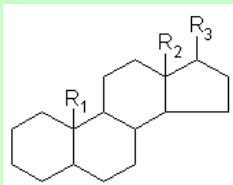
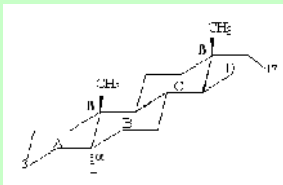


SZTEROIDKONVERZIÓK

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.

R₁ és R₂ = 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:

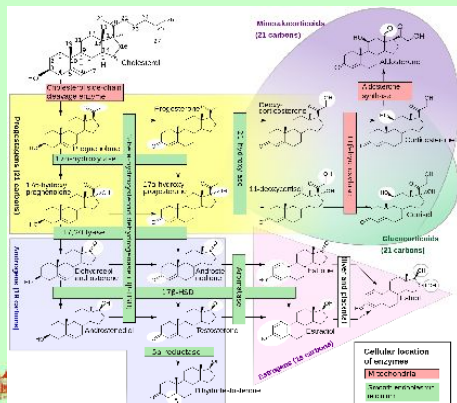
- víz- és sóháztartás szabályozásában (mineralokortikoidok)
- cukorháztartásban (glükoneogenezis) és a gyulladásos folyamatok szabályozásában (glükokortikoidok) kortizol = „stresszhormon”
- nemi m ködésekben (ösztrogének, gesztagének, tesztoszteron)



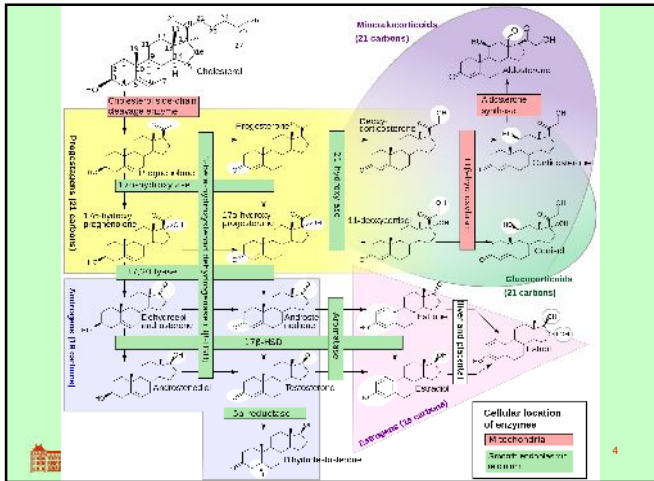
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

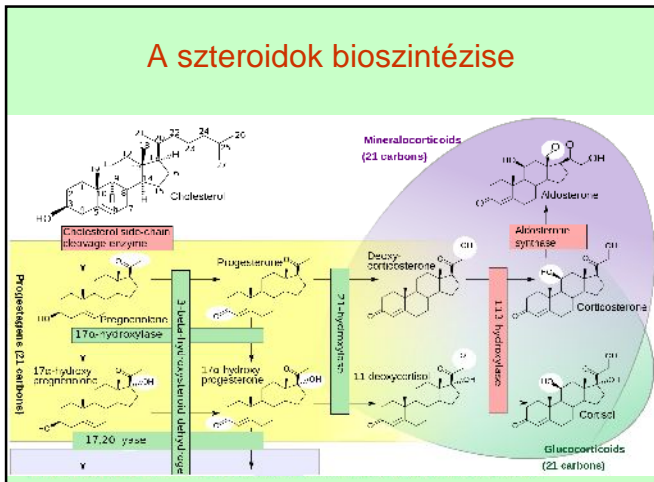
2

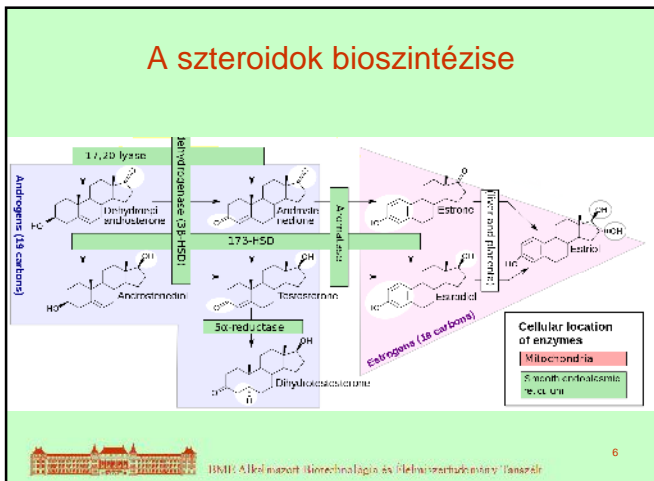
A szteroidok bioszintézise



3







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, 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)

