterin hozzáférhetőségét, ezáltal a képződött AD mennyiségét is. PPG-nel az AD-ra számolt hozam elérte a 80%-ot is 30 g/l kiindulási fitoszterin koncentráció mellett.

Az itt bemutatott sémánál egyszerűbb technológiák is használhatók. Létezik olyan megoldás, amelynél a szubsztrátot a már a fermentáció elején teljes egészében bemérik, így a külön indukció, enzimaktivitás mérés feleslegessé válik.

Feldolgozás. A szteroid egy része oldott, a másik része szilárd fázisban van, ilyenkor rendszerint előbb teljes/totál extrakciót végeznek szerves apoláris oldószerrel, pl. diklór-metánnal, mely minden apoláris anyagot kiold. A fázisok szétválasztása és az oldószer lehajtása után szilárd vegyes anyag marad vissza (pl. szubsztrát, termék és melléktermékek együtt). A

következ lépésben olyan oldószert alkalmaznak, mely ebb l szelektíven old ki egy komponst = ez a szelektív-, vagy differenciál-extrakció.

4. Szitoszterolból el állított vegyületek

4.1. Androszténdion (AD)

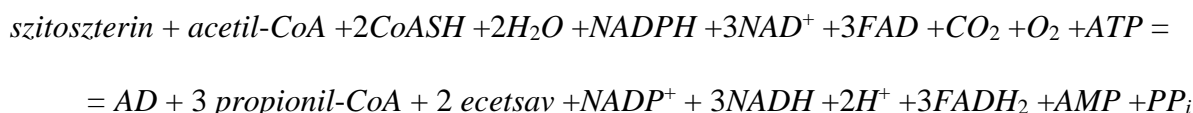
A gyógyszerhatóanyagok gyártásában az egyik legfontosabb köztitermék az androszténdion (androszt-4-én-3,17-dion). Az AD egy tizenkilenc szénatomból álló szteroid hormon, mely a magasabb rend szervezeteknél a mellékvesében és az ivarmirigyekben termel dik. Mesterséges úton el állítható szerves szintetikus módszerekkel (drága) vagy a szterinek oldalláncának mikrobiológiai hasítása révén. Az androszténdiont régóta alkalmazzák androgén és anabolikus készítmények el állításnak kiindulási anyagaként. Ennek következtében az AD világi piaci éves igénye meghaladja az ezer tonnát is.

Növényi és állati eredet szterinek oldalláncának hasítására, és ezáltal AD termelésre több mikrobafajt is alkalmasnak találtak (2. táblázat).

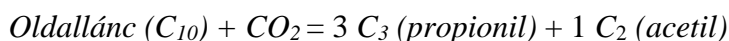
Szubsztrát	Mikroorganizmus
Koleszterin	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Arthrobacter simplex</i> , <i>Brevibacterium lipolyticum</i> , <i>Nocardia ahena</i>
Szitoszterin	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>Mycobacterium flavum</i>
Koleszterin, szitoszterin, sztigmaszterin, ergoszterin	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3805

2. táblázat AD termelésére alkalmas mikrobatörzsek

A szitoszterin AD-ná alakításának enzimikus lépéseiben összesen 11 katabolikus enzim játszik szerepet, 14 egymást követ lépésben. A teljes folyamat a kofaktorok regenerációját igényli. Az els lépés egy támadás az oldallánc végén. A C27 terminális metil csoporthoz egy hidroxilcsoport kapcsolódik, mely ezután karbonil csoporttá oxidálódik. Ezt követi egy karboxilációs lépés a C28 pozícióban. Az els lépést három enzim együttesen hajtja végre, melyek telített oligoizoprén származékok és az oxigén alacsony parciális nyomása által indukálhatóak. A második lépés szén-dioxid fixálással jár, így az oldott szén-dioxid koncentráció pozitív hatást gyakorol a -szitoszterin AD-ná történ biotranszformációjában. Az 1% széndioxidot tartalmazó leveg t több kísérletben el nyösnek találták. Ezekb l következik, hogy a túl intenzív leveg ztetés negatívan befolyásolja a termékhozamot (sok a bevitt oxigén, a széndioxidot pedig kihajtja). Sztöchiometriailag egy szitoszterin molekula oldalláncának lehasításakor 3 molekula propionil-CoA, 3 molekula FADH₂, 3 molekula NADH és egy molekula ecetsav képz dik. A keletkezett propionátok és az acetát a Krebs ciklusba jutva energiaként hasznosulnak. Az AD biológiai úton történ el állításának nehézségeit a szteroid váz felbomlása és az androszténdion által kifejtett termékkihívó jelenti.



Szénatomokra nézve:



A kettős kötés „átfordulása” annak köszönhető, hogy így konjugált helyzetbe kerül az oxo-csoport kettős kötésével, ami energetikailag kedvezőbb.

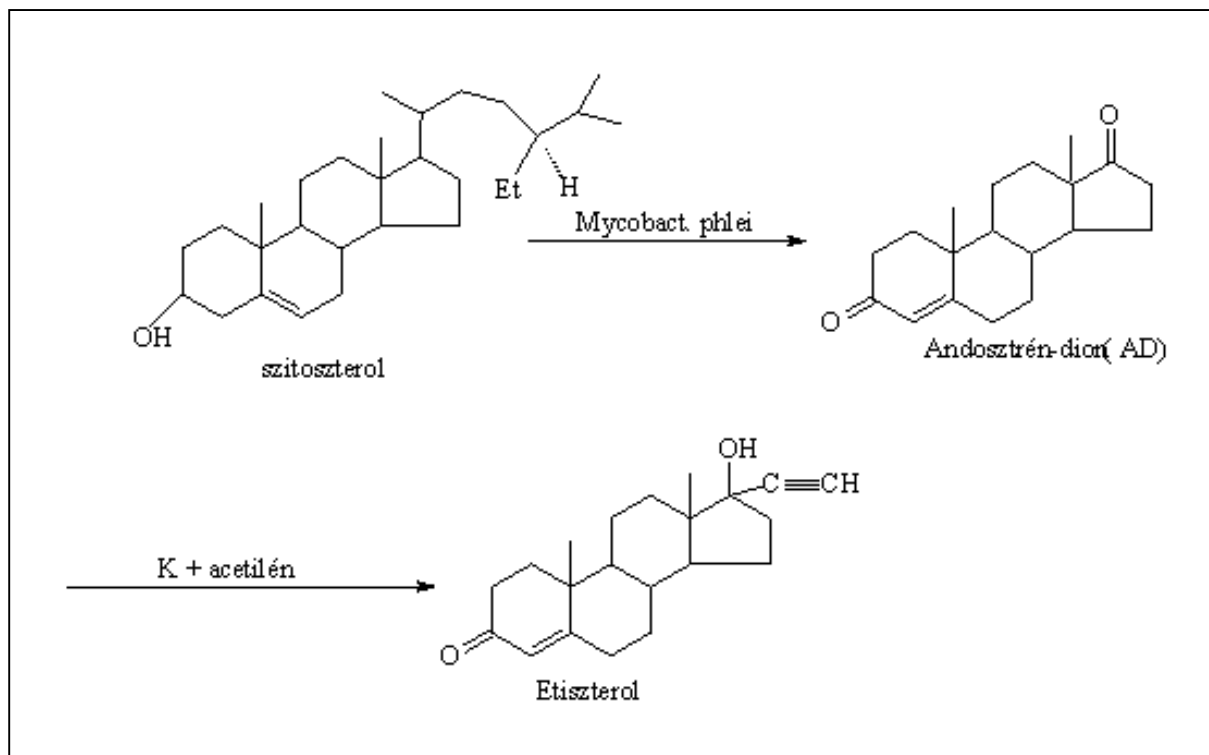
A szterinekből kiinduló androszténdion ipari gyártásakor döntően *Mycobacterium* törzseket alkalmaznak. A *Mycobacterium* nemzetség képviselői a *Nocardia*-k és *Rhodococcus*-ok családjába tartoznak. A mikobakteriális sejtek Gram-pozitívak, szigorúan aerobok, enyhén hajlított pálcá alakúak. A csoportba tartozó baktériumok néha elágazó, fonalas növekedések; a fonalszerű képletek a legkisebb beavatkozásra egyedi sejtekké esnek szét. A *Mycobacterium* fajok egyik csoportosítása alapján lehetnek obligát patogének (*M. bovis*, *M. tuberculosis*), lapangó patogének (*M. avium*, *M. fortuitum*) vagy szaprofita fajok (*M. phlei*, *M. smegmatis*). Szaprofitákat talajból, sós- és édes vizekből izolálták.

