

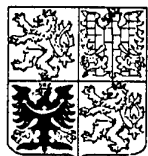
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 769

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1358-93**

(22) Přihlášeno: 07. 07. 93

(30) Právo přednosti:
08. 07. 92 CH 92/2150

(40) Zveřejněno: 19. 01. 94

(47) Uděleno: 21. 04. 95

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 14. 06. 95

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 17/14

C 12 P 17/12

C 12 P 17/10

C 12 P 7/40

C 12 P 7/22

(73) Majitel patentu:

LONZA A.G., Gampel/Wallis (Dir.:Basel), CH;

(72) Původce vynálezu:

Kiener Andreas dr., Vlsch, CH;

(54) Název vynálezu:

**Mikrobiologický způsob přípravy
5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny**

(57) Anotace:

Způsob mikrobiologické přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny a/nebo jejích solí pomocí mikroorganismů, zužitkujících 3-kyanopyridin. Reakce se provádí mikroorganismy druhu *Agrobacterium* sp., které rostou s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, při jednorázovém nebo kontinuálním přidáním substrátu 3-kyanopyridinu.

Způsob mikrobiologické přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny a/nebo jejích solí z 2-kyanopyrazinu pomocí mikroorganismů, zužitkujících 3-kyanopyridin.

V následujícím textu se pod významem 5-hydroxypyrazinkarboxylová kyselina rozumí také její soli, jako například její alkalické soli nebo amonné soli.

Dosavadní stav techniky

5-hydroxypyrazinkarboxylová kyselina se může použít například jako meziprodukt pro výrobu farmaceutických prostředků, například pro výrobu pyrazin-nukleosidových analogů s cytostatickým účinkem (M. Bobek, J.Heterocyclic Chem., 1991, 28, str. 1131).

Je známo, že se 5-hydroxypyrazinkarboxylová kyselina tvoří v metabolismu psů a lidí z pyrazinamidu přes pyrazinkarboxylovou kyselinu (J.Pharmacol.Exp.Ther., 1972,180(2), 411-434).

Mikrobiologický způsob přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny je znám z EP-A 0 519512. Při tomto způsobu se 5-hydroxypyrazinkarboxylová kyselina připraví z pyrazinkarboxylové kyseliny pomocí mikroorganismů, zužitkujících nikotinovou kyselinu.

Velký nedostatek tohoto způsobu spočívá v tom, že je edukt, pyrazinkarboxylová kyselina, chemicky těžko dostupný.

Podstata vynálezu

Úkolem předloženého vynálezu bylo poskytnout jednak jednoduchý a jednak ekologický způsob přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny.

Tento úkol byl vyřešen novým způsobem podle patentového nároku 1.

Podstata způsobu přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny spočívá podle vynálezu v tom, že se 2-kyanopyrazin jako substrát přemění pomocí mikroorganismů, které rostou s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, na 5-hydroxypyrazinkarboxylovou kyselinu. Tato kyselina se akumuluje v médiu.

V podstatě jsou pro způsob vhodné všechny mikroorganismy, které jsou schopné růst s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, a ten odbourat přes odpovídající derivát 6-hydroxypyridinkarboxylové kyseliny. Výraz "mikroorganismy, které rostou s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie" zahrnuje jak směsi mikroorganismů, tak také čisté izoláty těchto mikroorganismů, které mohou být použity za sterilních nebo nesterilních fermentačních podmínek.

Účelně se reakce provádí s mikroorganismy druhu Agrobacterium sp. DSM 6336 nebo jejich descendenty a mutanty. Tyto mikroorganismy byly uloženy u Německé sbírky mikroorganismů a buněčných kultur GmbH (DSM), Mascherodeweg 1b, D-3300 Braunschweig dne 07.02.1991 s označením DSM 6336.

Vědecký popis mikroorganismů Agrobacterium sp. (DSM 6336)

Vlastnosti kmene:

buněčná forma	tyčinky	ADH	-
šířka μm	0,6-0,8		
délka μm	1,5-3,0	ADC	-
pohyblivost	+	ONPG	-
Gram-reakce	-	VP	-
lyze s 3%ním KOH	+		
aminopeptidáza (Cerni)	+	indol	-
spóry	-	NO_2 z NO_3	+
oxidáza	+	denitrifikace	+
kataláza	+	fenylalaninindesamináza k.W.	
růst		lecitináza	-
anaerobní	-		
37/41 °C	+/-	ureáza	+
pH 5,6	-		
Mac-Conkey-agar	+	Simmonův citrát	-
SS-agar	-		
cetrimid-agar	-	malonát	-
2% NaCl	+		
		ketolaktóza	-
pigmenty	-		
nedifundující	-	hydrolýza	
difundující	-	škrobu	-
fluoreskující	-	želatiny	-
pyokyanin	-	kaseinu	-
		DNA	-
kyselina z (OF-test)		Tweenu 80	-
glukózy aerobně	-	eskulinu	+
glukózy anaerobně	-		
		alkalizace	
plyn z glukózy	-	lakmusového mléka	-
kyselina z (ASS)		potřeba růst.látky	-
glukózy	+		
fruktózy	+	využití substrátu	
xylózy	+	acetát	+
m-erythritolu	+	adipát	-
melecitózy	-	kaprát	-
arabinózy	+	citrát	-
sacharózy	-	glykolát	-
cellobiózy	+	laktát	+
trehalózy	-	levulinát	-
rhamnózy	+	malát	+

sulcitu	-	malonát	-
sorbitu	+	fenylacetát	-
glycerolu	+	suberát	-
L-arabunózy	+		
fruktózy	+		
glukózy	+		
mannózy	+		
maltózy	+		
xylózy	+		
sacharózy	+		
sorbózy	-		
mannitu	+		
2-ketoglukonátu	-		
N-acetylglukosaminu	+		
L-serinu	-		
hydroxybutyrátu	-		
L-lysinu	+		
L-ornitinu	+		

Obvykle se mikroorganismy před vlastní reakcí pěstují (kultivují) a jejich účinné enzymy se indukují.

