



(19) Országkód

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

217 218 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 94 01767

(22) A bejelentés napja: 1994. 06. 13.

(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.

(30) Elsőbbségi adatok:

08/077,979 1993. 06. 15. US

08/077,980 1993. 06. 15. US

(51) Int. Cl.⁶

C 12 P 17/02

C 12 N 9/18

C 07 D 305/14

C 12 N 1/20

C 12 Q 1/04

(40) A közzététel napja: 1995. 11. 28.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1999. 12. 28.

(72) Feltalálók:

Hanson, Ronald L., Morris Plains, New Jersey
(US)

Patel, Ramesh N., Bridgewater, New Jersey (US)

Szarka, Laszlo J., East Brunswick, New Jersey
(US)

(73) Szabadalmaz:

Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, New Jersey
(US)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54) **Enzimatisz hidrolizálási eljárások C-10 és C-13 hidroxihelyettesített taxánok és enzimatisz észterezési eljárás C-10 acil-oxihelyettesített taxánok előállítására, valamint alkalmazásuk C-13 acil-oxihelyettesített taxánok előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás (I) általános képletű C-10 helyzetben hidroxiszubsztituált és (V) általános képletű, C-13 helyzetben hidroxiszubsztituált taxánok – ahol

R¹ hidroxihelyettesítő vagy acil-oxihelyettesítő csoport;

R² hidrogénatom, hidroxycsoport, fluoratom, xilozilcsoport, R⁵-O-, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport;

R³, R⁴ és R⁶ egymástól függetlenül hidrogénatom, szénhidrogénatom;

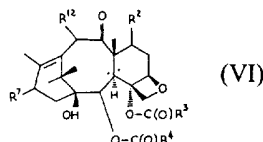
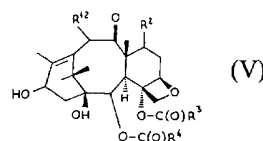
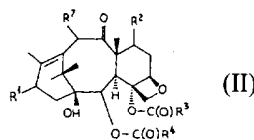
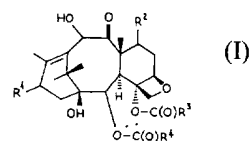
R⁵ hidroxihelyettesítő csoport;

R¹² hidrogénatom, hidroxycsoport, R⁵-O-, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport –

vagy sóik előállítására (II) általános képletű C-10-acil-oxitaxánok vagy (VI) általános képletű C-13-acil-oxitaxánok – ahol

R⁷ acil-oxihelyettesítő csoport –

enzimatisz hidrolizálásával, továbbá ezek alkalmazása C-13-acil-oxitaxánok előállítására, valamint a fenti átalakításokat katalizáló enzimek és ezeket termelő mikroorganizmusok és eljárás kiválasztásukra.



A találmány tárgya enzimatisz hidrolizálási eljárás C-10 hidroxiszubsztituált taxánok és enzimatisz észterezési eljárás C-10 acil-oxiszubsztituált taxánok előállítására, amely vegyületek felhasználhatók például intermediereként gyógyászatilag hatásos taxánok, így a taxol és taxolanalógok előállításánál.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy enzimatisz hidrolizálási eljárás C-13 hidroxiszubsztituált taxánok előállítására, amely vegyületek felhasználhatók intermediereként a C-13 acil-oxiszubsztituált taxánok előállításánál, és különösen jól felhasználhatók a taxol és taxolanalógok előállításánál.

A taxánok a gyógyászat területén felhasználást nyelő diterpénvegyületek. Így például a taxolt, az (A) képletű taxánt, amelynek képletében

Ph jelentése fenilcsoport;

Ac jelentése acetilcsoport; és

Bz jelentése benzoilcsoport

hatásos rákellenes szernek találták.

A természetben előforduló taxánok, így a taxol, megtalálhatók növényi anyagokban, és ezekből izoláltak is azokat. Ezek a taxánok azonban viszonylag kis mennyiségben vannak jelen a növényi anyagokban, úgyhogy például a taxol esetében e vegyület forrásaként nagyszámú, lassan növe tiszafa szükséges. A tudomány ezért folytatta a kutatásokat a természetben előforduló taxánok, így a taxol, valamint analógjai előállítására szolgáló szintetikus, köztük felszintetikus utak megtalálása érdekében.

A taxán gyűrűszerkezet bonyolultsága miatt a gyűrűrendszeren a kívánt szubsztituenseket tartalmazó taxán könnyebben előállítható olyan kiindulási anyag felhasználásával, amely már tartalmazza az alapot képező taxán gyűrűszerkezetet. Így például egy olyan vegyület, amely tartalmazza a taxán gyűrűszerkezetet, és hidroxicsoportot tartalmaz a C-13 helyzetben, különösen, ha a kívánt szubsztituenszt tartalmazza a C-10 helyzetben is, kapcsolható egy intermedier vegyülettel, így olyan taxánszármazékot képezve, amely a C-13 helyzetben a kívánt oldalláncot tartalmazza, miként egy olyan gyógyászatilag hatásos taxán, amely a C-13 helyzetben valamilyen acil-oxi-oldalláncot tartalmaz, amelyre példa a taxol vagy annak analógjai.

A találmány eljárásokat biztosít olyan taxánok előállítására, amelyek a C-10 helyzetben kívánt szubsztituenseket tartalmaznak. A találmány eljárásokat szolgáltat különösen a C-10 helyzetben hidroxicsoportot és a C-10 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó taxánvegyületek előállítására, amely vegyületek kiindulási anyagként felhasználást nyernek az olyan taxánok előállításában, mint a taxol vagy annak analógjai.

A találmány egyik megvalósítása eljárást szolgáltat legalább egy olyan taxán előállítására, amely a C-10-hez közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmaz, amely eljárás a C-10-hez közvetlenül kapcsolódó valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó taxánnak valamilyen olyan enzimmal vagy mikroorganizmussal való érintkezésbe hozásából, és így a hidrolízis végrehajtásából áll, amely képes az említett acil-oxi-csoportnak hidroxicsoporttá való hidrolízisét katalizálni.

A találmány egy másik megvalósítása eljárást nyújt a C-10-hez közvetlenül kapcsolódó valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy taxánnak az előállítására, amely eljárás a C-10-hez közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmazó legalább egy taxánnak valamilyen acilező ágenssel és egy olyan enzimmal vagy mikroorganizmussal való érintkezésbe hozásából és így az észterezés végrehajtásából áll, amely képes az említett hidroxicsoportnak acil-oxi-csoporttá való észterezését katalizálni.

A találmány eljárást bocsát rendelkezésre továbbá a C-13 hidroxiszubsztituált taxánvegyületek előállítására, amely vegyületek kiindulási anyagként felhasználást nyernek a C-13 helyzetben kívánt oldalláncot tartalmazó taxánok előállításában.

A találmány különösképpen eljárást szolgáltat a C-13-hoz közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmazó legalább egy taxán előállítására, amely eljárás abból áll, hogy a C-13-hoz közvetlenül kapcsolódó valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy taxánt érintkezésbe hozunk egy olyan enzimmal vagy mikroorganizmussal, amely képes az említett acil-oxi-csoportnak hidroxicsoporttá való hidrolízisét katalizálni, és így az említett hidrolízist végrehajtjuk.

A találmány hatásos módszereket nyújt C-10 hidroxiszubsztituált taxánok C-10 acil-oxiszubsztituált taxánokból való előállítására, és C-10 acil-oxiszubsztituált taxánoknak C-10 hidroxiszubsztituált taxánokból való előállítására. A találmány szerint hidrolizálhatunk egyetlen taxánt, vagy egymás után, vagy egyidejűleg hidrolizálhatjuk különböző taxánok elegyét; úgyszintén a találmány szerint észterezhetünk egyetlen taxánt, vagy egymás után vagy egyidejűleg észterezhetjük különböző taxánok elegyét.

A találmány hatásos eljárással szolgál továbbá C-13 hidroxiszubsztituált taxánok C-13 acil-oxiszubsztituált taxánokból való előállítására. A találmány szerint hidrolizálhatunk egyetlen taxánt, vagy egymás után vagy egyidejűleg hidrolizálhatjuk különböző taxánok elegyét.

A találmányt részletesebben a következőkben írjuk le. Hidrolízis a C-10-nél:

A találmány egy előnyös megvalósítása eljárást szolgáltat legalább egy, a C-10 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó (I) általános képletű taxán – a képletben

R¹ jelentése hidroxisz vagy acil-oxi-csoport, különösen ha R¹ az alábbiakban leírt (III) általános képletű csoport szerkezetének felel meg;

R² jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, fluoratom, R⁵-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport;

R³ és R⁴ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport;

R⁵ jelentése hidroxisz-védőcsoport; és

R⁶ jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport –

vagy sóinak előállítására, amely eljárás abból áll, hogy legalább egy, a C-10 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó (II) általános képletű taxánt – a képletben

R¹, R², R³ és R⁴ jelentése azonos a fentiekben megadottakkal; és

R⁷ jelentése acil-oxi-csoport –

vagy sóit érintkezésbe hozzuk egy olyan enzimmal vagy mikroorganizmussal, amely képes az említett R⁷ acil-oxi-csoportnak hidroxicsoporthá váló hidrolízisét katalizálni, és így az említett hidrolízist végrehajtjuk.

Az (I) és (II) általános képletű vegyületek közelebből meg nem jelölt királis centrumainak valamennyi sztereokonfigurációját számításba vesszük a találmány szerinti hidrolízist alkalmazó eljárásnál, akár önmagában van jelen (vagyis lényegileg mentesen más sztereoizomerektől), akár más sztereoizomer formákkal együtt van jelen az elegyenben.

Egy másik előnyös megvalósításnál a találmány eljárást nyújt legalább egy olyan első taxánnak az előállítására – amely a C-10 helyzetben a kívánt acil-oxi-csoportot tartalmazza – legalább egy olyan második taxánból – amely a C-10 helyzetben nem kívánt acil-oxi-csoportot tartalmaz – ez utóbbi enzimatis hidrolízisével, hogy így az itt leírt eljárással legalább egy, a C-10-en hidroxicsoporthat tartalmazó analógot kapjunk, majd ezt kapcsoljuk a kívánt acilcsoporttal, és így kapjuk az előbbi. Ennél a megvalósításnál a találmány például eljárást bocsát rendelkezésre a C-10-en adott acil-oxi-csoportot tartalmazó kívánt taxán előállítására oly módon, hogy a C-10-en különböző acil-oxi-csoportokat tartalmazó taxánok kiindulási elegyből, amely kiindulási elegy tartalmazhatja vagy nem a kívánt taxánt, a különböző C-10 csoportokat egyidejűleg vagy egymás után hidrolizáljuk, így egy vagy több olyan taxánt kapunk, amely a C-10-en hidroxicsoporthat tartalmaz, majd erre rákapcsoljuk a kívánt acilcsoportot. Ez az előnyös eljárás különösen hasznos olyan esetekben, amikor különböző C-10 acil-oxi-csoportokat tartalmazó taxánok elegyét kapjuk, például növényi anyagok extrakciójával, amikor is a taxolt más, a természetben képződött taxánokkal együtt kapjuk egy elegyenben, és amikor egy bizonyos taxán, így a taxol előállítása a végcél. Az acilcsoport kapcsolását az acil-oxi-csoportok képzése céljából végrehajthatjuk nem enzimatis módszerekkel is. Például a C-7 helyzetben védett 10-dezacetil-baccatin III-at (amelyet a C-7-en például trietil-szilil-csoporttal védünk, amelyet úgy viszünk rá a vegyületre, hogy 10-dezacetil-baccatin III-at N,N-dimetilformamidos oldatban érintkezésbe hozunk trietil-szilil-kloriddal és imidazollal) a C-10-en úgy acilezhetjük, hogy alacsony, így – 60 °C és 70 °C közötti hőmérsékleten lítium-klorid/acetil-kloridot tartalmazó tetrahydrofurános közegben lítium-hexametil-diszilil-aziddal hozzuk érintkezésbe. Más módszer szerint az acilcsoport kapcsolását végrehajthatjuk az itt leírt enzimatis észterezési eljárással is.

A találmány szerinti eljárásnál a kiindulási taxán C-10 acil-oxi-csoportjának sztereokonfigurációját előnyösen megtartjuk a C-10-en hidroxicsoporthat tartalmazó termékben.