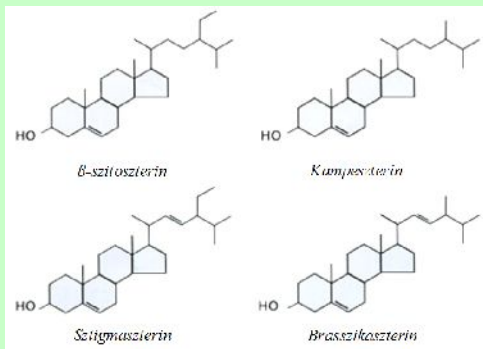
A szójaolaj eredeti nyersanyag háromféle növényi szteroidot tartalmaz: -szitoszterin, sztigmaszterin és kampszterin. F. komponens: >40% szitoszterin

Állati: koleszterin (epeváladék)

Szintetikus: -naftol



Növényi szteroid alapanyagok



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



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 számszámú alkoholoikat, zsírsavakat, tokoferoloikat tartalmaz.

Hasonló komponenseket tartalmaz a fagyanta szappan is. Ebből extrakcióval (n-pentanol, ciklohexanon) és/vagy (molekulár)desztillációval koncentrálik 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

11

Szteroidkonverziók

Az enzimes reakciók előnyei:

- Enyhe körülmények között végrehajthatók
- Sztereoselektív 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

12

Szteroidkonverziók

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

AD	9OH-AD	ADD
androsztén-dion	9 α OH-androsztén-dion	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 kettős kötés miatt a mikrobák nehezebben tudják lebontani, ha ez a funkcionális komponens, akkor ezt első lépésként kémiai oxidálják.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 14

Technológiai kérdések

A sokféle konverziós technológia közös elemei összefoglalhatók egy sémába:

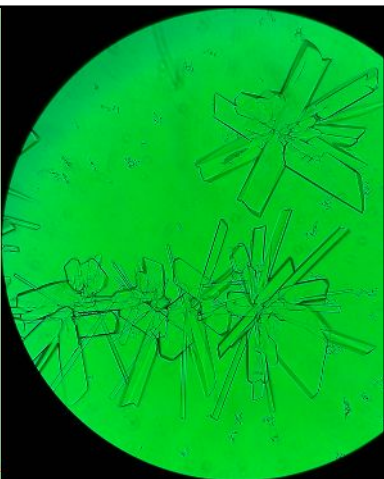
```

    → sejtszaporítás → enzimtermelés → konverzió →
    |                   |
    induktor-          szubsztrát-
    adagolás           adagolás
    
```

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 15

Technológiai kérdések

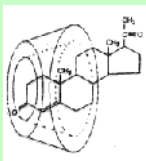
1. A szteroidok rosszul oldódnak vízben:
→ kristályfermentáció: a szubsztrát és a termék egyaránt kristályos formában van jelen, látszólag nem történik semmi.



Technológiai kérdések

A szubsztrát bevitelét különböző trükkökkel kell megoldani:

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



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



17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

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.



18

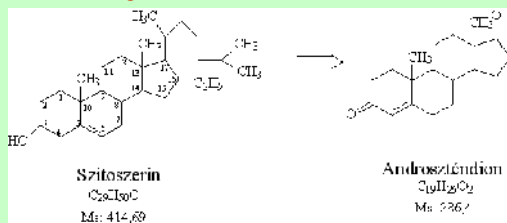
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Szitoszterinből el állított vegyületek

Androsztén-dion (AD): több hatóanyag intermediere.