A mikobakteriumok rendkívül lassan növekednek. Esetenként 40 napos inkubáció után képződnek csak látható telepeik a komplex táptalajok felületén.

Az eljárásban használt, az ún. *Mycobacterium sp. BM6* egy gyors növekedésű, apatogén mikobaktérium, amely a *Mycobacterium phlei* fajnak egy mutánsa. A sejtek pálcá formájúak, kicsik, átlagosan 1 µm hosszúak, és 0,2-0,5 µm az átméjük. A különálló sejtek az apoláris felületű, viaszos sejtfal okán hajlamosak aggregátumokba összeállni. A sejtfal védőhatása miatt a sejtek savval, alkohollal, és egyéb kémiai és fizikai hatásokkal szemben ellenállóak. Amorf telepeket képez, amelyeket a termelt pigment narancssárgára színez. A *Mycobacterium sp. BM6* törzsnek fontos jellemzője, hogy szteroid-1,2-dehidrogenáz és 9-hidroxiláz hiányos mutáns, emiatt a szteroid váz bontására nem képes. Telítetlen szterineken növekedve androszténdiont állít elő.

Az AD konverzió hatásfoka 70% körüli. A lében 24 g/l szitoszterinből mintegy 10g/l AD keletkezik, megmarad kb. 3g/l szitoszterin és közel 1g/l egyéb anyag keletkezik. A tíz g/l termék nagyon kis értéknek tűnik, de vegyük figyelembe, hogy a molekula közel egyharmadát elveszti az átalakítás során.

A teljes fermentlevet diklór-metánnal extrahálják, majd elválasztják és lehajtják az oldószert. A szelektív extrakciót 85%-os metanollal végzik, amely az androszténdiont oldja, a szitoszterint viszont nem.



8. ábra Az AD intermedier gyártása

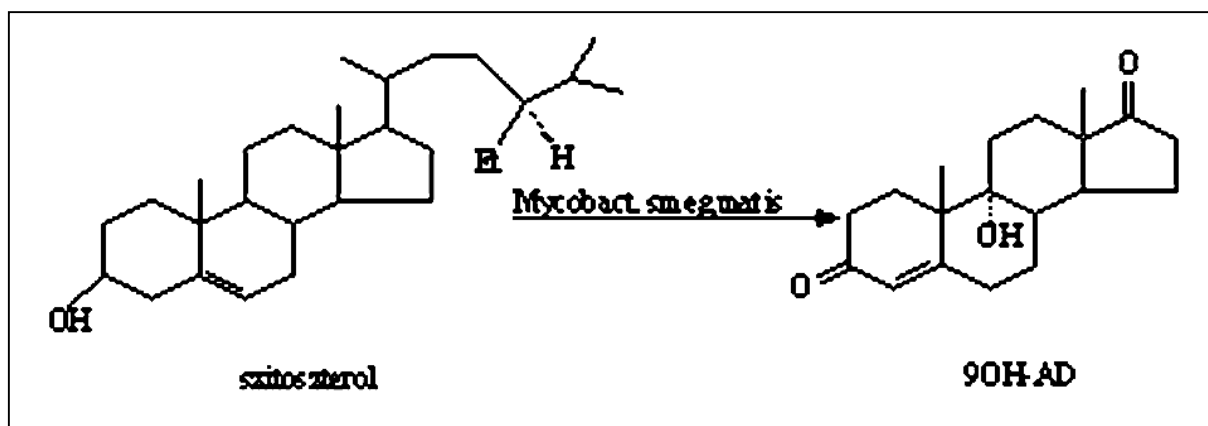
Az AD maga is hormon, androgén hatása kb. 20%-a tesztoszteronénak, de számos további termék intermediere. AD-ból állítják el többek között a spironolaktont, a finaszteridet és a drospirenont is. A spironolakton az aldoszteron-antagonista hatásáról ismert vizelethajtó készítmény, mely diuretikus hatásából következően vérnyomáscsökkent hatással is rendelkezik. A finaszteridet a jóindulatú prosztata-megnagyobbodás kezelésére alkalmas szerként törzskönyvezték. További, az AD átalakításából nyert hatóanyag a drospirenon, melyet progesztagén tulajdonsága miatt fogamzásgátló szerként alkalmaznak.

Az AD technológia második lépése kémiai reakció, acetilén gázzal vízmentes THF-ben fém kálium jelenlétében acetilidet képeznek. A keletkezett etiszterol maga is gyógyszerhatóanyag (progesztagén hatású), de többféle úton is továbbalakítják.

4.2. 9α -hidroxi-androsztén-dion (9α OH-AD)

Mikroorganizmus: *Mycobacterium smegmatis*

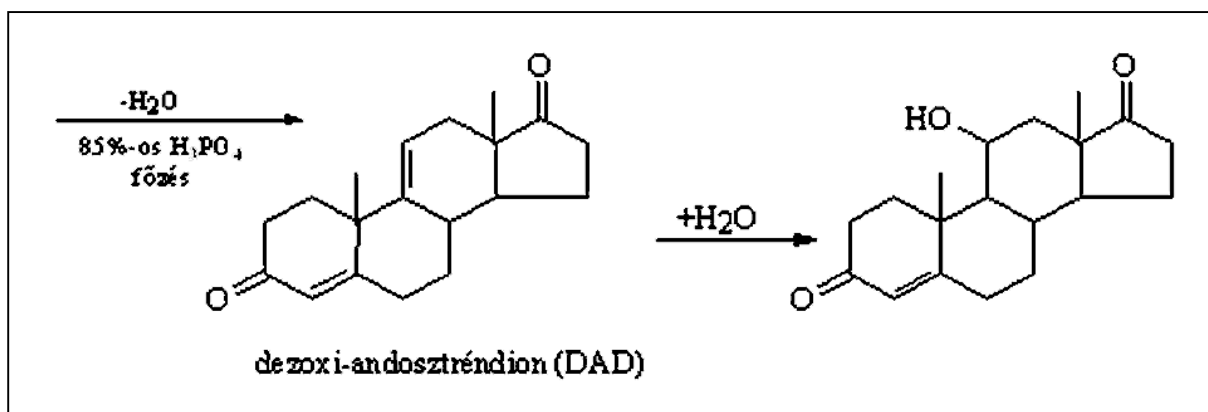
A biokonverzióban 30 g/l-es koncentrációban bevitt szitoszterinből a mólsúly csökkenést és a melléktermék képződést figyelembe véve 14,5 g/l elméleti konverzió érhető el. Az üzemi fermentációnál 10-11 g/l-es átlagszint érhető el. (Konverziós fok ~ 70%).