Észterezés a C-10 helyzetben:

A találmány egy másik előnyös megvalósításánál eljárást biztosítunk legalább egy, a C-10 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó (II) általános képletű taxán – a képletben

R¹ jelentése hidroxil- vagy acil-oxi-csoport, különösen ha R¹ az alábbiakban leírt (III) általános képletű csoport szerkezetének felel meg;

10 R² jelentése hidrogénatom, hidroxicsoporthat, fluoratom, R⁵-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport;

15 R³ és R⁴ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport;

R⁵ jelentése hidroxil-védőcsoport;

20 R⁶ jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport; és

R⁷ jelentése acil-oxi-csoport – vagy sóinak előállítására, amely eljárás abból áll, hogy legalább egy, a C-10 helyzetben hidroxicsoporthat tartalmazó (I) általános képletű taxánt –

25 a képletben

R¹, R², R³ és R⁴ jelentése azonos a fentiekben megadottakkal –

30 vagy sóit érintkezésbe hozzuk valamilyen acilezőszerrel és egy olyan enzimmal vagy mikroorganizmussal, amely képes a C-10 hidroxicsoporthat észterezését katalizálni, hogy így az R⁷ acil-oxi-csoport képződjék, és így az említett észterezést végrehajthatjuk.

35 Az (I) és (II) általános képletű vegyületek közelebből meg nem jelölt királis centrumainak valamennyi sztereokonfigurációját számításba vesszük a találmány szerinti észterezési eljárásnál, akár önmagában van jelen (vagyis lényegileg mentesen más sztereoizomerektől), akár más sztereoizomer formákkal együtt van jelen az elegyenben.

40 Bármely olyan acilezőszer használható, amely véghez viszi a találmány szerinti észterezést. Előnyösek azok a (IV) általános képletű acilezőszerek, amelyekben

45 R¹¹ jelentése alkil-, alkenil-, alkinil-, aril-, cikloalkil-, cikloalkenil- vagy heterociklusos csoport; és

L jelentése kilépőcsoport, amelyet helyettesítve képezhetjük az észtercsoportot.

50 A (IV) általános képletű vegyületek előnyös R¹¹ csoportjai alkilcsoportok, így 1–6 szénatomos alkilcsoportok, különösen metilcsoport. A példászerű L csoportok közé tartoznak a halogénatomok, hidroxil-, alkoxil- vagy alkenil-oxi-csoportok. Előnyös L csoportok az alkenil-oxi-csoportok, a legelőnyösebbek az 1–6 szénatomos alkenil-oxi-csoportok, így a vinil-oxil- és izopropenil-oxil-csoport. Az izopropenil-acetát és vinil-acetát különösen előnyös acilezőszerek.

60 A találmány szerinti eljárásnál a kiindulási taxán C-10 helyzetű hidroxicsoporthatjának sztereokonfigurációját előnyösen megtartjuk a C-10-en acil-oxi-csoportot tartalmazó termékben.

Hidrolízis a C-13 helyzetben:

Egy előnyös megvalósításnál a találmány eljárást szolgáltat legalább egy, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó (V) általános képletű taxán – a képletben

R¹² jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, R⁵-O-, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport;

R² jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, fluoratom, R⁵-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, R⁶-C(O)-O- vagy R⁶-O-C(O)-O- általános képletű csoport;

R³ és R⁴ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport;

R⁵ jelentése hidroxil- védőcsoport; és

R⁶ jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport –

vagy sóinak előállítására, amely eljárás abból áll, hogy legalább egy, a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó (VI) általános képletű taxánt – a képletben

R¹², R², R³ és R⁴ jelentése azonos a fentiekben megadottakkal; és

R⁷ jelentése acil-oxi-csoport –

vagy sóit érintkezésbe hozzuk egy olyan enzimmel vagy mikroorganizmussal, amely képes az említett R⁷ acil-oxi-csoportnak hidroxicsoporttá való hidrolízisét katalizálni, és így az említett hidrolízist végrehajtjuk.

Az (V) és (VI) általános képletű vegyületek közelebbről meg nem jelölt királis centrumainak valamennyi sztereokonfigurációját számításba vesszük a találmány szerinti eljárásnál, akár önmagában (vagyis más sztereoizomerektől lényegileg mentesen), akár más sztereoizomer formákkal együtt egy keverékben van jelen.

Egy másik előnyös megvalósításnál a találmány eljárást szolgáltat legalább egy, a C-13 helyzetben kívánt acil-oxi-oldalláncot tartalmazó első taxán előállítására legalább egy olyan második taxánból, amely nem kívánt C-13 acil-oxi-oldalláncot tartalmaz, az utóbbinak enzimatis hidrolízisével, hogy így az itt leírt eljárással legalább egy, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó analógot kapjunk, majd a kívánt oldalláncot erre rákapcsolva megkapjuk az előbbi. Ennél a megvalósításnál a találmány eljárást szolgáltat például egy kívánt olyan taxán előállítására, amely a C-13 helyzetben egy bizonyos acil-oxi-oldalláncot tartalmaz, taxánok különböző C-13 acil-oxi-oldalláncokat tartalmazó kiindulási elegyből, amely kiindulási elegy tartalmazhatja vagy nem tartalmazza a kívánt taxánt, a különböző C-13 helyzetű csoportok egyidejű vagy egymás utáni hidrolízisével, hogy így a C-13-on hidroxicsoportot tartalmazó egy vagy több taxánt kapjunk, majd ezt/ezeket kapcsoljuk a kívánt oldalláncsal. Ez az előnyös eljárás különösen hasznos olyan esetekben, amikor különböző C-13 acil-oxi-oldalláncokat tartalmazó taxánok elegyét kapjuk, miként például taxolt cefalomaninál és más, természetes úton képződött taxánnal

közös elegyben eredményező növényi anyagok extrakciójával kapunk, és amikor egy bizonyos taxán, így a taxol előállítása a végcél.

A találmány szerinti eljárásnál a kiindulási taxán C-13 helyzetű acil-oxi-csoportjának sztereokonfigurációját előnyösen megtartjuk a C-13-on hidroxicsoportot tartalmazó termékben.

A leírásban használt kifejezések magyarázata:

Az itt használt értelemben az „enzimatis folyamat” vagy „enzimatis eljárás” a találmány szerinti olyan eljárást vagy módszert jelent, amelynél valamilyen enzimet vagy mikroorganizmust használunk fel. A „hidrolízis” kifejezés az itt használt értelemben hidroxicsoportnak valamilyen acil-oxi-csoportból való képzését jelenti, amit például a találmány szerinti eljárásnál úgy hajthatunk végre, hogy vízzel és/vagy valamilyen megfelelő alkohollal hozzuk érintkezésbe a vegyületet. Az „észterezés” kifejezés az itt használt értelemben valamilyen acil-oxi-csoportnak hidroxicsoportból való képzését jelenti. Az „acilezőszer” kifejezés az itteni szóhasználat szerint olyan vegyületet jelent, amely képes az említett észterezést végrehajtani egy acil-oxi-csoport képzésével. „Egy enzim vagy mikroorganizmus” használata a találmány szerinti eljárásoknál két vagy több, vagy akár csak egyetlen enzim vagy mikroorganizmus használatát jelenti.

Az „alkil” vagy „alk” kifejezés önmagában vagy egy más csoport részeként, az itt használt értelemben adott esetben szubsztituált, egyenes vagy elágazó, telített, előnyösen a normál láncban 1–12 szénatomot tartalmazó szénhidrogéncsoportot jelent. Példaként megemlíthető ilyen szubsztituálatlan csoportok: metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, terc-butil-, izobutil-, pentil-, hexil-, izohexil-, heptil-, izoheptil-, oktil-, 2,2,4-trimetil-pentil-, nonil-, decil-, undecil-, dodecilcsoport és hasonlók. A szubsztituensek példáiként a következő csoportok közül egy vagy több szolgálhat: halogénatom, alkoxi-, alkiltio-, alkenil-, alkinil-, aril-, cikloalkil-, cikloalkenil-, hidroxil- vagy védett hidroxil-, karboxi- (–COOH), alkiloxi-karbonil-, alkil-karbonil-oxi-, karbamoil- (NH₂-CO), amino- (–NH₂), mono- vagy dialkil-amino-csoport vagy merkaptocsoport (–SH).

A „rövid szénláncú alkil” kifejezés önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben adott esetben szubsztituált, a fentiekben „alkil”-nál leírt, a normál szénláncban 1–4 szénatomot tartalmazó csoportot jelent.

Az „alkoxi” vagy „alkiltio” kifejezések önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben a fentiekben leírt egy oxigénatomon (–O) vagy kénatomon (–S–) át kapcsolódó alkilcsoportot jelentenek. Az „alkoxi-karbonil” kifejezés önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben egy karbonilcsoporton keresztül kapcsolódó alkoxicsoportot jelent. Az „alkil-karbonil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan alkilcsoportot jelent, amely karbonilcsoporton keresztül kapcsolódik, amely utóbbi viszont egy oxigénatomon keresztül kapcsolódik. Az „alkil-amino” vagy „dialkil-

amino” kifejezések önmagukban vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan aminocsoportot jelentenek, amely szubsztituálva van egy vagy két, a fentiekben leírt alkilcsoporttal.

Az „alkenil” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként az itt használt értelemben olyan, adott esetben szubsztituált, a fentiekben leírt alkilcsoportot jelent, amely még tartalmaz legalább egy szén-szén kettős kötést is. A példaként szolgáló szubsztituensek közé sorolhatunk egy vagy több, a fentiekben leírt alkilcsoportot és/vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoportok szubsztituenseiként leírt csoportot. Az „alkenil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, a fentiekben leírt alkenilcsoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

Az „alkinil” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, adott esetben szubsztituált, a fentiekben alkilcsoportként leírt csoportot jelent, amely még tartalmaz legalább egy szén-szén hármas kötést is. A példaként szolgáló szubsztituensek közé sorolhatunk egy vagy több, a fentiekben leírt alkilcsoportot és/vagy az alkilcsoportok szubsztituenseiként a fentiekben leírt egy vagy több csoportot. Az „alkinil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben bármilyen, a fentiekben leírt olyan alkinilcsoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

A „cikloalkil” kifejezés önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben, adott esetben szubsztituált, előnyösen 1–3 gyűrűt és gyűrűként 3–7 szénatomot tartalmazó telített karbociklusos gyűrűrendszert jelent. Példaként szolgáló ilyen szubsztituátlan csoportok közé tartoznak a következők: ciklopropil-, ciklobutil-, ciklopentil-, ciklohexil-, cikloheptil-, ciklooktil-, ciklodecil-, ciklododecil- és adamantilcsoport. A példaként megemlíthető szubsztituensek közé tartozik egy vagy több, a fentiekben leírt alkilcsoport, és/vagy egy vagy több, az alkilcsoportok szubsztituenseiként leírt csoport. A „cikloalkil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben egy, a fentiekben leírt olyan cikloalkilcsoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

A „cikloalkenil” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, adott esetben szubsztituált, a fentiekben cikloalkilként leírt csoportot jelent, amely még legalább egy szén-szén kettős kötést is tartalmaz, így egy részlegesen telítetlen gyűrűt képezve. A példaként megemlíthető szubsztituensek közé tartozik egy vagy több, a fentiekben leírt alkilcsoport, és/vagy egy vagy több, az alkilcsoportok szubsztituenseiként a fentiekben leírt csoport. A „cikloalkenil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, a fentiekben leírt cikloalkenilcsoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

Az „ar” vagy „aril” kifejezések önmagukban vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt érte-

lemben, adott esetben szubsztituált, előnyösen 1 vagy 2 gyűrűt és 6–12 gyűrűszénatomot tartalmazó karbociklusos aromás csoportot jelentenek. Példaként megemlíthető szubsztituátlan ilyen csoportok közé tartoznak a következők: fenil-, bifenilil- és naftilcsoport. A példaként megemlíthető szubsztituensek közé sorolhatunk egy vagy több, előnyösen három vagy kevesebb nitrocsoportot, a fentiekben leírt alkilcsoportot, és/vagy az alkilcsoportok szubsztituenseiként a fentiekben leírt csoportot. Az „aril-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben a fentiekben leírt olyan arilcsoportot jelent, amely oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

A „heterociklusos” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, adott esetben szubsztituált, teljesen telített vagy telítetlen, aromás vagy nem aromás ciklusos csoportokat jelent, amelyek legalább az egyik gyűrűben legalább egy heteroatomot tartalmaznak, és előnyösen monociklusos vagy biciklusos csoportok, amelyek minden egyes gyűrűben 5 vagy 6 atomot tartalmaznak. A heterociklusos csoport tartalmazhat a gyűrűben például 1 vagy 2 oxigénatomot, 1 vagy 2 kénatomot, és/vagy 1–4 nitrogénatomot. Minden egyes heterociklusos csoport a gyűrűrendszer bármely szén- vagy heteroatomján keresztül kapcsolódhat. Példaként említhető heterociklusos csoportok közé tartoznak a következők: tienil-, furil-, pirrolil-, piridil-, imidazolil-, piperidil-, piperidil-azepinil-, indolil-, izoindolil-, kinolil-, izokinolil-, benzotiazolil-, benzoxazolil-, benzimidazolil-, benzoxa-diazolil-, és benzo-furazanil-csoport. A példaként szolgáló szubsztituensek közé számít egy vagy több, a fentiekben leírt alkilcsoport és/vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoportok szubsztituenseiként leírt csoport. A „heterociklo-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben olyan, a fentiekben leírt heterociklusos csoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

A „halogén” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben klór-, bróm-, fluor- vagy jódatomot jelent.