Piaca > 1000 t/év

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

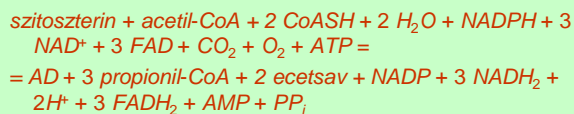


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

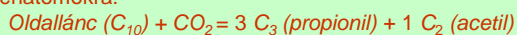
19

AD technológia

A 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 kihozatalt, emiatt a túlzott levegőztetés 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.

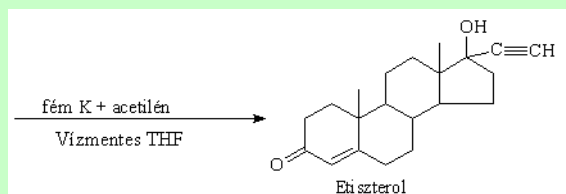


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

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 keletkezett etilszterol 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. drosiprienon, ami fogamzásgátlók hatóanyaga

spironolakton (aldoszteron antagonistá = vízhajtó)

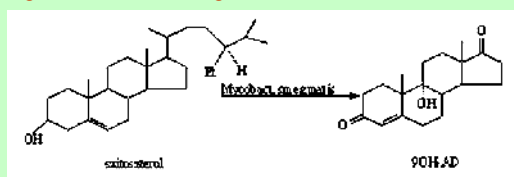


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

9 OH-androszténdion technológia

A 9-OH AD a prednizolon gyártás intermedijere. A *Mycobacterium smegmatis* enzimszere 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 l a szénforrásként alkalmazott glicerinnel és különböző tenzidekkel (Tween-80, Struktol, polipropilén-glikol) együtt vizes rendszerben intenzív keverés mellett 121 C°-on (sterilizés 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 sterilizik. A kétszeri hőkezelés során a tenzidék 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

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)

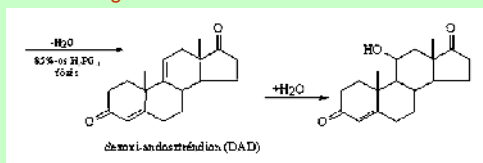


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

Kémiai reakciólépések

Dezoxi-androsztén-dion (DAD) gyártása: a vízelvonáshoz 85%-os H₃PO₄-ban végzik, melynek hatására a 9 és a 11 szénatom között képződő kettős 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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

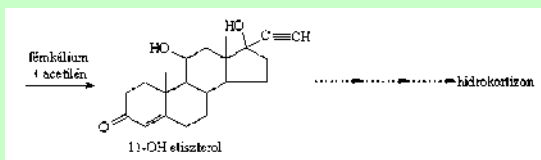
27

Kémiai reakciólépések

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

C2 egység bevitele: Mint az etiszterolnál

Az oldallánc többlépéses 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.
- Elyom egyes immunfolyamatokat.

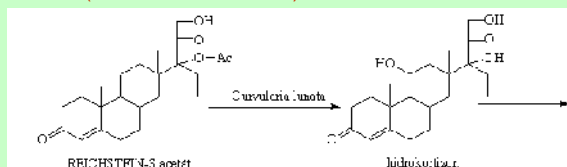


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

Gyulladásgátló szteroidok

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



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



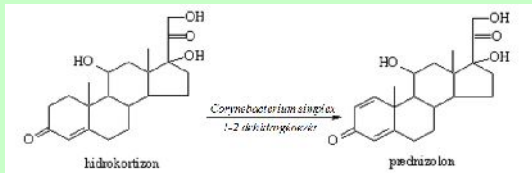
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Gyulladásgátló szteroidok 2.

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

Feldolgozás: extrakció etilacetáttal, bepárlás



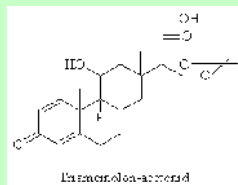
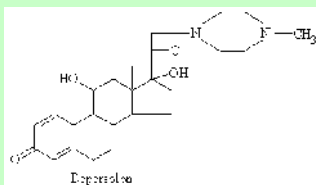
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Gyulladásgátló szteroidok 3.