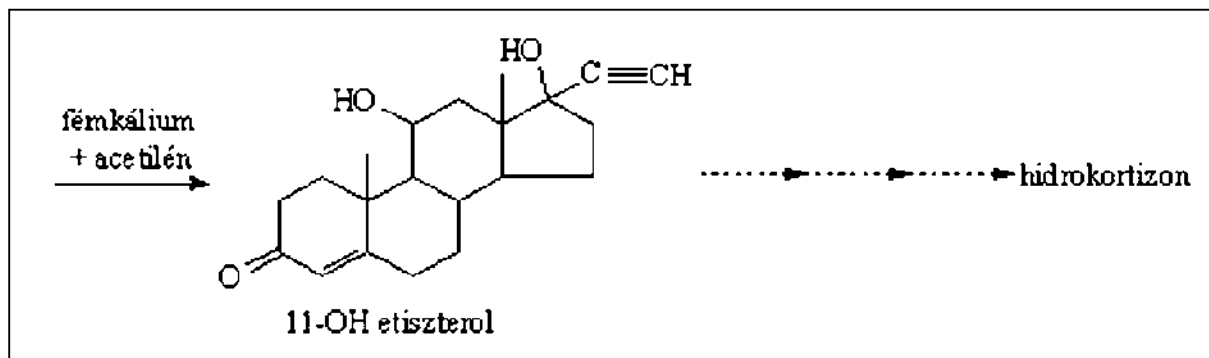
9. ábra A 9α OH-AD létrehozása

Feldolgozás: szelektív oldószerként di-izopropil-étert alkalmaznak, amely a szitoszterolt oldja, a 9α OH-AD-t nem.

A második lépés itt is kémiai, a vízelvonáshoz 85%-os H_3PO_4 -ban fűtik, melynek hatására a 9. és a 11. szénatom közötti kettős kötés alakul ki, erre később könnyen addicionáltathatunk pl. vizet, vagy HF-ot. Mindkét esetben az elektronszívó csoport a 11. C atomra orientálódik, ez a kialakuló szerkezet a gyulladásgátló szteroidok alapja.



10. ábra A 9α OH-AD átalakítása

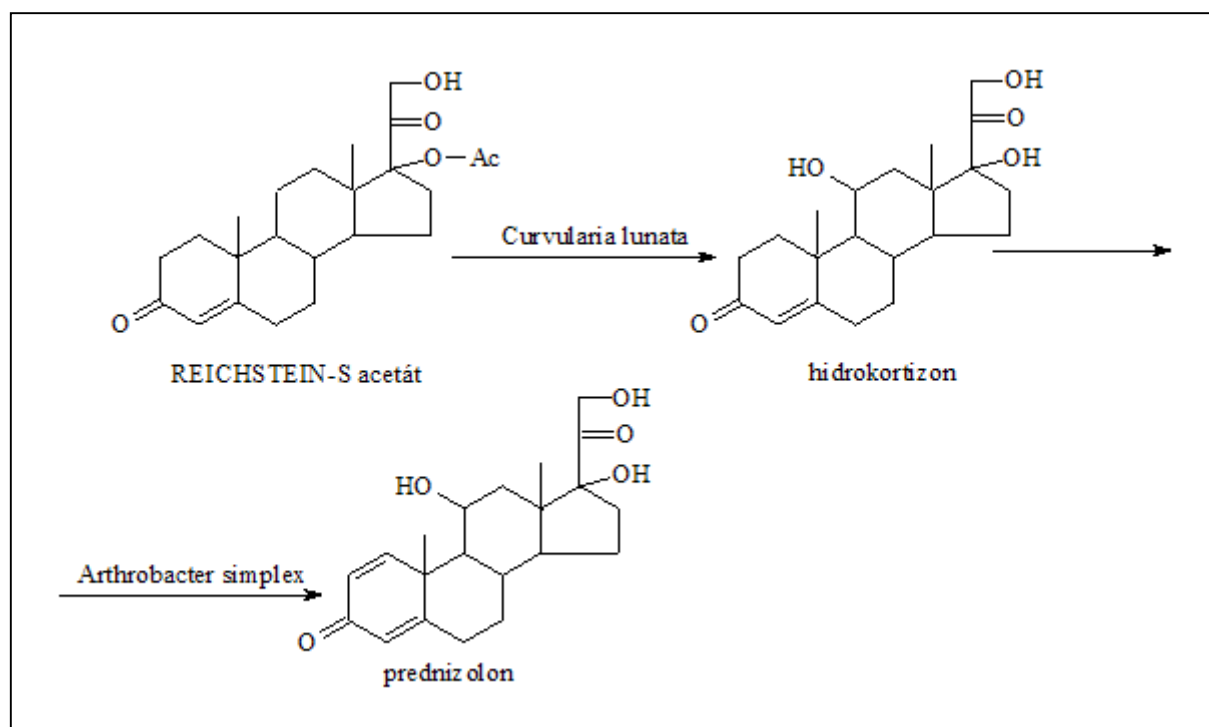


11. ábra Gyulladásgátlók kialakítása

Víz addíciónál az OH csoport a 11-es szénatomra kötődik. A 11-OH-AD-hez fém káliumot és acetilént adva **11-OH etiszterol** keletkezik, melynek C2 oldalláncát több lépésben átalakítva hidrokortizon állítható elő.

5. Gyulladásgátlók

A kettős kötésre hidrogén-fluoridot addicionáltatva fluorid származékokat, szuperkortikoidokat (nagyhatású gyulladásgátlókat) kapunk.



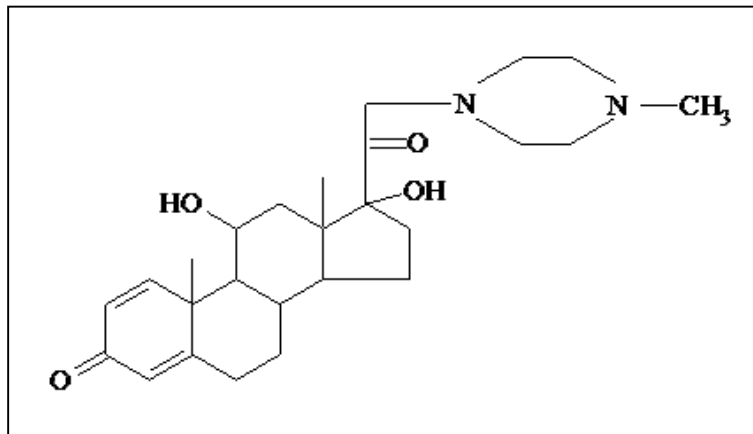
12. ábra A klasszikus gyulladásgátlók

A **hidrokortizon** (szinonim neve: **kortizol**) maga is gyulladásgátló és további gyulladásgátlók alapanyaga, amelyet a klasszikus úton REICHSTEIN-S acetátból állítottak elő, de a 11OH-etiszteronból is kialakítható. A hidrokortizon is hatékony gyulladásgátló, de kedvezőtlenül hat a só- és vízháztartásra, ezért kis módosítással **prednizolont** állítanak elő belőle, amely szintén jó gyulladásgátló, azonban kevesebb a mellékhatása. A harmadik kettős kötés bevitele az A gyűrűt „kifeszíti”, az eredetileg szék konformációjú gyűrű majdnem koplánáris-szerű alakul, ettől megváltozik a molekula kötődése a receptorokhoz. Ezt az átalakítást további

hormonanalógok kialakításánál alkalmazzák, lásd később az anabolikus szteroidoknál.