A „taxán” kifejezés az itt használt értelemben olyan vegyületeket jelent, amelyek az alább leírt taxán-csoportot tartalmazzák. A „taxáncsoport” kifejezés az itt használt értelemben olyan csoportokat jelent, amelyek a gyűrűszerkezet helyzetének számozását is fel-tüntető (B) képletű magyszerkezetet tartalmazzák, amely magyszerkezet szubsztituálva is lehet, és gyűrűrendszerében tartalmazhat vinilén-telítetlenséget is. Előnyösek az ilyen csoportok, ha a 4- és 5-helyzetben kondenzálva tartalmaznak egy oxetángyűrűt, miként az a taxolban megtalálható.

A „hidroxi-védőcsoport” kifejezés az itt használt értelemben bármely olyan csoportot jelent, amely képes megvédeni a szabad hidroxicsoportot, és amely az illető reakció után, amely miatt alkalmaztuk, eltávolítható a molekula többi részének megváltozása nélkül. Az ilyen csoportok és azok szintézise megtalálható T. W. Greene „Protective Groups in Organic Synthesis” című

könyvében (John Wiley and Sons, 1981) vagy L. F. Fieser és M. Fieser „Organic Chemistry” című könyvében.

A „só” kifejezés az itt használt értelemben jelenthet szervetlen és/vagy szerves savakkal és bázisokkal képezett savanyú és/vagy bázisos sókat.

Az „acil” kifejezés önmagában vagy valamilyen más csoport részeként, az itt használt értelemben jelenti azt a csoportot, amelyet akkor kapunk, ha valamilyen szerves karbonsav karboxicsoportháról a hidroxicsoporthoz eltávolítjuk. Az „acil-oxi” kifejezés önmagában vagy valamilyen másik csoport részeként, az itt használt értelemben olyan fent leírt acilcsoportot jelent, amely egy oxigénatomon (–O–) keresztül kapcsolódik.

Kiindulási anyagok a C-10 helyzetben végzendő átalakításhoz:

A találmány szerinti eljárás kiindulási anyagaiként használt C-10-acil-oxi-szubsztituált vagy C-10-hidroxiszubsztituált taxánok bármely olyan vegyületek lehetnek, amelyekben végre lehet hajtani a találmány szerinti enzimatis hidrolizáló vagy észterező eljárást. A kiindulási anyagok lehetnek szintetikusan előállított taxánok, vagy előnyösen természetes úton keletkezett taxánok, így például defalomannin, 7-xilozil-taxol, taxol, baccatin III, 10-dezacetil-baccatin III, vagy taxol C (a taxol egy olyan analógja, amelyben a taxol C-13 oldalláncának benzoilcsoportját egy valerilcsoport helyettesíti), önmagukban vagy egymással közös elegyben. A „természetes úton keletkezett” taxán kiindulási anyagokat előnyösen növényi sejtenyészetekből és/vagy taxánt termelő növényi szövetekből, különösen a *Taxus* nemzetséghez tartozó növények, így a *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus wallichiana*, *Taxus media*, *Taxus hicksii*, főként a *Taxus x. media hicksii* szövetéből extrakcióval nyerjük. A példaként szolgáló szövetek közül megemlítjük a tűket, a kérget és a teljes rügyet.

A találmány szerinti C-13 acil-oxi-szubsztituált taxán kiindulási anyagok kinyerésének előnyös módjait illetően lásd Rao, *Pharmaceutical Research*, 10, 521–524 (1993); Kingston, *Pharmac. Ther.*, 52, 1–34 (1991); vagy az itt leírt példákat.

Enzimek és mikroorganizmusok a C-10 helyzetben végzendő átalakításhoz:

A találmány szerinti eljárásnál használt enzim vagy mikroorganizmus bármely olyan enzim vagy mikroorganizmus lehet, amely képes az itt leírt enzimatis hidrolízist vagy észterezést katalizálni. Az enzimatis vagy mikrobiális anyagok, eredetükre vagy tisztaságukra való tekintet nélkül, felhasználhatók szabad állapotban vagy valamilyen hordozón, például fizikai adszorpcióval vagy zárványképzéssel immobilizált állapotban.

Az itt példaként szolgáló mikroorganizmusok közül megemlítjük a következő nemzetségekbe tartozókat: *Nocardioidea*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Micropolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Pseudonocardia*, *Cerskovia*, *Promicromonospora* és *Intrasporangium*. Különösen előnyösek a *Nocardioidea* nemzetséghez tartozó fajták, így a *Nocardioidea albus*, *Nocardioidea flavus*, *Nocardioidea fulvus*, *Nocardioidea luteus*, *Nocardioidea simplex* és *Nocardioidea thermophilacinus*, különösen a *Nocardioidea*

albus ATCC 55424 (SC 13910) és ATCC 55425 (SC 13911) és a *Nocardioidea luteus* ATCC 55426 (SC 13912). Az itt használt „ATCC” megjelölés az American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Marly Maryland 20852), az illető mikroorganizmus letétbe helyezési helyének folyószámát jelenti. A fenti ATCC 55424, 55425 és 55426 jelű mikroorganizmusokat 1993. május 12-én helyeztük letétbe. Az „SC” megjelölés a Squibb cég tenyésztőgyűjteménye által az illető mikroorganizmusnak adott megjelölés.

A biológiailag tiszta *Nocardioidea albus* ATCC 55424 (SC 13910), *Nocardioidea albus* ATCC 55425 (SC 13911) és *Nocardioidea luteus* ATCC 55426 (SC 13912) mikroorganizmusok új mikroorganizmusok. Tudomásul kell venni, hogy ezen mikroorganizmusok mutánsait is, így a kémiai, fizikai (például röntgenbesugárzással) vagy biológiai módszerekkel (például molekuláris biológiai technikákkal) módosítottakat is számításba veszi a találmány az itt leírt hidrolizáló vagy észterező eljárásoknál való felhasználásra.

A *Nocardioidea albus* ATCC 55424 (SC 13910) és ATCC 55425 (SC 13911) tenyészhető az A 94 táptalajon, amelynek összetétele: 35 g kukoricalekvár (corn steep liquor), 20 g Cerelose, 5 g analitikai tisztaságú ammónium-szulfát, 3,5 g kalcium-karbonát, 5 ml szójaolaj és 1 liter desztillált víz. Ezeket a mikroorganizmusokat egy New Brunswick-i (New Jersey) talajmintából izoláltuk, és Gram-pozitív, nem mozgékony, többféle táptalajon aerob körülmények között növekedést mutató mikroorganizmusok. Szilárd YS táptalajon (0,2% élesztőextraktum, 1% keményítő) micéliuma a fehérestől világos krémszínig terjedő színű. A növekedést egy sötét, mind a szilárd, mind a folyékony táptalajban diffúzióra képes pigment képződése kíséri. Mikroszkópos vizsgálat szerint a folyékony táptalajban való növekedést bőségesen elágazó gombafonalból (hifából) álló micéliumaggregátumok képződése jellemzi.

A *Nocardioidea luteus* ATCC 55426 (SC 13912) tenyészhető az A 94 jelű táptalajon, amelynek összetétele: 35 g kukoricalekvár (corn steep liquor), 20 g Cerelose, 5 g analitikai tisztaságú ammónium-szulfát, 3,5 g kalcium-karbonát, 5 ml szójaolaj és 1 liter desztillált víz. A mikroorganizmust egy New Brunswick-i (New Jersey) talajmintából izoláltuk, és Gram-pozitív, nem mozgékony, többféle táptalajon aerob körülmények között növekedést mutató mikroorganizmus. Szilárd YS táptalajon (0,2% élesztőextraktum, 1% keményítő) micéliuma sötét krémszínű. Mikroszkópos vizsgálat szerint a folyékony táptalajban való növekedést bőségesen elágazó gombafonalakból álló micéliumaggregátumok képződése jellemzi.

A fenti *Nocardioidea albus* ATCC 55424 (SC 13910) és ATCC 55425 (SC 13911) és *Nocardioidea luteus* ATCC 55426 (SC 13912) mikroorganizmusokat a Bergey-féle „Manual of Systematic Bacteriology” (Vol. 2.; Ed. P. H. A. Sneath, 1986) kézikönyvvel egyezésben *Nocardioidea albus*, illetve *Nocardioidea luteus* törzsként azonosítottuk.

A találmány szerinti hidrolizáló vagy észterező eljárásoknál használandó enzimek példáulként hidrolázok,

különösen észterázok, proteázok vagy lipázok szolgálnak. Az előnyös enzimek közé a mikroorganizmusokból, különösen a fent leírt mikroorganizmusokból származó enzimek tartoznak. Az enzimeket izolálhatjuk például extrakcióval és tisztítási eljárásokkal, így hidrofób kölcsönhatást alkalmazó kromatográfiával (hydrophobic interaction chromatography), gélszűrőssel, majd valamilyen anioncserélő oszlop alkalmazásával. A találmány rendelkezésre bocsátja továbbá a *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) és *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912)-ből például a fenti technikákkal izolálható és a találmány szerinti hidrolizáló vagy észterező eljárások végrehajtására képes enzimeket.

Enzimek és mikroorganizmusok a C-13 helyzetben végzendő átalakításokhoz:

A találmány szerinti eljárásnál alkalmazott enzim vagy mikroorganizmus lehet bármely olyan enzim vagy mikroorganizmus, amely képes az itt leírt enzimátikus hidrolízist katalizálni. Az enzimátikus vagy mikrobiális anyagokat, eredetüktől vagy tisztaságuktól függetlenül felhasználhatjuk szabad állapotban vagy valamilyen hordozón fizikai adszorpcióval vagy zárványképzéssel immobilizált állapotban.

Egy, a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxánnak a találmány szerinti eljárással való enzimátikus hidrolízisére alkalmas mikroorganizmus kiválasztására szolgáló előnyös módszer az alábbi új szelektáló eljárás, amely a következő lépésekből áll: a) kiválasztunk egy olyan szilárd táptalajt, i) amelyen a szelektálandó mikroorganizmus növekszik; ii) amelyben a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxán nem oldódik, és így a táptalajba keverve, azt zavarossá teszi, és iii) amelyben a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxán, a találmány szerinti hidrolizáló eljárás terméke oldódik, és előnyösen, a lehasított C-13 oldallánc is oldódik, így a táptalajjal közös elegyben tiszta megjelenésű;

b) a mikroorganizmust érintkezésbe hozzuk, például Petri-csészében, a fenti a) lépésben kiválasztott táptalajjal, amelyhez előzetesen hozzákevertük a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxánt, és a mikroorganizmus növekedését lehetővé tevő körülményeket biztosítunk; és

c) megfigyeljük, hogy keletkezik-e tiszta zóna akörül a terület körül, ahol a mikroorganizmus nőtt.

Tiszta zóna képződése azt jelzi, hogy a hidrolízis végbement, és így a mikroorganizmus alkalmas lehet a találmány szerinti hidrolizáló eljárásban való felhasználásra. Az itt használt értelemben a „tiszta” és „zavaros” szavakat egymáshoz képest viszonylagosan kell értelmezni. Ezért a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxánt ahhoz elegendő mennyiségben kell a táptalajhoz keverni, hogy abban szuszpendálva látható legyen (vagyis, hogy „zavaros” megjelenésű legyen), és a tisztaságot a szuszpenzió ezen kezdeti láthatósági fokára vonatkoztatva, vagyis a zavarosság láthatóságának csökkenéseként határozzuk meg.

A találmány által nyújtott egy másik előnyös szelektáló eljárás a fentiekben vázoltaknak megfelelő, az-

zal a különbséggel, hogy olyan szilárd táptalajt választunk, amelyben a C-13 helyzetben a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó taxán oldódik, és így a táptalajhoz keverve tiszta (éles), míg a találmány szerinti hidrolizáló eljárás terméke, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxán oldhatatlan (és amelyben előnyösen a lehasított C-13 oldallánc is oldhatatlan), így a táptalajjal közös elegyben zavaros megjelenésű. A mikroorganizmus növekedési területe körül zavaros zóna megjelenése lehetővé teszi az alkalmas mikroorganizmus kiválasztását.