A prednizolon vízoldhatósága növelhető, különböző szubsztitúensek hozzákapcsolásával:

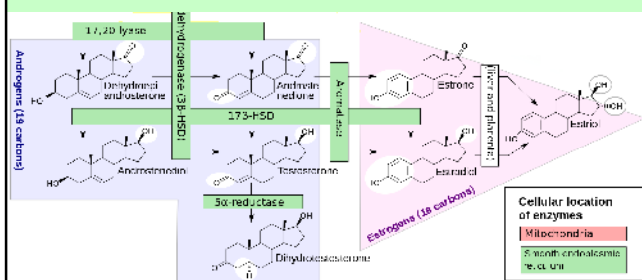
A prednizolonból állítják elő a FTOROCORT kenőcs hatóanyagát, a triamcinolon-acetonidot



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 vérséjt (+ 10-20%, androgén többlet)

Anabolikus hatás

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



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

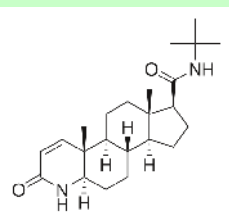
átalakulást.

Csökkenti a jóval nagyobb androgén aktivitású DHT termelését.

Jóindulatú prosztata megnagyob-
bodás ellen alkalmazzák.

Biokonverziós lépések:

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

Anabolikus szteroidok

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

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

Magyarországon gyártott szer a Nerobol →



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

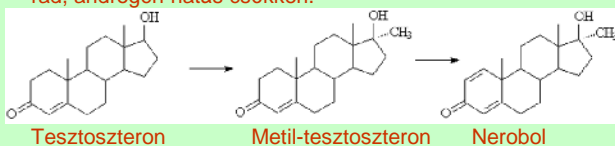
38

Anabolikus szteroidok

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

Metilezés → metil-tesztoszteron

1-2 dehidrogénezés, ugyanolyan, mint a hidrokortizon
prednizolon átalakításnál. 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

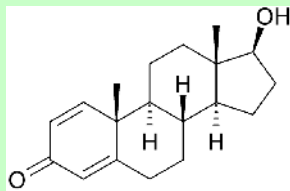
Anabolikus doppingszerek

Boldenon:

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

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

40

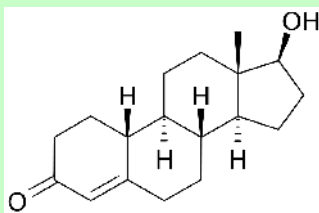
Anabolikus doppingszerek

Nandrolone (19-nortestosterone)

Csontritkulásra, vérszegénységre és roborálásra adják id sebb hölgyeknek.

Az általános anabolikus hatások.

A szexuális m ködést mindkét nemben károsítja.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

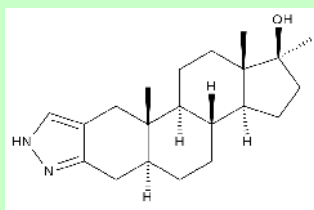
41

Anabolikus doppingszerek

Stanozolol

A 17-metil csoport miatt a máj nem bontja le. A szokásos anabolikus hatások, embernél és állatoknál.

Gyártás: kémiai szintézissel, több lépésben dihidrotesztoszteronból.

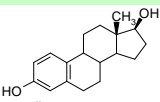


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

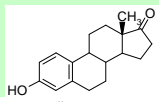
42

N i nemi szteroid hormonok

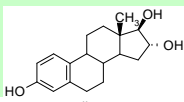
Természetes ösztrogének



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

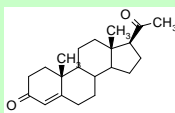


Ösztiron
(3-hydroxy-estr-1,3,5-triene-17-one)



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

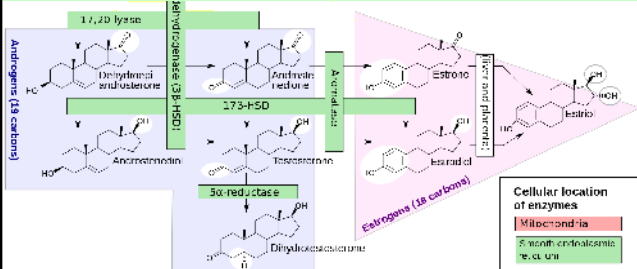
Természetes gesztagén



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

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 43

Az ösztrogének bioszintézise



The diagram shows the conversion of androgens (19 carbons) to estrogens (18 carbons). Key steps include: 1,2D-lyase (Androgens to Androstenedione), 17β-HSD (Androstenedione to Testosterone), 17β-HSD (Testosterone to Estrone), and 17β-HSD (Estrone to Estradiol). A legend indicates that 17β-HSD is located in the mitochondria, while 1,2D-lyase and 5α-reductase are in the cytosol.