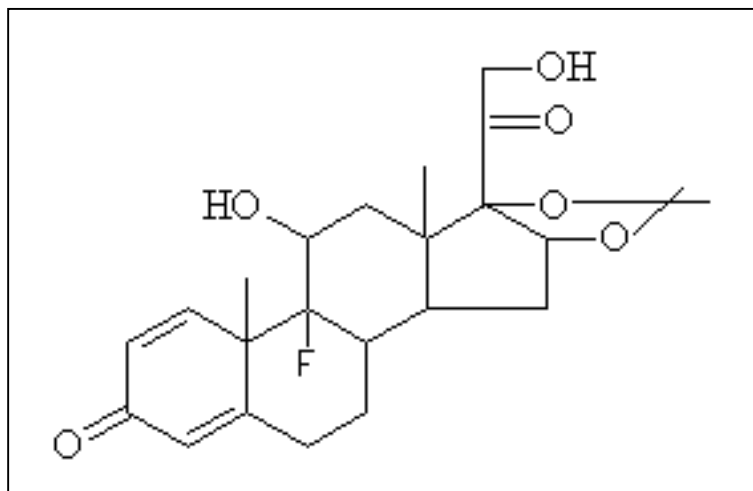
Érdekes mellékreakció, hogy a 20-keto vegyületek jelenléte indukálja egy 20-dehidrogenáz enzim termelését. Ez viszont a mind a szubsztrátot, mind a célterméket átalakítja, hatástalanítja. Ennek elkerülésére azt a trükköt alkalmazzák, hogy az indukcióra oldallánc nélküli vegyületet, például AD-t adnak, ennek hatására termelődik a Δ -1 dehidrogenáz, de a 20-dehidrogenáz nem. Amikor az enzimaktivitás eléri a maximumát, hozzáadják a szubsztrátot, és hogy az ezáltal indukált enzimtermelést megakadályozzák, egyidejűleg kloramfenikolt is adnak a fermentorba. Ez a fehérjeszintézist gátló antibiotikum leállítja az enzimfehérjék termelését.

A prednizolon vízoldhatósága különböző szubsztituensek hozzákapcsolásával növelhető:



13. ábra Depersolon

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



14. ábra Triamcinolon-acetonid

6. Nemi hormonok

6.1. Androgén szteroid hormonok

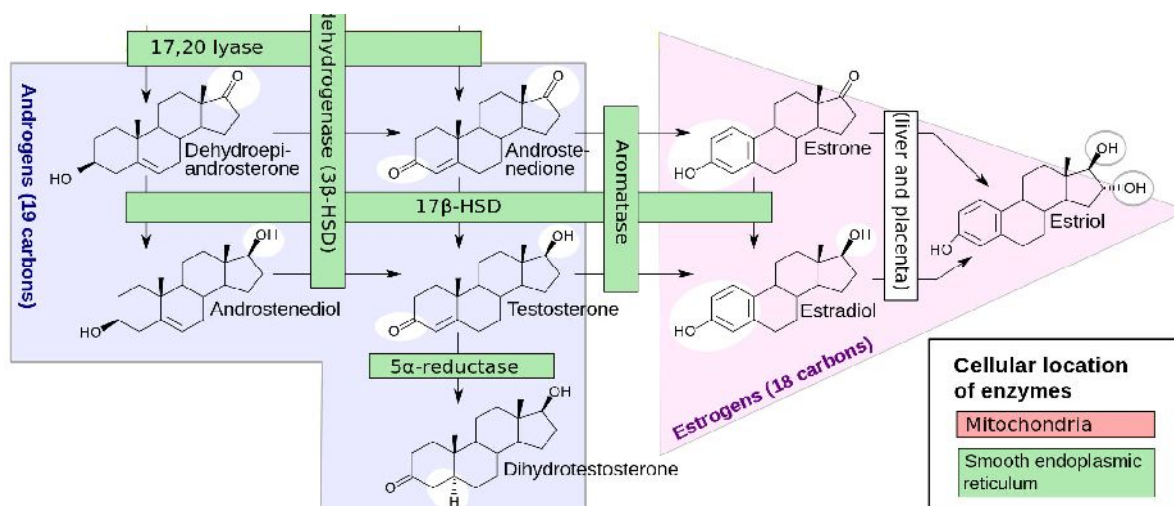
Ahogy a fejezet elején bemutattuk, a nemis működéseket szabályozó szteroid hormonok között elkülöníthetjük a férfi (androgén) hormonokat. Az androgén hatás az emberi szervezet számos működésében érvényesül:

- A férfi nemi szervek kifejlődése és növekedése
- A normális férfi szexuális működés fenntartása
- A másodlagos nemi jellegek kialakítása
- Szükségesek a hímivarsejtekéréséhez
- Megnövelik a vörös vércsejtek számát (androgén többlet)

Ugyanakkor ezen hormonoknak jellemzően van valamilyen mértékben anabolikus hatása is:

- Nitrogén visszatartás a szervezetben fehérjék formájában
- Izomtömeg növelése
- Fékeli a katabolizmust és a lebontó folyamatokat

Az emberi szervezetben az androgének bioszintézise jellegetesen a molekula két végén az oxidációs állapot felcserélésével jár. A 3-OH csoport oxidálódik, a 17-ketocsoport pedig redukálódik. Érdekes megjegyezni, hogy az ösztrogének, azaz női nemi hormonok a férfihormonokból képződnek. Androgén hormonok tehát a női szervezetben is képződnek köztitermékként, de továbbalakulnak ösztrogén származékokká. Míg a férfiakban a tesztoszteron képződése nagyrészt a herékben történik, a nőknél a májban és a petefészekben jelenik meg kis mennyiségű férfihormon. A változó korban a hormonális egyensúly eltolódásának egyik eleme, hogy a férfihormonok kisebb mértékben alakulnak át női hormonokká, és ettől a másodlagos nemi jellegek is férfias irányba tolódnak el.



15. ábra A szteroid nemi hormonok bioszintézise

A férfi hormonok hatásosságát összehasonlítva látható, hogy a legerősebb hatása nem a közismert tesztoszteronnak van, hanem a belsőleg képződő dihidro-tesztoszteronnak.

3. táblázat Férfihormonok androgén hatásának összehasonlítása

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

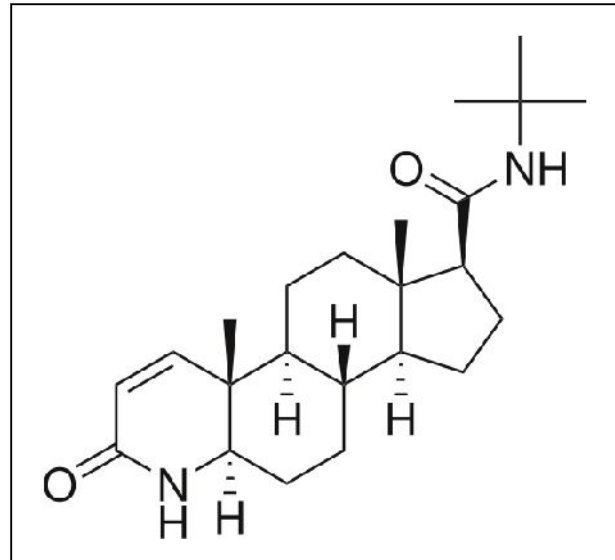
Az emberi szervezetben végbemenő bioszintetikus utak és az ipari gyártás reakciósora nem esik egybe. A humán út a koleszterinből indul, az ipari gyártásnál az AD a megfelelő ki-

indulási anyag. A korábban bemutatott gyártású androszténdion maga is a férfi nemi hormonok közé tartozik.

Orvosilag az androgén hatásra csak extrém esetekben van szükség. Viszont szükség lehet az androgén hatás ellensúlyozására. Ez többféle mechanizmussal valósítható meg, lehet:

- Szerkezetanalóg molekulákkal lefedni az androgén receptorokat (lehetnek szteroid és nem-szteroid vegyületek)
- Megakadályozni az androgének képzését.