A találmány szerinti szelektáló módszer egy különösen előnyös megvalósítását a példákban ismertetjük.

A fenti előnyös szelektáló eljárásokat megfelelően felhasználhatjuk akkor, ha a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxán és a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxántermék viszonylagos oldékonysága oly mértékben különbözik, hogy észlelhető az, hogy bekövetkezett-e a találmány szerinti hidrolízis.

A C-13 helyzetben hidrolízis végzésére alkalmas mikroorganizmusok példaként szolgáljanak a következő nemzetségekhez tartozók: *Nocardioides*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Micropolyspora*, *Saccharopolyspora*, *Pseudonocardia*, *Oerskovia*, *Promicromonospora* és *Intrasporangium*. Különösen előnyös mikroorganizmusok a *Nocardioides* nemzetséghez tartozó fajták, így a *Nocardioides albus*, *Nocardioides flavus*, *Nocardioides fulvus*, *Nocardioides luteus*, *Nocardioides simplex* és *Nocardioides thermophilacinus*, különösen a *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) és a *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912).

Miként a fentiekben leírtuk, a biológiailag tiszta *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910), *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) és *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) a találmány által szolgáltatott új mikroorganizmusok. Figyelembe kell venni, hogy ezeknek a mikroorganizmusoknak a mutánsai, így a kémiai, fizikai (például röntgenbesugárzással) vagy biológiai módszerekkel (például a molekuláris biológiai technikáival) módosítottak is felhasználásra vannak szánva a találmány szerinti, itt leírt hidrolizáló eljárásoknál.

A találmány szerinti eljárásoknál felhasználásra szánt, példaként szolgáló enzimek a hidrolázok. Az előnyös enzimek közé a mikroorganizmusokból, különösen a fent leírt mikroorganizmusokból származók tartoznak. Az enzimeket izolálhatjuk például extrakcióval és tisztítási eljárásokkal, miként azokat az itteni példákban leírjuk, különösen a mikroorganizmusok tenyésztésére felhasznált táptalajban extracellulárisan talált aktív frakciók tisztításával, így valamilyen anioncserélő oszlop felhasználásával, majd hidrofób kölcsönhatást alkalmazó kromatográfiával és gélszűrőssel. A találmány rendelkezésre bocsátja továbbá az említett hidrolízis elvégzésére képes enzimeket, amelyek izolálhatók a *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) és *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzsekből, például a fenti technikákkal.

Enzimek és mikroorganizmusok felhasználása a C-10 és C-13 helyzetben végzendő átalakításokhoz:

Ahol mikroorganizmusokat használunk, a sejteket alkalmazhatjuk ép nedves sejtek vagy szárított sejtek, így liofilizált, porlasztva szárított vagy hőkezeléssel szárított sejtek alakjában, vagy kezelt sejtanyag, így megrepesztett sejtek vagy sejtextraktumok formájában. Úgyszintén számításba vesszük a génebérszeti eljárásokkal kezelt mikroorganizmusokat is. Gazdasejt lehet bármely sejt, például az *Escherichia coli* sejt, amelyet úgy módosítottunk, hogy tartalmazzon egy gént vagy géneket, amely(ek) expresszáálásával egy vagy több, az itt leírt katalízisre képes enzim képződik.

Amikor egy vagy több mikroorganizmust alkalmazunk, a találmány szerinti enzimátikus hidrolízis vagy észterezés végrehajtható a mikroorganizmus fermentálását követően (fermentáció és hidrolízis vagy észterezés két fokozatban) vagy azzal egyidejűleg, vagyis az utóbbi esetben *in situ* fermentációval és hidrolízissel vagy észterezéssel (egyfokozatú fermentáció és hidrolízis vagy észterezés).

A mikroorganizmusok tenyésztését elvégezheti a szaktudományban átlagos jártassággal bíró egyén, megfelelő táptalaj felhasználásával. A mikroorganizmusok növekedéséhez alkalmas táptalajok közé tartoznak azok, amelyek a mikroba sejtjeinek növekedéséhez szükséges tápanyagokat tartalmazzák. A tipikus tenyésztő táptalaj tartalmazza a szükséges szénforrásokat, nitrogénforrásokat és elemeket (például nyomnyi mennyiségekben). Indukálószeret is adagolhatunk. Az „indukálószer” kifejezés az itt használt értelemben jelenthet bármely olyan anyagot, amely a mikroba sejtjein belül növeli a kívánt enzimátikus aktivitás kifejlődését.

A szénforrások közé tartozhatnak cukrok, így a maltóz, laktóz, glükóz, fruktóz, glicerin, szorbit, szacharóz, keményítő, mannit, propilén-glikol és hasonló; szerves savak, így a nátrium-acetát, nátrium-citrát és hasonló; és alkoholok, így etanol, propanol és hasonló.

A nitrogénforrások lehetnek az N-Z amin A, kukoricalekvár (corn steep liquor), szójaliszt, szarvasmarha-extraktumok, élesztőextraktumok, melasz, pék-élesztő, tripton, szójakivonat (nutrisoy), pepton, élesztő-amin (yeastamin), aminosavak, így nátrium-glutamát és hasonló, nátrium-nitrát, ammónium-szulfát és hasonló.

A nyomelemek között szerepelhetnek a magnézium, mangán, kalcium, kobalt, nikkell, vas, nátrium és kálium sói. Foszfátokat is adagolhatunk nyomnyi, vagy előnyösen a nyomnyinál nagyobb mennyiségekben.

Az alkalmazott táptalaj tartalmazhat egynél több szén- vagy nitrogénforrást vagy más tápanyagot.

Az előnyös táptalajok közé tartoznak a vizes táptalajok, különösen a példákban itt leírtak.

A reakcióelegy keverése és levegőztetése befolyásolja a hidrolizáló vagy észterező folyamat alatt rendelkezésre álló oxigén mennyiségét, ha a folyamatot például rázott lombik tenyészetekben vagy fermentor tartályokban folytatjuk le a mikroorganizmusok növekedése alatt. Előnyös a 100 rpm és 250 rpm (fordu-

lat/perc) közötti keverési tartomány és a körülbelül 1 és 10 közötti térfogat levegő/térfogat táptalaj/perc levegőztetés.

A mikroorganizmusok növekedése és/vagy a találmány szerinti eljárásban végzett hidrolízis vagy észterezés számára a táptalaj pH-ja előnyösen körülbelül 6 és körülbelül 8,5 között, a hőmérséklet előnyösen körülbelül 24 °C és körülbelül 37 °C között van. A hidrolízist vagy észterezést például *in vitro* végrehajthatjuk mintegy 1–48 óra alatt, vagy előnyösen, amíg a kívánt termék kitermelése maximális nem lesz. Előnyös a találmány szerinti hidrolízis módszereit 6 és 8 közötti pH-nál, különösen nem lúgos körülmények között végezni.

Úgyszintén előnyös a hidrolízis reakcióközegeként vizes folyadékot alkalmazni, bár valamilyen szerves folyadék vagy egy keveredő vagy nem keveredő (kétfázisú) szerves/vizes folyadékelegy is alkalmazható. Az észterezéshez előnyös valamilyen szerves oldószeres vagy kétfázisú szerves/vizes reakcióközeget alkalmazni, bár más közegeket is használhatunk.

A C-10 helyzetben végzendő átalakításhoz előnyös a kiindulási anyag(ok) és az észterezési vagy hidrolízises reakcióközeg együttes tömegére vonatkoztatott 0,025 tömeg% és 2,5 tömeg% közötti mennyiségű C-10 hidroxil- vagy acil-oxi-szubsztituált taxán kiindulási anyagot/anyagokat használni. A találmány szerinti észterező eljárásnál az acilezőszernek a C-10 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxán mennyiségére vonatkoztatott előnyös moláris viszonya körülbelül 1:1 és körülbelül 1000:1 között van. Az enzimnek vagy mikroorganizmusnak a kiindulási anyagra vonatkoztatott alkalmazott mennyiségét úgy választjuk meg, hogy az lehetővé tegye a találmány szerinti enzimátikus hidrolízis vagy észterezés katalizálását. A találmány szerinti hidrolizáló vagy észterező eljárás alkalmazásánál előnyös 90% feletti kitermelés (a kiindulási acil-oxi-csoportot tartalmazó taxánra vonatkoztatott % C-10 helyzetben hidrolizált termék), vagy 50% feletti kitermelést (a kiindulási hidroxicsoportot tartalmazó taxánra vonatkoztatott % C-10 helyzetben acilezett termék) elérni. A hidrolízist vagy észterezést szelektíve végezhetjük a kiindulási taxán C-10 helyzetében. Azaz az olyan termék(ek), amely(ek)nek nagyobb része (vagy egésze) a C-10 helyzetben hidrolizálódik vagy észtereződik, csak az egyéb helyeken történő hidrolízis vagy észterezés nélkül kapható(k).

A C-13 helyzetben végzendő átalakításhoz előnyös a kiindulási anyag(ok) és a hidrolízis reakcióközegeinek együttes tömegére vonatkoztatott 0,025 tömeg% és 0,25 tömeg% közötti mennyiségű C-13 helyzetben acil-oxi-szubsztituált taxán kiindulási anyag(ka)t alkalmazni. Az enzimnek vagy mikroorganizmusnak a kiindulási anyagra vonatkoztatott felhasznált mennyiségét úgy választjuk meg, hogy az lehetővé tegye a találmány szerinti enzimátikus hidrolízis katalizálását. A találmány szerinti hidrolizáló eljárás alkalmazásánál előnyös 90% feletti kitermelést (a kiindulási acil-oxi-csoportot tartalmazó taxán mennyiségére vonatkoztatott % C-13 helyzetben hidrolizált termék) elérni. Hidrolízist szelektíve ér-

hetünk el a kiindulási taxán C-13 helyzetében. Vagyis az olyan termék(ek), amely(ek)nek nagyobb része (vagy egésze) a C-13 helyzetben hidrolizálódik, csak az egyéb helyeken történő hidrolízis nélkül kaphatók.

Elválasztás:

A találmány szerinti eljárások C-10 helyzetben acil-oxi- vagy hidroxicsoportot tartalmazó termékeit és az eljáráshoz kapcsolódó más termékeket, így az alábbiakban leírtakat izolálhatjuk és tisztíthatjuk például olyan eljárásokkal, mint az extrakció, desztilláció, kristályosítás és oszlopkromatográfia.

Hasonlóképpen, a találmány szerinti, C-13 helyzetben hidrolizáló eljárás C-13 hidroxiszubsztituált termékeit és az eljáráshoz kapcsolódó más termékeket, így az alábbiakban leírtakat izolálhatjuk és tisztíthatjuk például olyan eljárásokkal, mint az extrakció, desztilláció, kristályosítás és oszlopkromatográfia.

A termékek felhasználhatósága:

A taxánok a fent leírt taxáncsoportot tartalmazó diterpénvegyületek. Különösen fontosak az olyan taxánok, amelyek olyan taxáncsoportot tartalmaznak, amelyben a 11 és 12 helyzetű szénatomok kettős kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, és amelyben a 13-helyzetű szénatomhoz olyan oldallánc kapcsolódik, mint a taxolszerű taxánokban. A gyógyászatiilag hatékony taxánok, így a taxol, daganatellenes szereként használhatók a mell-, petefészek-, vastagbél- vagy tüdőrákban, melanómában és leukémiában szenvedő betegek kezelésére.

A C-10 helyzetben végzett átalakítással kapott vegyületek:

A találmány szerinti, a C-10 helyzetben hidrolizáló vagy észterező eljárásokkal kapott vegyületek különösen hasznosak a fent említett, gyógyászatiilag hatásos taxánok előállításában, minthogy lehetővé teszik a C-10 helyzetben kívánt szubsztituenszt tartalmazó vegyületek előállítását. Így például, ha a találmány szerinti eljárással a C-10 helyzetben végzett átalakítással előállított vegyületek még hidroxicsoportot is tartalmaznak a C-13 helyzetben, akkor az ilyen vegyületek kapcsolhatók a C-13 helyzetben acil-oxi-oldalláncot képező intermedierekkel, így β -laktámokkal, hogy így a C-13 helyzetben olyan oldalláncot tartalmazó taxánokat kapjunk, mint a taxol vagy annak analógjai. E tekintetben a találmány szerinti eljárásokkal a C-13 helyzetben történő átalakítást elvégezhetjük a találmány szerinti eljárásokkal a C-10 helyzetben végrehajtott átalakítás előtt, azzal egyidejűleg vagy az után.