Výhodně se kultivace (pěstování) a indukce provádí s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie.

Mikroorganismy se buď mohou před přidáním substrátu (2-kyanopyrazinu) "sklízet" obvyklým Tennovým způsobem a resuspendovat v čerstvém médiu, nebo se substrát (2-kyanopyrazin) může přímo přidat k mikroorganismům v původním růstovém médiu. pro vlastní způsob se pak buněčná suspenze účelně upraví na hodnotu optické hustoty při 650 nm od 1 do 100, výhodně od 10 do 40.

Jako média se mohou jak pro kultivaci, tak pro vlastní reakci použít média, obvyklá v oboru.

Substrát (2-kyanopyrazin) se může přidávat jednorázově nebo kontinuálně.

Účelně se uskuteční přidání substrátu tak, že koncentrace substrátu nepřesáhne 20 % hmotnostních, výhodně nepřesáhne 8 % hmotnostních. Obvykle se přeměna 2-kyanopyrazinu na 5-hydroxypyrazinkarboxylovou kyselinu provádí s buňkami v klidu.

Účelně se reakce provádí při hodnotě pH od 4 do 10, výhodně při hodnotě pH od 6 do 8.

Teplota je účelně mezi 10 a 60 °C, výhodně mezi 15 a 45 °C.

Po obvyklé reakční době od 4 do 100 hodin se může produkt vysrážet okyselením bezbuněčného roztoku a získat v oboru běžnými způsoby zpracování.

Příklad provedení vynálezu

Agrobacterium sp. DSM 6336 se pěstovalo v 300 ml Erlenmeyerově baňce v médiu, obsahujícím minerální soli (tabulka I) za přidání 0,1 % (hmotn./objem) 3-kyanopyridinu při teplotě 30 °C.

Po 36 h růstu se buňky odstředily a promyly se ve stejném médiu bez 3-kyanopyridinu. Pak se k 25 ml buněčné suspenze o optické hustotě 10 při 650 nm přidalo 297 mg (2,83 nmol) 2-kyanopyrazinu a po dobu 16 hod. se suspenze inkubovala na třepacím zařízení. Po této době inkubace se již nedal v UV-spektru prokázat žádný výchozí materiál. Pak byly buňky odstředěny a supernatant byl 5krát zahuštěn na rotačním odpařovacím zařízení a okyselen koncentrovanou HCl na hodnotu pH 2,0. Vysrážená 5-hydroxypyrazin-karboxylová kyselina byla zfiltrována a sušena. Dohromady se izolovalo 307 mg (2,21 nmol) produktu, což odpovídalo výtěžku 78 %. V ^1H -NMR-spektru (D_2O) se neprokázaly žádné nečistoty.

Tabulka I: A+N-médium

<u>Složení:</u>	<u>Koncentrace (mg/l)</u>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2000
Na_2HPO_4	2000
KH_2PO_4	1000
NaCl	3000
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	14,5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,8
pyridoxalhydrochlorid	$10 \cdot 10^{-3}$
riboflavin	$5 \cdot 10^{-3}$
amid nikotinové kyseliny	$5 \cdot 10^{-3}$
thiaminhydrochlorid	$2 \cdot 10^{-3}$
biotin	$2 \cdot 10^{-3}$
pantotenová kyselina	$5 \cdot 10^{-3}$
p-aminobenzoát	$5 \cdot 10^{-3}$
listová kyselina	$2 \cdot 10^{-3}$
vitamín B12	$5 \cdot 10^{-3}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$100 \cdot 10^{-3}$
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$90 \cdot 10^{-3}$
H_3BO_3	$300 \cdot 10^{-3}$
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$200 \cdot 10^{-3}$
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$10 \cdot 10^{-3}$
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$20 \cdot 10^{-3}$
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$30 \cdot 10^{-3}$
$\text{EDTANa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0
(pH roztoku se upraví na hodnotu 7,0)	

Průmyslová využitelnost

5-hydroxypyrazinkarboxylová kyselina se může použít například jako meziprodukt pro výrobu farmaceutických prostředků, například pro výrobu pyrazin-nukleosidových analogů s cytostatickým účinkem.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob mikrobiologické přípravy 5-hydroxypyrazinkarboxylové kyseliny a/nebo jejích solí, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se 2-kyanopyrazin jako substrát přemění v mikroorganismy, které rostou s 3-kyanopyridinem jako jediným zdrojem uhlíku, dusíku a energie, na 5-hydroxypyrazinkarboxylovou kyselinu a/nebo její soli, přičemž se vzniklá sloučenina akumuluje v médiu.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí s mikroorganismy druhu Agrobacterium sp. DSM 6336 a/nebo s jejich spontánními mutanty.
3. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 a 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se účinné enzymy mikroorganismů indukují 3-kyanopyridinem.
4. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí za jednorázového nebo kontinuálního přidání substrátu tak, aby koncentrace substrátu nepřesáhla 20 % hmotnostních.
5. Způsob podle alespoň jednoho z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se reakce provádí při pH od 4 do 10 a při teplotě od 10 do 60 °C.

Konec dokumentu