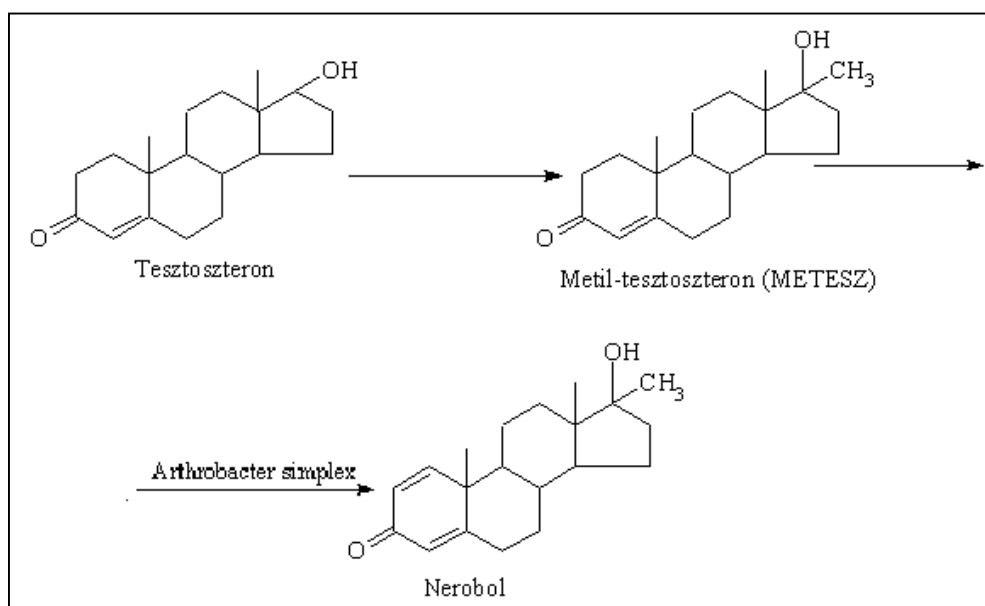
Ez utóbbira jellemző példa a finaszterid működése. Ez szerkezetanalógnaként, kompetitív inhibitorként akadályozza a tesztoszteron dihidrotesztoszteron átalakulását. Ezzel csökkenti a jóval nagyobb androgén aktivitású DHT termelését. Jóindulatú prosztata megnagyobbodás ellen alkalmazzák, a csökkentett androgén hatás lassítja a prosztata növekedését. Gyártástechnológiájában kémiai és biokonverziós lépések egyaránt szerepelnek. Elsőként a progeszteront kell előállítani, ebből kémiai reakciókkal alakítják ki a finaszteridet. De alternatív útként lehetséges az 1-2 közötti kötés kialakítása *Corynebacterium (Arthrobacter) simplex*-el is. Ez a lépés analóg a hidrokortizon – prednizolon átalakítással.



16. ábra A finaszterid szerkezete

6.2. Anabolikus doppingszerek

A másik orvosi, terápiás cél lehet a roborálás (=felerősítés), vagyis ekkor az anabolikus hatás a kívánatos. Ehhez olyan származékokat keresnek, amelynél az anabolikus hatás nagyobb, az androgén pedig kisebb. Ezeket a szereket viszont egyes sportolók és a testépítők doppingszerként is alkalmazzák (Sztanozolol, Nandrolon). Valamennyi anabolikum

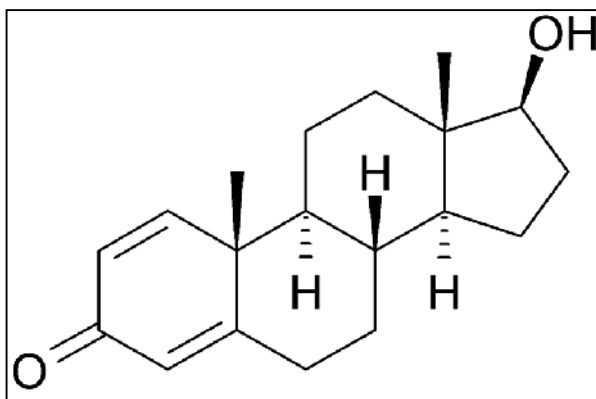


17. ábra A Nerobol gyártási lépései

tesztoszteron analóg, gyártásuk is a tesztoszteronból indul. A tesztoszteron az androszténdionból egy lépésben ketoredukcióval állítható elő. A konverziót szelektált *Saccharomyces cerevisiae* élesztő törzssel végzik.

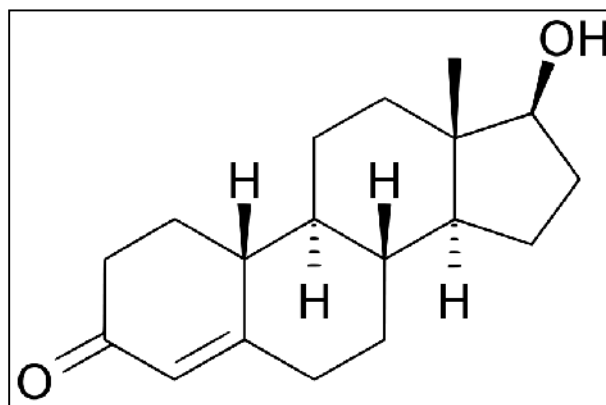
Magyarországon is gyártott anabolikus jellegű tesztoszteron származék a **Nerobol**, melyet roborálásra fejlesztettek ki, de doppingszerként is használják. Gyártása során a tesztoszteronból indulva előbb metilezik a 17. ponton, majd dehidrogénezéssel kialakítják az 1,2. kötetést. Ez a reakció analóg a hidrokortizon-prednizolon átalakítással, ugyanazzal a *Corynebacterium (Arthrobacter)* törzssel végzik. Az A gyűrű három konjugált kötés miatt síkba merevedik, ennek eredményeként az anabolikus hatás megmarad, az androgén hatás viszont csökken.

További anabolikus szteroid a **Boldenon**. Ez kimondottan lovak számára kifejlesztett anabolika, emberi használata nem engedélyezett, a mégis előfordul visszaélés. Tipikus androgén változásokat okoz, fokozza a nitrogén visszatartást, a fehérjeszintézist, növeli a vörös vérszámot. Doppingszerként való alkalmazását korlátozza, hogy nagyon hosszú ideig marad a szervezetben, még 18 hónap után is kimutatható. Gyártása két irányból is egyszerűen megoldható. ADD-ből egy lépésben 17-redukcióval, vagy tesztoszteronból 1,2-dehidrogénezéssel.



18. ábra Boldenon

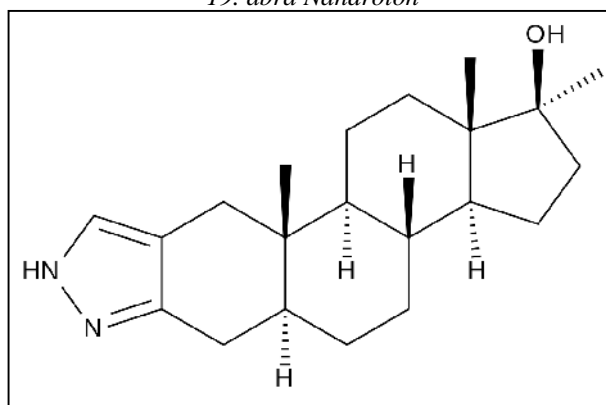
A **Nandrolont** (19-nor-tesztoszteron) is eredetileg roborálószerként fejlesztették ki. Csontritkulásra, vérszegénységre és általános roborálásra adják idősebb hölgyeknek, a változó kor után. Általános anabolikus hatásai mellett jellemzően mindkét nemben károsítja a szexuális működést. Tesztoszteronból állítható elő a 19-metilcsoport eltávolításával, erre utal a kémiai névben a nor- előtag, ami egy szénatom hiányára utal.



19. ábra Nandrolon

A sporthírekben a súlyemelőknél sokszor előfordulni a **Stanozolol** dopping kimutatása. Ennél a molekulánál a D gyűrű szubsztituálása a metil-tesztoszteronnal analóg, az A gyűrűn viszont nitrogén az elektronszívó heteroatom. A 17-metil csoport miatt a szert a máj nem bontja le, hosszú a félfélétideje. Alkalmazásánál a szokásos anabolikus hatások lépnek fel, embernél és állatoknál egyaránt.

Gyártása a dihidro-tesztoszteronból indul, szerkezetét több lépésben kémiai szintézissel alakítják ki.