A találmány szerinti eljárásokkal előállított acil-oxi- vagy hidroxiszubsztituált vegyületeket adott esetben átalakíthatjuk a C-13 helyzetben végzett oldalláncok kapcsoló reakció alkalmazása előtt. Így például, a C-13-tól eltérő helyzetekben egy vagy több hidroxicsoportot védhetünk a kapcsoló reakció előtt, majd azután a védőcsoport(ka)t eltávolíthatjuk.

A találmány szerinti hidrolizáló és észterező eljárásokkal kapott és adott esetben a fentiek szerint módosított, a C-10 helyzetben acil-oxi- vagy hidroxicsoportot tartalmazó taxánok felhasználhatók például a C-13 helyzetben acil-oxi-csoport oldalláncot tartalmazó taxánok, mint az alábbiakban felsorolt és a 400,971 számú európai

szabadalmi iratban; a 4,876,399; 4,857,653; 4,814,470; 4,924,012; 4,924,011 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban, és Kingstonnak a Pharm. Ther., 52, 1–34 (1911) alatti közleményében leírt eljárásokkal előállítottak szintézisénel.

5 A C-13 helyzetben végzett átalakítással kapott vegyületek:

A találmány szerinti hidrolizáló eljárással kapott, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó vegyületek különösen jól felhasználhatók intermediereként a C-13 helyzetben oldalláncot tartalmazó, fent említett taxánok előállításánál. Nevezetesen, a találmány szerinti eljárással előállított, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó vegyületek kapcsolhatók oldalláncot képező 10 intermedier vegyületekkel, így β -laktámokkal, hogy így megkapjuk a C-13 helyzetben oldalláncot tartalmazó taxánokat. Önmagában egy ilyen oldallánc hozzáadása megnövelti vagy kívánatosabb gyógyászati hatékonyságot kölcsönözhet a taxánterméknek, vagy olyan taxán- 20 terméket képezhet, amely könnyebben átalakítható a kiindulási termékénél nagyobb vagy kívánatosabb gyógyászati hatékonysággal rendelkező taxántermékké.

A találmány szerinti eljárással előállított, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó vegyületek adott esetben átalakíthatók még a kapcsolással végrehajtott oldalláncok képzés alkalmazása előtt. Például, a C-10 helyzetben a találmány szerinti eljárásokkal végzett átalakítás végrehajtható a C-13 helyzetben a találmány szerinti eljárással végzett hidrolízis előtt, azzal egyidejűleg vagy az 25 után; és/vagy a C-13-tól eltérő helyzetekben egy vagy több hidroxicsoportot védhetünk a kapcsolási reakció előtt, és utána a védőcsoport(ka)t eltávolíthatjuk.

A találmány szerinti hidrolizáló eljárással kapott, a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó és a fentiek szerint módosított taxánok felhasználhatók például a C-13 helyzetben acil-oxi-csoport oldalláncot tartalmazó taxánok, mint az alábbiakban felsorolt és a 400,971 számú európai szabadalmi iratban: a 4,876,399; 4,857,653; 4,814,470; 4,924,012; 4,924,011 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban, és Kingstonnak a Pharm. Ther., 52, 1–34 (1911) alatti közleményében leírt eljárásokkal előállítottak szintézisénel. Előnyösen egy C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó (VI) általános képletű taxán előállítása.

45 Előnyös vegyületek a C-10 helyzetben végzendő átalakításhoz:

A C-10 helyzetben a találmány szerinti hidrolizáló eljárásnál előnyös a (II) általános képletű taxánok vagy azok sóit alkalmazni, amikor is az enzimátikus hidrolízis a megfelelő (I) általános képletű vegyületeket vagy azok sóit eredményezi. Hasonlóképpen előnyös (I) általános képletű taxánokat vagy azok sóit alkalmazni a találmány szerinti, a C-10 helyzetben észterezést végző eljárásnál, amikor is az enzimátikus észterezés a megfelelő (II) általános képletű vegyületeket vagy azok sóit szolgáltatja.

Az (I) és (II) általános képletben R^7 jelentése előnyösen $R^{11}-C(O)-O-$ általános képletű csoport, különösen, ha R^{11} alkilcsoportot, így metilcsoportot jelent;

R² jelentése előnyösen hidroxil- vagy xilozilcsoport;
 R³ jelentése előnyösen alkilcsoport, így metilcsoport;
 R¹ jelentése előnyösen hidroxicsoport vagy (II) általános képletű csoport, amelyben

R⁸ és R⁹ jelentése egymástól függetlenül alkil-, alkoxi-, alkenil-, alkenil-oxi-, alkinil-, alkinil-oxi-, cikloalkil-, cikloalkil-oxi-, cikloalkenil-, cikloalkenil-oxi-, aril-, aril-oxi-, heterociklusos vagy heterociklil-oxi-csoport;

R¹⁰ jelentése hidrogénatom vagy valamilyen hidroxil-védőcsoport.

Az (I) és (II) általános képletű, példaként szolgáló taxánok közül megemlítjük a cefalomannint, 10-dezacetil-taxolt, 7-xilozil-taxolt, taxol-C-t, 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt, taxolt, baccatin III-at, 10-dezacetil-baccatin III-at, 7-xilozil-baccatin III-at és a 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III-at. A baccatin III enzimatis hidrolízisével a 10-dezacetil-baccatin III előállítás (ecetsav képződése közben), például valamilyen hidroláz felhasználásával, a találmány egy előnyös megvalósítását jelenti. Ezt a reakciót meg is fordíthatjuk a találmány szerinti enzimatis észterezési eljárással.

Az itt leírt eljárásokkal végül is előnyösen taxolt állítunk elő.

Előnyös vegyületek a C-13 helyzetben végzendő átalakításhoz:

A találmány szerinti eljárásnál előnyösen a (VI) általános képletű taxánokat vagy azok sóit alkalmazzuk, amikor is a C-13 helyzetben végrehajtott enzimatis hidrolízis az (V) általános képletű vegyületeket vagy azok sóit eredményezi. Az (V) és (VI) általános képletben

R¹² jelentése előnyösen R⁶-C(O)-O- általános képletű csoport, így acetoxi- vagy hidroxicsoport;

R² jelentése előnyösen hidroxil- vagy xilozilcsoport;

R³ jelentése előnyösen alkilcsoport, így metilcsoport;

R⁴ jelentése előnyösen arilcsoport, így fenilcsoport; és

R⁷ jelentése előnyösen (III) általános képletű csoport, amelyben

R⁸, R⁹ és R¹⁰ jelentése azonos a fentiekben megadottakkal.

Példaként szolgáló (VI) általános képletű kiindulási vegyületek a cefalomannin, 10-dezacetil-taxol, 7-xilozil-taxol, taxol-C és 7-xilozil-10-dezacetil-taxol, önmagukban vagy egymással közös elegyben, vagy a taxol. Előnyös hidrolízis termékek a baccatin III, 10-dezacetil-baccatin III, 7-xilozil-baccatin III és 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III.

A hidrolízis után végzett kapcsolás előnyösen olyan fent leírt (VI) általános képletű taxántermékeket szolgáltat, amelyek C-13 helyzetű acil-oxi-csoportját a (III) általános képlet szemlélteti. Az itt leírt hidrolízissel és kapcsolással végül is előnyösen taxolt állítunk elő.

A reaktánsok vagy termékek sóit vagy szolvátjait, így hidrátjait alkalmazhatjuk vagy az alkalomnak megfelelően előállíthatjuk a találmány szerinti bármelyik eljárás során.

A találmány további leírását az alábbi példák adják, amelyek csupán szemléltető jellegűek, és semmiképpen

sem tekinthetők az igénypontokban megadott oltalmi kör korlátozásának.

1. példa:

- 5 Baccatin III 10-dezacetilezése
 Talajból izolált *Nocardioides luteus* ATCC 55426 (SC 13912) törzset három napig tenyésztünk 28 °C hőmérsékleten, 150 fordulat/perc (rpm) mellett 10 ml táptalajt tartalmazó 50 ml-es Erlenmeyer-lombikban. A táptalaj 1 liter desztillált vízben a következőket tartalmazza: 10 g Bacto-tripton, 5 g Bacto-élesztőextraktum, 6 ml tributirin és 0,06 ml Tween 80, 6,8±0,2 végső pH-nál. A sejteket centrifugálással kinyerjük, mossuk 10 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldattal, és újból felfuszpendáljuk a pufferoldat 2 ml-ében. E sejtuszpenzióhoz 20 µl metanolban oldott 0,5 mg baccatin III-at adunk és a szuszpenziót egy Fisher Roto-Rack segítségével szobahőmérsékleten (körülbelül 23 °C-on) 20 órán keresztül keverjük. Ezután a szuszpenziót metilén-dikloriddal extraháljuk, az extraktumot bepároljuk, újra oldjuk, és a későbbiekben leírt 2. számmal jelzett nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel vizsgáljuk. A minta 0,257 mg/ml 10-dezacetil-baccatin III-at tartalmaz (100%-os konverzió) és csupán nyomnyi baccatin III-at. Az ATCC 5426 törzs három másik táptalajon nőtt, mosott sejtjei is elvégzik ezt az átalakítást.

2. példa:

- 30 Baccatin III 10-dezacetilezése
 1 liter desztillált vízben 10 g Bacto-triptont, 5 g Bacto-élesztőextraktumot és 0,06 ml Tween 80-at tartalmazó, 6,8±0,2 pH-jú 20 ml táptalajban tenyésztett *Nocardioides luteus* ATCC 55426 (SC 13912) törzssel beoltunk egy 4 literes Erlenmeyer-lombikban lévő 1 liter azonos táptalajt. A lombikot 28 °C-on 3 napig rázunk, majd a sejteket centrifugálással kinyerjük. A sejtüledéket 600 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldattal mossuk, és újból centrifugáljuk. Így 36,6 g nedves sejtömeget kapunk. A sejteket -72 °C-on fagyasztjuk, és 2 napig liofilizáljuk. Így 2,5 g sejtet kapunk, amelyet mozsárban törővel megőrünk, és 2 °C-on tárolunk. 1,98 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatot, 50 mg szárított sejtet és 0,5 mg baccatin III 20 µl metanolos oldatot elegyítünk, és Roto-Rack segítségével, szobahőmérsékleten az 1. táblázatban megjelölt időig keverünk. A reakciót 2 ml metanol hozzáadásával leállítjuk. A csapadékot mikrocentrifuga segítségével eltávolítjuk, és a mintákat a későbbiekben leírt 1. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat

Idő (perc)	10-dezacetil-baccatin III mg/ml	Baccatin III mg/ml	Konverzió %
0	0,007	0,252	-
30	0,051	0,143	22

1. táblázat (folytatás)

Idő (perc)	10-dezacetil-baccatin III mg/ml	Baccatin III mg/ml	Konverzió %
60	0,106	0,106	46
120	0,204	0,034	88

3. példa:

Taxol 10-dezacetilezése

Egy *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzs Whatman DE52-t tartalmazó oszlopon anioncserélő kromatográfiával részlegesen tisztított extraktuma 34 milliegység/ml (mU/ml) enzimet tartalmaz. (1 milliegység az enzim olyan mennyisége, amely 28 °C hőmérsékleten 0,25 mg/ml baccatin III-at és 1% metanolt tartalmazó 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban percenként 1 nmol baccatin III-at hidrolizál el 10-dezacetil-baccatin III-má). 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatot, 0,5 mg taxolt, 1% metanolt és 34 milliegység enzimet tartalmazó 2 ml reakcióelegyet Fisher Roto-Rack segítségével 28 °C hőmérsékleten 3,5 órán keresztül inkubálunk. A reakciót 4 ml metiléndikloriddal végzett extrakcióval leállítjuk. Az extraktumot bepároljuk, újból oldjuk metanolban, és a későbbiekben leírt 3. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. A minta 0,075 mg/ml taxolt és 0,186 mg/ml 10-dezacetil-taxolt tartalmaz (78%-os konverzió).

A *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzsből nyert enzim más módszer szerint végzett tisztítása:

Lépés*	Térfogat, ml	Fehérje, mg	Aktivitás, mU	Fajlagos aktivitás, mU/mg	Kinyerés, %
Sejtextraktum	100	450	2050	4,5	–
Ammónium-szulfát	70	196	2830	14,4	138
HIC (éter)	7	24	953	39,9	46,5
Sephacryl S-200	7	0,7	190	271	9,3
BioRad-Q2	3	0,09	51	567	2,5
Sephacryl S-200	8	0,03	26	867	1,3

* A C-10-dezacetiláz tisztítása: 1 milliegység (mU) enzim katalizálja 1 nmol baccatin III 1 perc alatti átalakítását 10-dezacetil-baccatin III-má 25 °C-on, 0,25 mg/ml baccatin III-at és 1% metanolt tartalmazó 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban. A fehérjetartalmat a BioRad fehérjevizsgálati reagenssel (Protein Assay Reagent) határozzuk meg.