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 44

N i nemi szteroid hormonok

A természetes ösztrogének fiziológiai szerepe

- A n i nemi szervek kifejlédése
- A másodlagos nemi jellegek kialakítása (n i + férfi)
- A peteérésben és a fogamzásban
- A csontsűrűség szabályozásában (n i + férfi)
- Anyagcserében

A természetes gesztagének fiziológiai szerepe

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


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék 45

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.

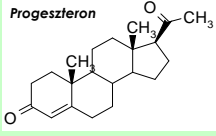
Ezek részben 19-nor-szteroidok (a 19-es metil csoport hiányzik), illetve más, szintetikusan el állított származékok.



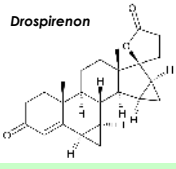
46

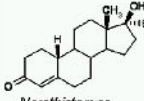
Progesztagén szteroidok

Progeszteron

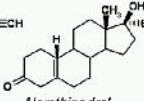


Drospirenon

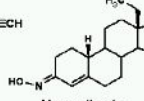




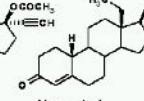
Norethisterone




Norethindrol



Norgestimate



Norgestrel



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:




48

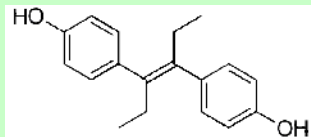
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

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

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

1971 óta nem adható terhesség esetén.



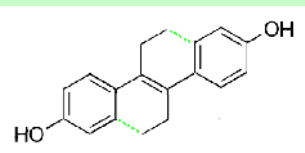
Szintetikus szteroidok

Dietil-szilbösztrol

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

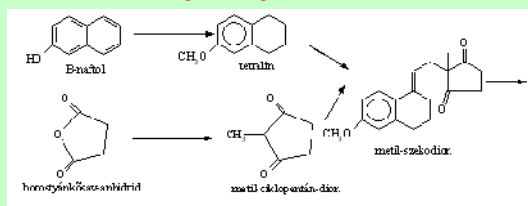
- Lányok: egyes adenokarcinómák gyakorisága 40x n tt.
- Fiúk: csökkent a férfias jelleg

1971 óta nem adható terhesség esetén.



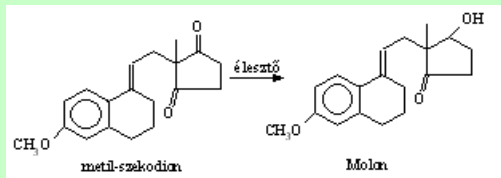
Szintetikus nor-szteroidok

Nor-szteroidok: a 19-es metil csoport hiányzik
 Szeko-szteroidok: a C gy r nyitott, a 8-14 kötés hiányzik
 Szintetikus gyártás: -naftol és borostyánk sav-anhidrid
 A termékek fontos fogamzásgátlók



Molon gyártása

A 17 ketocsoport redukciója éleszt vel 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: sz r és, a sz r lépény extrakciója etilacetáttal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

52

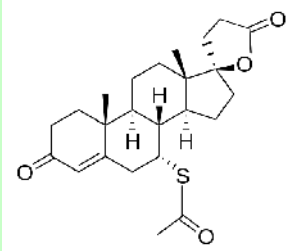
Mineralokortikoid antagonistá

Spironolaktón:

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

Gyártás: etiszterolból több kémiai lépéssel:

- lánchosszabbítás CO₂ kötéssel,
- hidrogénezés,
- gy r zárás,
- reakció tioecetsavval.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

54

Genetikai törzsfejlesztés

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

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

54