20. ábra Stanozolol

Érdekesség: a doppingvizsgálatoknál minden ellenérzés bekerül a sportoló biológiai útlevelébe, és a változásokból is tudnak következtetéseket levonni. Az elemzésnél nem csak az egyes hormonok és analógok koncentrációját

mérik, hanem azok arányát is figyelik. Például a tesztoszteron szint mellett figyelik a dehidro-epi-androszteron (intermediér metabolit) és a tesztoszteron arányát is. Ebből lehet következtetni arra, hogy a vizsgált személy szervezetében lévő tesztoszteron természetes úton szintetizálódott-e a szervezetben, vagy kívülről adták be. Ennek határszáma hosszú időn keresztül hat volt. Egy bizonyos személynél éveken át ezek az értékek éppen a határ alá, 5,5-6,0 közé estek. A WADA két-három évvel ezelőtt megváltoztatta a szabályozását és a határértéket lecsökkentette négyre. Különös módon az adott személy mintáiban ettől kezdve az arány 3,5 és 4,0 közé esett. Következtetés: a versenyző nyilván kapott tesztoszteront, de olyan jó orvosi/laboratóriumi háttérrel rendelkezett, hogy a szint mindig a határérték alatt maradt.

6.3. Nemi szteroid hormonok

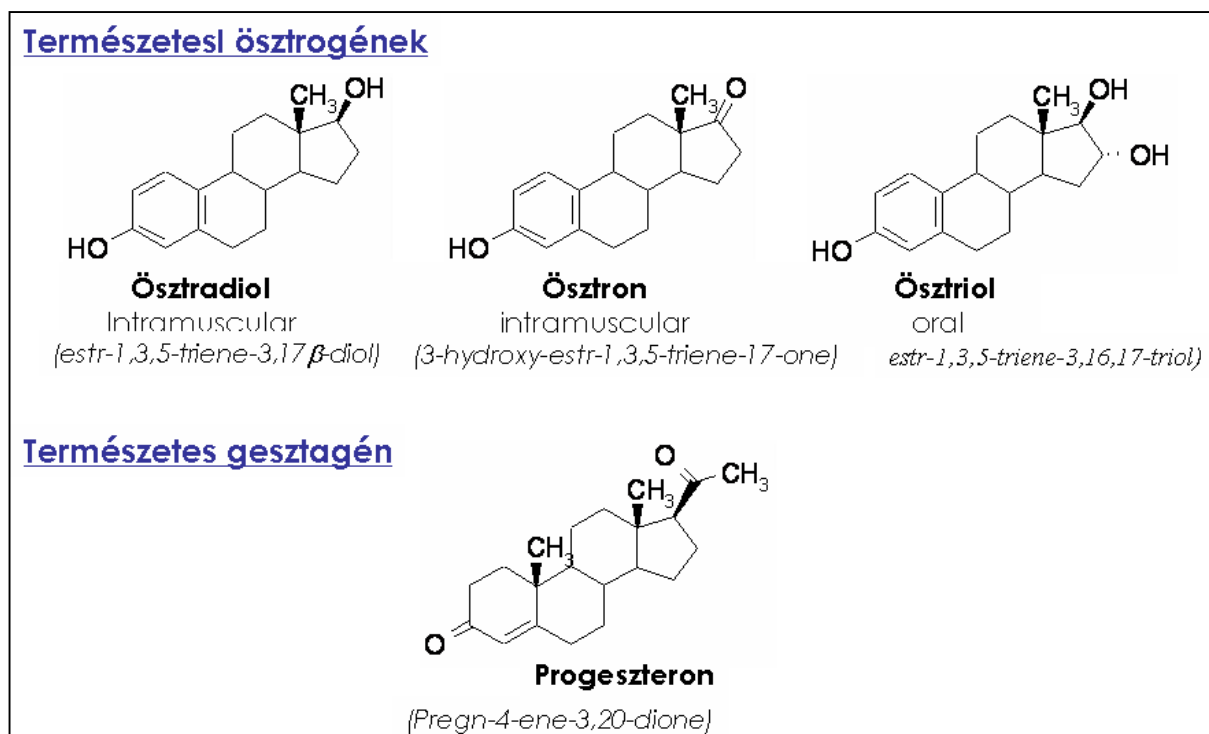
A nemi hormonok kódéseket szabályozó szteroid hormonok két, eltérő szerkezetű és hatású csoportba sorolhatók:

1. A természetes ösztrogének (C18 szteroidok) fiziológiai szerepe:

- A nemi szervek kifejlődése
- A másodlagos nemi jelleg kialakítása (női, férfi)
- A peteérésben és a fogamzásban
- A csontsűrűség szabályozásában (női, férfi)
- Anyagcserében

2. A természetes gesztrogének (C21 szteroidok) fiziológiai szerepe:

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

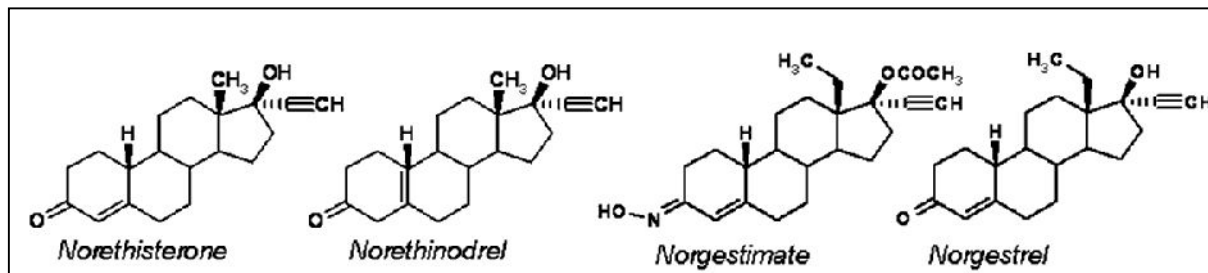


21. ábra Nemi szteroid hormonok

A progesteron a „terhességet megtartó” hormon. Ennek szintetikus szerkezet-analógiáit alkalmazzák hormonális fogamzásgátlásra. A hormonális fogamzásgátlás a gesztrogén hatáson alapul: a szintetikus progesterin analógok „elhitetik” a szervezetet, hogy a fogamzás megtörtént, így az újabb peteérésre nincs szükség.

Az egykomponens tabletták csak progesztagén hatóanyagot tartalmaznak.

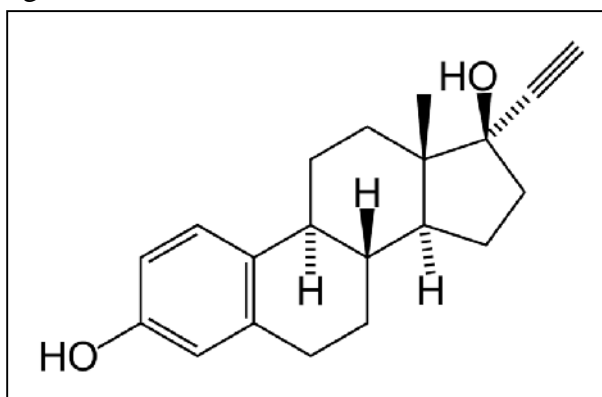
Ezek részben 19-nor-szteroidok (a 19-es metil csoport hiányzik), illetve más, szintetikusan előállított származékok.



22. ábra 19-nor-szteroidok

Szerkezetükben a természetes 17 OH-progeszteronra hasonlítanak, a 20 és 21 szénatomot az etinil csoport helyettesíti.