4. példa:

10-Dezacetil-baccatin III acezilezése baccatin III-má

7,2 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban 10 tömeg/térfogat% koncentrációban szuszpendált *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) sejteket mikrofluidizáló készülékkel megrepesztünk, és a 10-dezacetiláz enzimet az extraktumból Whatman DEAE cellulóz DE52 anioncserélőn adszorbeáltatjuk úgy, hogy azzal 10 g extraktum fehérje/liter DE52 arányban 3 órán át keverjük. A DE52-t kiszűrjük, pufferoldattal mossuk, és liofilizáljuk. Így 0,091 milliegység en-

A *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 törzset egy fermentorban lévő, 1% triptont és 0,5% élesztőextraktumot tartalmazó táptalajban tenyésztjük. Valamennyi tisztítási lépést 4 °C hőmérsékleten, 7,2 pH-jú 50 mM foszfát-pufferben végzünk. A sejteket 10 tömeg/térfogat% koncentrációban az említett pufferoldatban szuszpendáljuk, és a sejtek lízise céljából 69 150 kPa (10 000 psi) nyomáson kétszer átteresztjük egy mikrofluidizációs készüléken. Az így kapott sejtlizátumot azután 24 000×g-nél 15 percig végzett centrifugálással tisztítjuk. A felülúszókhöz ezután 60%-os telítésség ammónium-szulfátot adunk, és a kapott csapadékot 1 M ammónium-szulfátot tartalmazó pufferoldatban szuszpendáljuk, és HIC-éter (Toya-pearl) töltetű 5,5×2,6 cm-es oszlopon, 2 ml/perc áramlási sebességgel hidrofób interakciós kromatográfiát végzünk vele. Az enzimaktivitást a pufferoldattal eluáljuk. Az aktivitást tartalmazó frakciókat ezután 0,5 ml/perc áramlási sebességgel egy 84 cm hosszú, 2,6 cm átmérőjű Pharmacia Sephacryl S-200 gélszűrő oszlopra visszük. Az oszlopról lejutó aktív frakciókat ezután 2 ml/perc áramlási sebességgel egy BioRad-Q2 2 ml-es anioncserélő oszlopra visszük, és az enzimaktivitást 42 ml 0–0,8 M nátrium-klorid sógrádienssel eluáljuk. Az aktív frakciókat egyesítjük, és a fentiekben leírtak szerint egy Sephacryl S-200 oszlopra visszük. Az enzim molekulatömegét nátrium-dodecil-szulfát gélen végzett vizsgálat alapján 40 000±10 000-nek becsüljük. A fenti egyes lépések eredményei a következők:

zim/mg szilárd anyag terméket kapunk. 0,2 ml 8 pH-jú 1 M kálium-foszfát pufferoldat, 100 mg DE52 gyantán immobilizált enzim, 1,8 ml víz, 2 mg 10-dezacetil-baccatin III és 0,5 ml vinil-acetát elegyét szobahőmérsékleten, mágneses keverővel 14,5 órán keresztül erélyesen keverjük. A reakcióelegyet ezután metiléndikloriddal extraháljuk. Az extraktumot bepároljuk és újból feloldjuk metanolban, a továbbiakban leírt 1. számmal jelzett HPLC módszerrel végzendő vizsgálat céljából. Eszerint a minta 0,688 mg/ml 10-dezacetil-baccatin III-at és 0,203 mg/ml baccatin III-at tartalmaz (19%-os konverzió).

Nagynyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerek:

1. számú módszer:

Oszlop: 5 µm részecskeméretű Hewlett Packard hypersil ODS (C18) töltetű, 200 × 4,6 mm méretű oszlop.

Mozgó fázis: 55% metanol, 45% víz.

Áramlási sebesség: 1 ml/perc.

Oszlophőmérséklet: szobahőmérséklet.

A detektálás hullámhossza: 235 nm.

2. számú módszer:

Oszlop: Phase Separations Inc. (Norwalk, CT) microbore spherisorb phenyl, 3 µm részecskeméretű, 150 × 2,0 mm.

Mozgó fázis: A szolvens: trifluor-ecetsavval pH 4-re állított 15 mM kálium-dihidrogén-foszfát-oldat. B szolvens: acetonitril.

A következő gradienst alkalmazzuk:

Idő percekben	A szolvens, %	B szolvens, %
0	75	25
20	55	45
23	40	60
24	25	75
28	75	25

Oszlophőmérséklet: 35 °C.

A detektálás hullámhossza: 230 nm.

3. számú módszer¹⁾:

Oszlop: 5 µm részecskeméretű Hewlett Packard hypersil ODS (C18) töltetű, 200 × 4,6 mm méretű oszlop.

Mozgó fázis: 60% metanol, 40% víz.

Áramlási sebesség: 1 ml/perc.

Oszlophőmérséklet: szobahőmérséklet.

A detektálás hullámhossza: 235 nm.

¹⁾ Lásd még: Monsarrat et al., Drug Metabolism and Disposition, 18, 895–901 (1990).

5. példa:

Rügyextraktum hidrolízise

Taxus hicksii rügy etanolos extraktumát membrán-szűrők (nanofilters) segítségével 10–15-szörösre töményítjük. 0,5 ml extraktum, 0,5 ml 7 pH-jú 1 M kálium-foszfát pufferoldat, Nocardioides albus ATCC 55 425 (SC 13 911)-ből származó, anioncserélő kromatográfiával és ammónium-szulfátos kicsapással részlegesen tisztított 54 milliegység enzim és 4 ml víz elegyét Fisher Roto-Rack-on, 28 °C hőmérsékleten 48 órán át inkubáljuk. (Az ATCC 55 425 törzs enzimje felhasználható a C-13 helyzetben itt leírtak szerinti hidrolízisre). Egy második kémcső ugyanezt az elegyet tartalmazza, és még Nocardioides luteus ATCC 55 426 (SC 13 912)-ből származó és a 4. példában leírtak szerint 500 mg DE52-n immobilizált 14 milliegység enzimet is. 28 °C-on vezetett 23 órai inkubálás után egy második részlet ATCC 55 426-ből származó és DE52-n immobilizált 14 milliegység enzimet és 4 ml vizet adunk a reakcióelegyhez, és az inkubálást további 22 órán át folytatjuk. Egy kontrollmintához nem adunk enzimet. A mintákat metilén-dikloriddal extraháljuk, és a bepárolt extraktumokat oldjuk metanolban, és az oldatot a fentiekben leírt 2. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. Az eredményeket a 2. táblázat tartalmazza.

Az eredmények azt mutatják, hogy az SC 13 911 törzsből származó dezacilázzal való kezelés után elfogyott a mintából a taxol, cefalomannin, 7-xilozil-10-dezacetil-taxol és 10-dezacetil-taxol, ugyanekkor a baccatin III és 10-dezacetil-baccatin III mennyisége megnőtt. A 10-dezacetil-baccatin III + baccatin III mólaránya a kiindulási taxolhoz 117%-ról 436%-ra nőtt. Ha a rügyextraktumot mind az SC 13 911 törzsből származó C-13 dezacilázzal, mind az SC 13 912 törzsből származó C-10 dezacilázzal kezeltük, akkor a baccatin III koncentrációja a kiindulási érték 6-szorosára nőtt. Így a taxánok elegyét a C-13 dezacilázzal és C-10 dezacilázzal kezelve főtermékként 10-dezacetil-baccatin III-at kapunk.

2. táblázat

Rügyextraktum hidrolízise

Az enzim eredete	10-Dezacetil-baccatin III mg/ml	Baccatin III mg/ml	7-xilozil-10-dezacetil-taxol, mg/ml	Cefalomannin, mg/ml	Taxol, mg/ml	10-DAT, mg/ml	Az enzim eredete	Taxol C, mg/ml	D+B/T*
semmi	0,167	0,142	0,246	0,243	0,401	0,201	semmi	nyomok	116,8
SC 13 911	0,400	0,771	0,027	0,000	0,000	0,014	SC 13 911	0,000	436,3
11+12 ⁺	1,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11+12	0,000	400,8

10-DAT=10-dezacetil-taxol

+ SC 13 911 és SC 13 912

* D + B/T a 10-dezacetil-baccatin III és baccatin III %-os moláris kitermelése, a kiindulási taxol mennyiségére vonatkoztatva

6. példa:

A taxol C-13 helyzetű oldalláncának eltávolítására képes mikroorganizmustörzsek kiválasztása

150 ml desztillált vízben lévő 5,25 g Difco spirit blue agar táptalajt sterilizálunk, és a gyártó utasításainak megfelelően részben lehűtünk. A táptalaj literenként

10 g triptont, 5 g élesztőextraktumot, 20 g agar-agar és 0,15 g spirít blue-t tartalmaz. A táptalajhoz steril szűrőn keresztül 25 mg taxolt és 1 ml metanolban oldott 10 µl Tween 80-at adunk. Egy-egy 100 mm × 15 mm méretű Petri-csészébe 15 ml ilyen táptalajt mérünk.

Miután a lemezek lehültek és megdermedtek, talajmintákat rétegzünk rájuk az alábbiak szerint. 2 g talajt 40 ml vízben szuszpendálunk. A szuszpenzió mintáját vízzel 100-szorosra hígítjuk, és abból egy-egy lemezre 0,1 ml-t terítünk szét. Az alkalmazott vizet előzetesen 0,22 µm lyukméretű szűrőn szűrjük át. A lemezeket 28 °C-on inkubáljuk, és utána kiválasztjuk azokat a telepeket, amelyeket tiszta (éles) zóna vesz körül. A kiválasztás alapját az képezi, hogy a taxol a táptalajban alkalmazott koncentrációban nem oldódik, ezért a lemezeket zavarossá teszi, viszont a baccatin III, és a hidrolízissel lehasított oldallánc oldódik, ezért a telepek körül tiszta (éles) zónát képez. Az így kiválasztott mikroorganizmusok közé tartozik a *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) törzs, valamint a *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzs.

7. példa:

A C-13 helyzetű oldallánc eltávolítása a taxolról

Az ebben a példában végrehajtott reakció menetét az (A) reakcióvázlat tünteti fel. 50 ml-es Erlenmeyer-lombikokban lévő 10–10 ml táptalajt beoltunk a 6. példában leírt módon talajból izolált *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910) vagy ATCC 55 425 (SC 13 911) törzsszel, és 28 °C hőmérsékleten, percnkénti 150 fordulattal 2 napig rázzuk. A táptalaj egy liter desztillált vízben 10 g Bacto triptont, 5 g Bacto élesztőextraktumot és 0,06 ml Tween 80-at tartalmaz, pH-ja 6,8±0,2. A sejteket centrifugálással eltávolítjuk, és a felülúszók pH-ját 1 M kálium-dihidrogén-foszfát-oldattal 8,66-ről 7-re állítjuk be.

Minden egyes felülúszó 2 ml-éhez 20 µl metanolban oldott 0,5 mg taxolt adunk, és a reakcióelegyeket szobahőmérsékleten (körülbelül 23 °C) 21 órán keresztül keverjük. Az oldatokat 4–4 ml metilén-dikloriddal extraháljuk. Az extraktumokat szobahőmérsékleten, nitrogén-atmoszférában szárazra pároljuk, majd metanolban újra oldjuk, és a fentiekben leírt 3. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. Ennek alapján az ATCC 55 425 (SC 13 911) törzs felülúszója 0,014 mg/ml taxolt és 0,166 mg/ml baccatin III-at eredményez (96,7 mol%-os konverzió). A baccatin III-at és a lehasított oldallánc terméket a folyadékromatográfia – tömegspektrometria (LC–MS) módszereivel azonosítjuk.

8. példa:

A C-13 helyzetű oldallánc eltávolítása cefalomaninról

Két 50 ml-es Erlenmeyer-lombikban lévő 10-10 ml táptalajt [35 g kukoricalékvar (corn steep liquor=CSL), 20 g cerelóz (keményítőcukor), 5 g ammónium-szulfát, 3,5 g kalcium-karbonát és 5 ml szójaolaj, desztillált vízzel 1 literre feltöltve] beoltunk *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) törzs 0,5–0,5 ml oltóanyag-tenyésztével. 28 °C-on percnkénti 150 fordulattal vezetett két-

napi inkubálás után a két tenyészetet átoltjuk egy 4 literes lombikba, amely a 7. példában alkalmazott táptalaj 1 literét tartalmazza. 28 °C-on, percnkénti 200 fordulattal 72 órán át vezetett inkubálás után a sejteket centrifugálással eltávolítjuk, és a felülúszó pH-ját 1 M kálium-dihidrogén-foszfát-oldattal 8,16-ről 7-re állítjuk.

Egy Fisher Roto-Rack buktató rázógépen 20 µl metanolban oldott 0,5 mg cefalomannint 2 ml felülúszóval 17 órán át inkubálunk. Ezután az oldatot metiléndikloriddal extraháljuk, az extraktumot bepároljuk, metanolban újból oldjuk, és a fentiekben leírt 2. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. A cefalomannin koncentrációja 0,175 mg/ml-ről 0-ra csökkent, és közben 0,110 mg/ml baccatin III keletkezett.

Kitermelés 89% az analizált kiindulási cefalomanninkoncentrációra vonatkoztatva.

9. példa:

A C-13 helyzetű oldallánc eltávolítása 7-xilozil-taxolról

Nocardioides albus ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) törzsekből származó enzimeket a 8. példában leírt módon állítunk elő, azzal a különbséggel, hogy az 1 liter térfogatú tenyészeteket három nap helyett két napig inkubáljuk. *Nocardioides luteus* 55 426 (SC 13 912) törzset a 8. példában a *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) törzsre leírt módon tenyésztünk. Három nap elteltével a sejteket centrifugálással kinyerjük, 600 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldattal mossuk, és újból centrifugáljuk. 36,6 g nedves sejtet – 72 °C-on megfagyasz-tunk, és két nap alatt liofilizáljuk. Így 2,52 g liofilizátumot kapunk, amelyet mozsárban törővel megtörünk, és 2 °C-on tárolunk.

Az ATCC 55 424 (SC 13 910) és ATCC 55 425 (SC 13 911) törzsek felülúszóinak 1,8 ml-es részleteit, illetve az ATCC 55 426 (SC 13 912) törzs szárított sejtjeinek 1,8 ml vízben szuszpendált 50 mg-os részletét külön-külön inkubáljuk szobahőmérsékleten 0,5 mg 7-xilozil-taxol 0,2 ml metanolos oldatával, Fisher Roto-Rack-on, 42 órán keresztül. A reakcióelegyeket metiléndikloriddal extraháljuk, és a bepárolt extraktumokat metanolban oldva, ezekkel az oldatokkal a fentiekben leírt 3. számmal jelzett HPLC vizsgálatot elvégezzük. A 7-xilozil-taxol koncentrációja 0,218 mg/ml-ről 0-ra esett mindhárom enzimmel. A főtermék mindegyik mintában HPLC-tömegspektrometriás vizsgálat alapján 7-xilozil-baccatin III-ként azonosítható. Egy baccatin III standardra alapozva, az ATCC 55 424 (SC 13 910), ATCC 55 425 (SC 13 911) és ATCC 55 426 (SC 13 912) enzim 0,112, 0,118 és 0,120 mg/ml 7-xilozil-baccatin III koncentrációkat ad. 235 nm-nél baccatin III-ra és 7-xilozil-baccatin III-ra ugyanazt az extinkciókoefficiens alkalmazva, a számított kitermelések 88 mol%, 93 mol% és 94 mol%.

10. példa:

Növényi sejtkeverékek hidrolízise

1 g *Taxus hicksii* tülevelet extrahálunk 10 ml metanol:ecetsav (5000:1) eleggyel. 10 ml ilyen extraktum-

hoz 10 ml víz:ecetsav (500:1) elegyet adunk. Az elegyet 20 °C-on 48000×g-vel 10 percig centrifugáljuk. A kapott üledéket eldobjuk. 4 ml extraktumhoz *Nocardioideus albus* ATCC 55424 (SC 13910) vagy ATCC 55425 (SC 13911) törzsnek a 9. példában leírtak szerint készített felülúszójából 16–16 ml-t adunk, és az elegyet 50 ml-es Erlenmeyer-lombikban, 28 °C-on percenként

150 fordulattal 42 órán át rázzuk. A mintákat metiléndikloriddal extraháljuk, és a bepárolt extraktumokat oldjuk metanolban, és ezeket az oldatokat a fentiekben leírt 2. számmal jelzett HPLC módszerrel vizsgáljuk. Az enzimes kezeléssel és anélkül kapott taxánkoncentrációkat és a (baccatin III + 10-dezacetil-baccatin III) / kiindulási taxol molarányokat a 3. táblázat mutatja.

3. táblázat
Tülevélextraktum enzimatis hidrolízise

Az enzim eredete	10-Dezacetil-baccatin III, µg/ml	Baccatin III, µg/ml	7-xilozil-10-dezacetil-taxol, µg/ml	Cefalomannin, µg/ml	Taxol, µg/ml	(DAB+B)* (taxol)
semmi	0,126	nyomnyi	0,012	0,153	0,392	50,4
SC 13910	0,602	0,319	0,000	0,000	0,000	359,3
SC 13911	0,959	0,294	0,000	0,000	0,000	492,8

* Az értékek $\frac{(DAB+B)}{\text{kiindulási taxol}}$ molarányban megadva

DAB=10-dezacetil-baccatin III
B=baccatin III

11. példa:

Az enzim tisztítása és a taxánok hidrolízise

500 ml-es Erlenmeyer-lombikban lévő 100 ml táptalajt [35 g kukoricalékvar (CSL), 20 g celuló (keményítőcukor), 5 g ammónium-szulfát, 3,5 g kalcium-karbonát és 5 ml szójaolaj, desztillált vízzel 1 literre feltöltve] beoltunk *Nocardioideus albus* ATCC 55425 (SC 13911) ugyanezen táptalajban nőtt tenyészetének 1 ml-ével, és 28 °C-on 2 napig rázzuk. E tenyészet 20 ml-ét átvisszük egy 4 literes Erlenmeyer-lombikban lévő 6,8±0,2 pH-jú 1 liter táptalajba, amely desztillált vízben 10 g triptont és 5 g élesztőextraktumot tartalmaz. A lombikot 28 °C-on 3 napig rázzuk, a sejteket centrifugálással eltávolítjuk és a felülúszó pH-ját 1 M kálium-dihidrogén-foszfát-oldattal 7,89-ről levisszük 7-re.

Az összes tisztítási lépést 4 °C-on hajtjuk végre. A felülúszót 7 pH-jú 25 mM kálium-foszfát pufferoldatban szuszpendált 150 ml Whatman DE 52 anioncserélő műgyantával töltött 5 cm átmérőjű oszlopra visszük. Az oszlopot mossuk 150 ml pufferoldattal, majd 0,25 M nátrium-kloridot tartalmazó 450 ml pufferoldattal. Az enzimaktivitást 0,45 M nátrium-kloridot tartalmazó pufferoldattal eluáljuk. Az áramlási sebesség 5 ml/perc. A DE52 oszlopról származó legtöbb aktivitást tartalmazó frakciókhoz 100 mg/ml mennyiségben ammónium-szulfátot adunk, és az oldatot 1,6 ml/perc áramlási sebességgel egy 100 mg/ml ammónium-szulfátot tartalmazó, 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban szuszpendált 30 ml Pharmacia Phenyl Sepharose CL-4B töltetű, 2,6 cm átmérőjű oszlopra (hidrofób interakciós kromatográfia) visszük. Az oszlopot mossuk 20 mg/ml ammónium-szulfátot tartalmazó 150 ml pufferoldattal, majd az aktivitást önmagával a pufferoldattal eluáljuk. A Phenyl Sepharose oszlopról származó legnagyobb aktivitást tartalmazó frakciókat Amiocon YM10 membránnal végzett ultraszűréssel

25 4 ml-re bekonzentráljuk, és átteresztjük egy 2,6×84 cm méretű Pharmacia Sephacryl S-200 gélszűrő oszlopon. A legnagyobb fajlagos aktivitást mutató frakció nátrium-dodecil-szulfát (SDS) gélen 49000±10000 molekulatömegű egyetlen sávot ad. A tisztítási műveleteket a 4. táblázat összegezi. [1 milliegység (mU) enzim percenként 1 nmol taxolnak baccatin III-má való konverzióját katalizálja 28 °C-on, 0,25 mg/ml taxolt és 1% metanolt tartalmazó 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban].

4. táblázat

Lépcs	Térfogat ml	Fehérje mg	Aktivitás mU
Táptalaj	1000	885	4664
DE52	99	104	1194
Phenyl Sepharose CL-4B	16	6,45	801
Sephacryl S-200	8,8	0,150	164

45

Lépcs	Fajlagos aktivitás mU/mg	Kitermelés %
Táptalaj	5,27	
DE52	11,5	25,6
Phenyl Sepharose CL-4B	124	17,2
Sephacryl S-200	1093	3,5

55

A fenti módon tisztított enzim aktivitásának bemutatására az 5. táblázatban felsorolt taxánszubsztrátumok alkalmazásával az alábbi kísérleteket végezzük.

60

Olyan mintaoldatokat készítünk, amelyek 2,0 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban 0,5 mg taxánszubsztrátumot és 1% metanolt tartalmaznak (1, 2,

3, 4 és 5 számú mintaoldat). Úgyszintén készítünk olyan mintaoldatokat is, amelyek 2,0 ml 7 pH-jú 50 mM kálium-foszfát pufferoldatban a 0,5 mg taxánszubsztrátumon és 1% metanolon kívül még 10 mU-et is tartalmaznak a Phenyl Sepharose SL-4B lépés során tisztított enzimből (1e, 2e, 3e, 4e és 5e jelű mintaoldatok). Valamennyi mintaoldatot 28 °C-on, Fisher Roto-Rack-on keverünk 16 órán át. Az 1, 1e, 2, 2e, 5 és 5e számú mintaoldatokat ezután 4-4 ml metiléndikloriddal extraháljuk. Az extraktumok 2-2 ml-ét bepároljuk, újra oldjuk 1-1 ml metanolban, és vizsgáljuk a 3. számmal jelzett HPLC módszerrel. A 3, 3e, 4 és 4e

számú mintaoldatokat hígítjuk 2-2 ml metanollal, és vizsgáljuk a 3. számmal jelzett HPLC módszerrel (a C-13 helyzetű oldalláncot csak ez utóbbi mintaoldatokban mérjük).

- 5 Az 5. táblázat mutatja minden egyes mintaoldatban az inkubáció után megmaradt taxánszubsztrátum mennyiségét mg/ml-ben, valamint a keletkezett taxántermék mennyiségét az inkubáció végén, úgyszintén mg/ml-ben. Miként az 5. táblázatból látható (lásd az 1e, 2e, 3e, 4e és 5e mintaoldatokat), a fenti módon tisztított
- 10 enzim hidrolízissel hatásosan eltávolítja a felsorolt taxánszubsztrátumok C-13 helyzetű oldalláncát.

5. táblázat
Taxánok hidrolízise tisztított enzimmal

Mintaoldat	Szubsztrátum	Megmaradt mg/ml	Termék	mg/ml	Oldallánc mg/ml
1	taxol	0,268		0,003	
1e		0,030	baccatin III	0,170	
2	cefalomannin	0,239			
2e		0,011	baccatin III	0,190	
3	7-xilozil-taxol	0,250			
3e		0,016	7-xilozil-baccatin III	0,182	0,066
4	7-xilozil-10-dezacetil-taxol	0,250			
4e		0,113	7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III	0,108	0,044
5	10-dezacetil-taxol	0,257			
5e		0,000	10-dezacetil-baccatin III	0,150	

12. példa:

Rügyextraktum hidrolízise

Taxu hicksii rügyek etanolos extraktumát membránszűrőkkel (nanofilters) 10–15-szörösre betöményítjük. 0,5 ml extraktumot, 0,5 ml 7 pH-jú 1 M kálium-foszfát pufferoldatot, Nocardioides albus ATCC 55 425 (SC 13 911)-ből származó 54 milliegség (mU) részlegesen tisztított enzimet (lásd a fenti 11. példát) és 4 ml

- 35 vizet összekeverünk, és Fisher Roto-Rackon, 28 °C-on 48 órán keresztül inkubálunk. A kontrollmintához nem adunk enzimet. Az inkubálás után a mintaoldatokat metiléndikloriddal extraháljuk, a bepárolt extraktumokat oldjuk metanolban, és ezekkel az oldatokkal elvégezzük a 2. számmal jelzett HPLC vizsgálati módszert.
- 40 A kapott eredményeket a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat
Rügyextraktum hidrolízise

Az enzim eredete	10-DAB, mg/ml	Baccatin III, mg/ml	Cefalomannin, mg/ml	XDT, mg/ml	Taxol, mg/ml
Semmi	0,167	0,142	0,243	0,246	0,401
SC 13 911	0,400	0,771	0,000	0,027	0,000

Az enzim eredete	10-DAT, mg/ml	Taxol-C, mg/ml	DAB + B kiindulási taxol, mol% kitermelés
Semmi	0,201	nyomnyi	116,8
SC 13 911	0,014	0,000	436,3