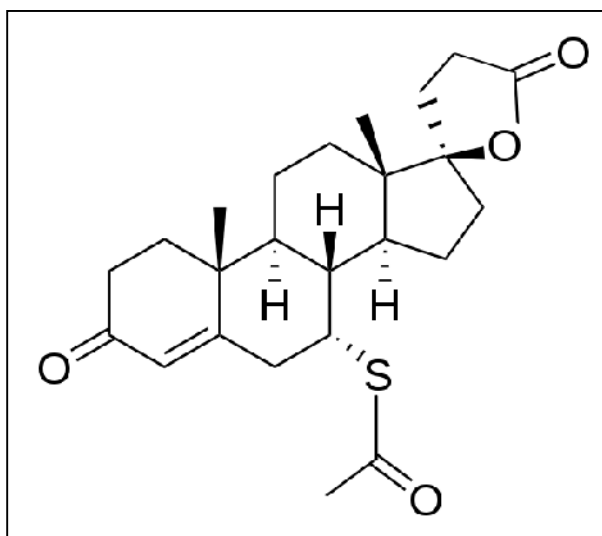
A kétkomponens tabletták a progesztagén hatóanyag mellett egy ösztrogén típusú molekulát is tartalmaznak. Ezek változó arányával (két, illetve három szakasz a szedési ciklusban) jobban modellezik a női hormonális ciklust. Ez lehet például az etinil-ösztradiol. A B-C-D gyűrűk a Norethinodrel-nel azonosak, de az A gyűrű viszont az ösztrogénekre jellemzően aromás, a 3 pozícióban fenolos OH csoport van rajta.



23. ábra Etinil-ösztradiol

7. Mineralokortikoid antagonisták

A szteroid hormonok külön csoportja hat a víz- és ionháztartásra. A veseműködés befolyásolására alkalmas szerkezetanalóg a Spirinolakton. Kompetitív inhibitorként lefedi az aldoszteron receptorokat a vesében. Ennek megfelelően vízhajtó hatása, de más vízhajtókkal ellentétben hatása nem jár káliumion-vesztéssel. Gyártásának kiindulási anyaga az etiszterol, több kémiai átalakítással (lánc hosszabbítás CO₂ kötéssel, hidrogénezés, gyűrűzárás, reakció tioecetsavval) alakul ki a végső szerkezet.

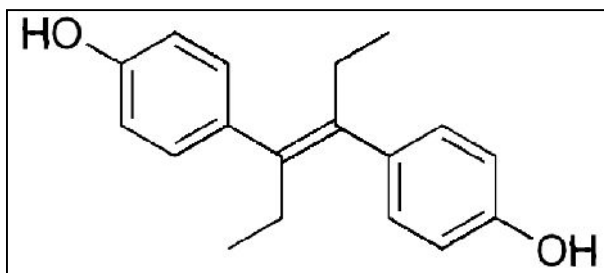


24. ábra Spironolakton

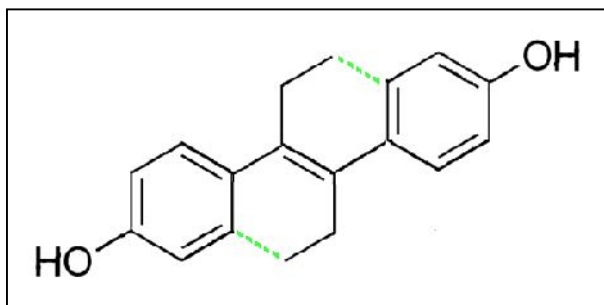
8. Szintetikus szteroid(analóg)ok

A biológiai, biokonverziós technológiák mellett folyamatosan dolgoztak azon, hogy kémiai szintézissel hozzanak létre hormonhatású szteroid analógokat. Ezen a területen általános tanulságokkal szolgál a sikeres fejlesztésnek induló, engedélyezett gyógyszer, a dietil-sztilbösztrol esete. 1940 és -70 között használták ösztrogén analógnaként, több célra, pl. terhes nőknek adták a vetélés kockázatának csökkentésére. Nem kívánt mellékhatásaira csak egy generációval később derült fény. A vizsgálatok kimutatták, hogy az így kezelt terhességekben 1 született gyermekeknél mindkét nemben rendellenességek jelentek meg. A leánygyermeknél egyes adenokarcinómák gyakorisága a negyvenszeresére nőtt a hasonló korcsoportéhoz képest. A fiúknál testileg és mentálisan is csökkent a férfias jelleg. Végül is nem vonták vissza, mint gyógyszer, csak 1971-ben megtiltották használatát terhes nők esetében. A hölgyeknek a változó kor után adható csonttritkulás és egyéb tünetek ellen.

A 25. ábrán bemutatott szerkezet alapján első ránézésre még a szakember számára sem világos, hogy ez a molekula mennyiben hasonlít a szteroidokra. A képletet tükrözve és segédvonalakkal ellátva viszont már egyértelműen látszik a hasonlóság.



25. ábra Dietil-sztilbösztrol

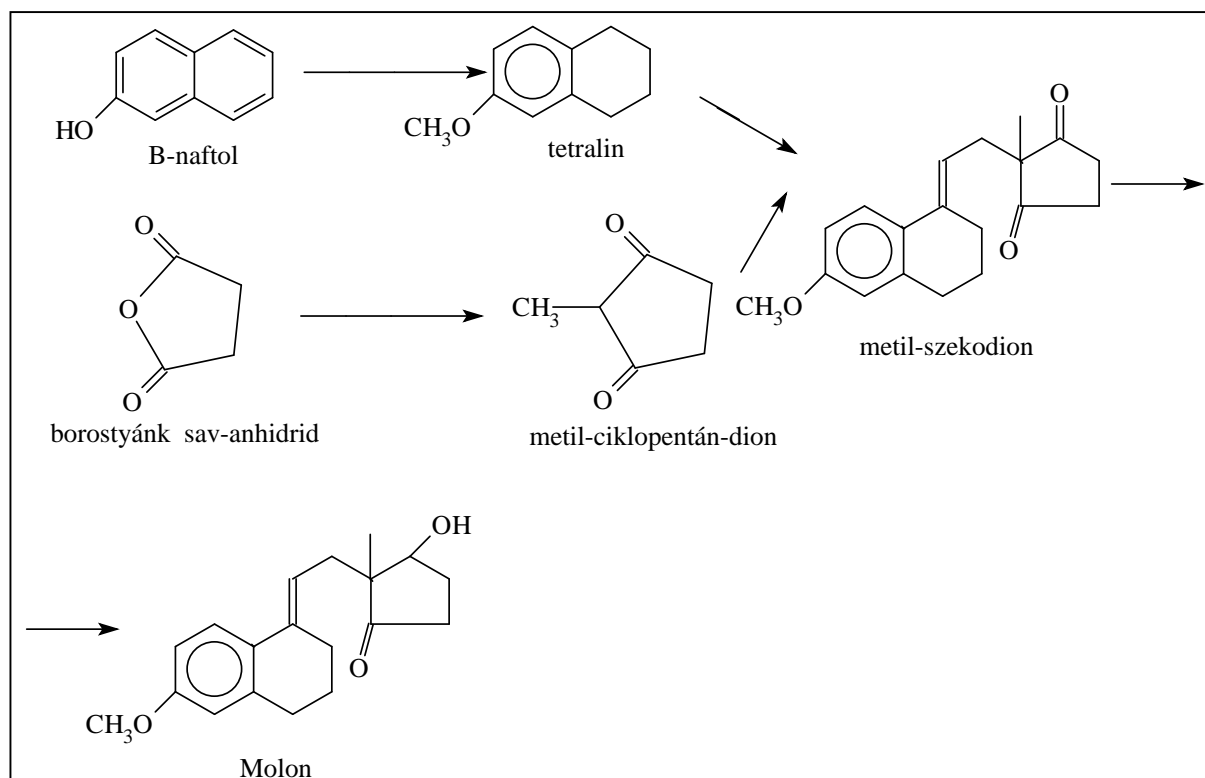


26. ábra A dietil-sztilbösztrol - átrajzolva

E fejezet bevezetésében azt mondtuk, hogy a szteránváz elállítása nagyon bonyolult, ezért végzik a gyártást biológiai eredetű szteroid alapanyagok konverziójával. Ugyanakkor a szteránvázat – pontosabban az ösztrogének aromás A-gyűrűs szerkezetét – fel lehet építeni kémiai szintézissel is.

Egy ilyen technológiával csak azért foglalkozunk, mert ebben a folyamatban is van egy biokonverziós lépés.

A szintézis naftol és borostyánkősav-anhidrid alapanyagból indul. A naftolon metiléznek az OH csoportot, majd részleges hidrogénezéssel tetralint képeznek. Oxidáció után egy vinilcsoportot visznek be. A borostyánkősav-anhidridből metil-ciklopentán-diont állítanak elő. A két molekula összekapcsolásával jön létre a metil-szekodion. A szeko- eltag a vegyületben egy nyitott gyűrűre utal, itt a C gyűrű nyitott, a 8-14 kötés hiányzik. Ezután következik a biokonverziós lépés, a két keto-csoport egyikét sztereoszektíven redukálják a *Saccharomyces* törzsek. A reakció analóg az androsztendion → tesztoszteron átalakítással, ugyanazokkal a szelektált élesztő törzsekkel végzik. A terméket rövid néven molonnak nevezik. Ezt követően újabb kémiai lépések következnek, a kapott OH csoportot acilezéssel megvédik és a ketocsoporton keresztül bezárják a C gyűrűt. További reakciókkal el lehet jutni az ösztradiol-metiléterhez. Gyártják az 13-etil származékot is, elállítása teljesen analóg módon történik, etil-ciklopentán-dionból.



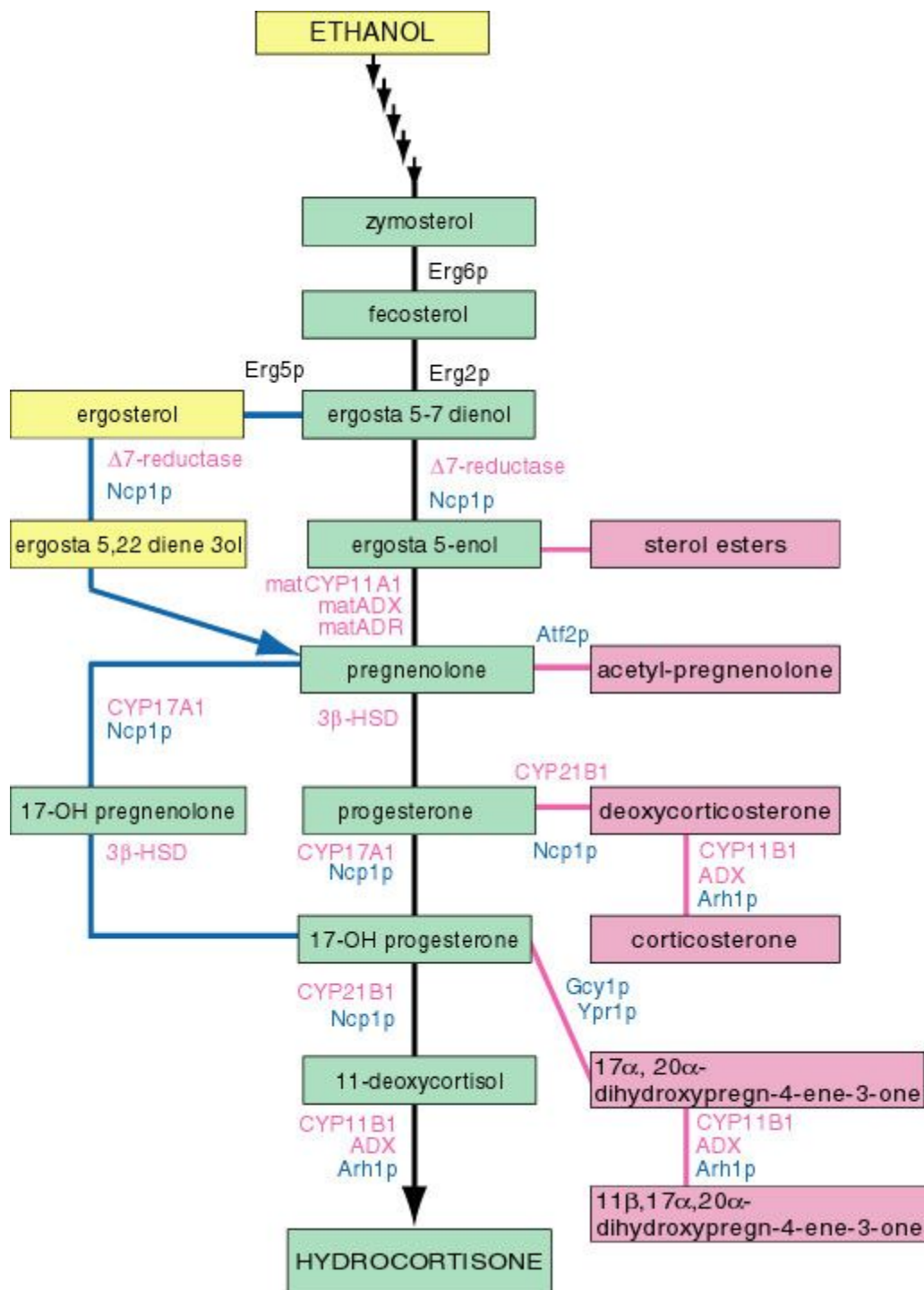
27. ábra A metil-szekodion előállítása

9. Törzsfeljesztés

A sztteroid konverziós törzseknél a klasszikus törzsfeljesztési módszereket alkalmazták. Az els dleges technika a vad törzsek szelektálása, screening-je. Ez munkaigényes, nehezen tervezhet folyamat, amiben analógiák és félempirikus módszerek segítik a kutatót. Ha már megvan egy megfelelő enzimaktivitású törzs, akkor azt a klasszikus genetikai módszerekkel fejlesztik tovább. Indukált mutációval el lehetett távolítani a nemkívánatos mellékaktivitásokat, illetve javítani a konverzió sebességét, hatásfokát.

A modern genetikai módszereknek is megvan az alkalmazási területe. A konverziós enzim termelését fokozni lehet például egy erősebb promóter beépítésével. Másik lehetőség, hogy az alapvetően indukált enzim termelését konstitutívá tesszük, termelését állandósítjuk.

Több, els sorban francia kutatócsoport közös célul t zte ki a de novo sztteroid termelést heterológ expresszióval. Célul a hidrokortizont (kortizol) választották. Összehangolt munkával több év alatt sikerült egy élesztő törzshez beépíteni a szükséges nyolc eml s gént. Emellett meg kellett oldani az élesztő saját génjének inaktiválását is, mivel ezek félrevitték volna az anyagáramot. Végül sikerrel jártak, a törzs laboratóriumi körülmények között közel 10 g/l kortizolt termelt. Az eredmény több igen rangos tudományos elismerést kapott, de az azóta eltelt nyolc évben ipari alkalmazásáról nem jelent meg információ.



28. ábra Hidrokortizon termelése élesztőben, heterológ expresszióval

Tartalomjegyzék

1. Szteroidok felépítése és csoportjai	1
2. El állítás, alapanyagok	2
2.1 A fitoszterinek képviselői, kinyerése és felhasználása	3
2.2 Források	4
2.2.1 Kinyerés dezodorálási párlatból.....	4
2.2.2 Kinyerés fagyantából	4
2.2.3 Az oldallánc lehasítása.....	5
3. A konverziók általános lefolyása	6
4. Szitoszterolból el állított vegyületek.....	8
4.1. Androszténdion (AD)	8
4.2. 9 α -hidroxi-androsztén-dion (9 α OH-AD).....	10
5. Gyulladásgátlók	11
6. Nemi hormonok	12
6.1. Androgén szteroid hormonok	12
6.2. Anabolikus doppingszerek.....	14
6.3. Női szteroid hormonok	16
7. Mineralokortikoid antagonisták	17
8. Szintetikus szteroid(analóg)ok.....	18
9. Törzsfeljesztés	19