10-DAB=10-dezacetil-baccatin III

B=baccatin III

XDT=7-xilozil-10-dezacetil-taxol

10-DAT=10-dezacetil-taxol

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás legalább egy, a C-10 helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmazó taxán előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a C-10 helyzetben közvetlenül kapcsolódó acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy taxánt az illető acil-oxi-csoport hidroxicsoporttá való hidrolízisét katalizáló enzimmal vagy mikroorganizmussal hozunk érintkezésbe, és a hidrolízist végrehajtjuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás legalább egy, a C-10 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó (I) általános képletű taxán – amely képletben
 R^1 jelentése hidroxil- vagy acil-oxi-csoport;
 R^2 jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, fluoratom, R^5-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, $R^6-C(O)-O-$ vagy $R^6-O-C(O)-O-$ általános képletű csoport;
 R^3 és R^4 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoport vagy heterociklusos csoport;
 R^5 jelentése hidroxil-védőcsoport; és
 R^6 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, aril- vagy heterociklusos csoport –
vagy sói előállítására, *azzal jellemezve*, hogy legalább egy, a C-10 helyzetben valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó (II) általános képletű taxánt – amely képletben R^1 , R^2 , R^3 és R^4 jelentése azonos a fentiekben megadottakkal; és
 R^7 jelentése acil-oxi-csoport –
vagy sóját az említett R^7 acil-oxi-csoport hidroxicsoporttá való hidrolízisét katalizáló enzimmal vagy mikroorganizmussal hozzuk érintkezésbe. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (I) általános képletű taxánok körébe tartozó 10-dezacetil-baccatin III előállítása során (II) általános képletű taxán kiindulási vegyületként a baccatin III-at alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként acil-oxi-csoportot tartalmazó (II) általános képletű taxánok elegyét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként a Taxus nemzetséghez tartozó növény sejtenyészetéből és/vagy szövetextraktumából nyert taxánok elegyét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy Nocardioides nemzetséghez tartozó mikroorganizmust alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy Nocardioides albus vagy Nocardioides luteus törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként Nocardioides albus ATCC 55424 (SC 13910), Nocardioides albus ATCC 55425 (SC 13912) vagy Nocardioides luteus ATCC 55426 (SC 13912) törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
9. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Nocardioides nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy Nocardioides albus vagy Nocardioides luteus törzshöz tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Nocardioides albus ATCC 55424 (SC 13910), Nocardioides albus ATCC 55425 (SC 13911) vagy Nocardioides luteus ATCC 55426 (SC 13912) törzsből származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
12. Az 1. igénypont szerint előállított termék alkalmazása C-13 helyzetben valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó taxán előállítására. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)
13. Eljárás a C-10 helyzetben közvetlenül kapcsolódó valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy taxán előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a C-10 helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmazó legalább egy taxánt egy acilezőszerrel és egy, az illető hidroxicsoport acil-oxi-csoporttá való észterezését katalizáló enzimmal vagy mikroorganizmussal hozzuk érintkezésbe, és az észterezést végrehajtjuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
14. A 13. igénypont szerinti eljárás a C-10 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy (II) általános képletű taxán – amely képletben
 R^1 jelentése hidroxil- vagy acil-oxi-csoport;
 R^2 jelentése hidrogénatom, hidroxicsoport, fluoratom, R^5-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, $R^6-C(O)-O-$ vagy $R^6-O-C(O)-O-$ általános képletű csoport;
 R^3 és R^4 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoport vagy heterociklusos csoport;
 R^5 jelentése hidroxil-védőcsoport;
 R^6 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoport vagy heterociklusos csoport; és
 R^7 jelentése acil-oxi-csoport –
vagy sója előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a C-10 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó, legalább egy (I) általános képletű taxánt – amely képletben R^1 , R^2 , R^3 és R^4 jelentése azonos a fentiekben megadottakkal –
vagy sóját valamilyen acilezőszerrel és a C-10 helyzetű hidroxicsoport R^7 acil-oxi-csoporttá való észterezését katalizáló enzimmal vagy mikroorganizmussal hozzuk érintkezésbe. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
15. A 14. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű taxánként 10-dezacetil-baccatin III-at alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)
16. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy hidroxicsoportot tartalmazó (I) általános ké-

letű taxánok elegyét alkalmazzuk kiindulási anyagként. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

17. A 16. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként a *Taxus* nemzetséghez tartozó növény sejttenyészetéből és/vagy szövetextraktumából nyert taxánok elegyét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

18. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy *Nocardioides* nemzetséghez tartozó mikroorganizmust alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

19. A 18. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy *Nocardioides albus* vagy *Nocardioides luteus* törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910), *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) vagy *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

21. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Nocardioides* nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

22. A 21. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy *Nocardioides albus* vagy *Nocardioides luteus* törzshöz tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

23. A 22. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910), *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) vagy *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzsből származó enzimet alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

24. A 13. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy acilezőszerként egy (IV) általános képletű vegyületet – amely képletben R^{11} jelentése alkil-, alkenil-, alkinil-, aril-, cikloalkil-, cikloalkenil- vagy heterociklusos csoport; és L jelentése kilépőcsoport – alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

25. A 24. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy acilezőszerként vinil-acetátot alkalmazzunk.

26. A 13. igénypont szerint előállított termék alkalmazása C-13 helyzetben valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó taxán előállítására. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

27. A *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzsből izolált enzim, *azzal jellemezve*, hogy katalizálja az 1. igénypont szerinti hidrolízist vagy a 15. igénypont szerinti észterezést. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

28. Eljárás a C-13 helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporthoz tartozó legalább egy taxán előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy C-13 helyzetben közvetlenül kapcsolódó valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy taxánt az említett acil-oxi-csoport hidroxicsoporthá váló hidrolízisét katalizáló enzimmel vagy mikroorganizmussal hozunk érintkezésbe, és a hidrolízist végrehajtjuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

29. A 28. igénypont szerinti eljárás a C-13 helyzetben hidroxicsoporthoz tartozó legalább egy (V) általános képletű taxán – amely képletben

5 R^{12} jelentése hidrogénatom, hidroxicsoporthoz tartozó, R^5-O- , $R^6-C(O)-O-$ vagy $R^6-O-C(O)-O-$ általános képletű csoport;

10 R^2 jelentése hidrogénatom, hidroxicsoporthoz tartozó, fluoratom, R^5-O- általános képletű csoport, xilozilcsoport, $R^6-C(O)-O-$ vagy $R^6-O-C(O)-O-$ általános képletű csoport;

15 R^3 és R^4 jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoport vagy heterociklusos csoport;

20 R^5 jelentése hidroxil-, védőcsoport; és R^6 jelentése hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoport vagy heterociklusos csoport –

vagy sója előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a C-13 helyzetben valamilyen acil-oxi-csoportot tartalmazó legalább egy (VI) általános képletű taxánt – amely képletben

25 R^{12} , R^2 , R^3 és R^4 jelentése azonos a fentiekben megadottakkal; és

R^7 jelentése acil-oxi-csoport – vagy sóját hozzuk érintkezésbe az említett enzimmel vagy mikroorganizmussal. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

30 A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (V) általános képletű taxánok közé tartozó baccatin III, 10-dezacetil-baccatin III, 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III és/vagy 7-xilozil-baccatin III előállítására (VI) általános képletű taxán kiindulási anyagként cefalomannint, 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt, 10-dezacetil-taxolt, 7-xilozil-taxolt, taxol-C-t és/vagy taxolt alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

35 31. A 29. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az acil-oxi-csoportot tartalmazó (VI) általános képletű taxán kiindulási anyagként a C-13 helyzetben különböző oldalláncokat tartalmazó acil-oxi-szubsztituált taxánok elegyét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

40 32. A 31. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként a *Taxus* nemzetséghez tartozó növény sejttenyészetéből és/vagy szövetextraktumából nyert taxánok elegyét alkalmazzuk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

45 33. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy *Nocardioides* nemzetséghez tartozó mikroorganizmust alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

50 34. A 33. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként egy *Nocardioides albus* vagy *Nocardioides luteus* törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

55 35. A 34. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként *Nocardioides albus* ATCC 55 424 (SC 13 910), *Nocardioides albus* ATCC 55 425 (SC 13 911) vagy *Nocardioides luteus* ATCC 55 426 (SC 13 912) törzset alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

60 36. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimeként egy hidrolázot alkalmazzunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

37. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy Nocardioides nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy Nocardioides albus vagy Nocardioides luteus törzsből származó enzimet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

39. A 38. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy Nocardioides albus ATCC 55 424 (SC 13 910), Nocardioides albus ATCC 55 425 (SC 13 911) vagy Nocardioides luteus ATCC 55 426 (SC 13 912) törzsből származó enzimet alkalmazunk. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

40. A 28. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolízis után a C-13 helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoportot tartalmazó, említett legalább egy taxánt, amelyben a C-13-tól eltérő helyzetű hidroxicsoportok adott esetben védettek, kapcsoljuk egy, a C-13 helyzetben acil-oxi-oldalláncot képező vegülettel. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

41. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy taxolt állítunk elő. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

42. Eljárás C-13 helyzetben közvetlenül kapcsolódó acil-oxi-csoportot tartalmazó taxán acil-oxi-csoportjának C-13 helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporttá való hidrolízisére képes mikroorganizmus kiválasztására, *azzal jellemezve*, hogy:

A) i) kiválasztunk egy olyan szilárd táptalajt, amelyben a szelektálandó mikroorganizmus növekszik, és amelyben a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxán nem oldódik, így a táptalajjal elkeverve zavarosságot okoz, de a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó kívánt taxántermék és adott esetben a kívánt lehasított C-13 oldallánctermék oldódik, így a táptalajjal zavarosságmentesen elegyednek;

ii) a mikroorganizmust érintkezésbe hozzuk a fenti i) lépésben kiválasztott táptalajjal, amelyhez előzőleg

hozzákevertük a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxánt, és olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik a mikroorganizmus növekedését; és

5 iii) megfigyeljük, hogy keletkezik-e átlátszó zóna a mikroorganizmus növekedési helye körül; vagy

B) i) kiválasztunk egy olyan szilárd táptalajt, amelyben a szelektálandó mikroorganizmus növekszik, és amelyben a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxán oldódik, így a táptalajjal zavarosságmentesen elegyednek, de a C-13 helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó kívánt taxántermék, és, adott esetben, a lehasított C-13 oldallánctermék nem oldódik, így a táptalajjal keveredve zavarosságot okoz;

10 ii) a mikroorganizmust érintkezésbe hozzuk a fenti i) lépésben kiválasztott táptalajjal, amelyhez előzőleg hozzákevertük a C-13 helyzetben acil-oxi-csoportot tartalmazó kiindulási taxánt, és olyan körülményeket biztosítunk, amelyek lehetővé teszik a mikroorganizmus növekedését; és

15 iii) megfigyeljük, hogy keletkezik-e zavaros zóna a mikroorganizmus növekedési helye körül. (Elsőbbsége: 1993. 06. 13.)

20 43. Biológiaiilag tiszta Nocardioides albus ATCC 55 424 mikroorganizmus. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

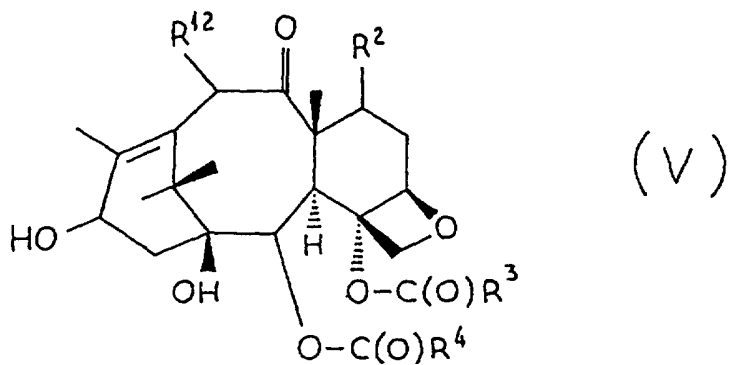
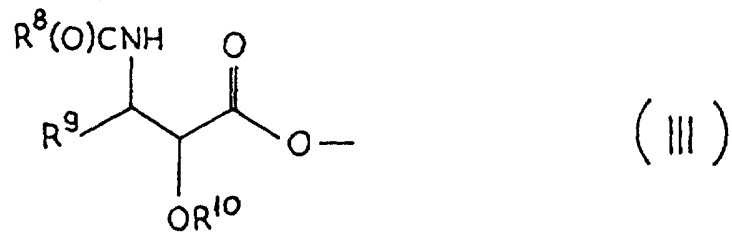
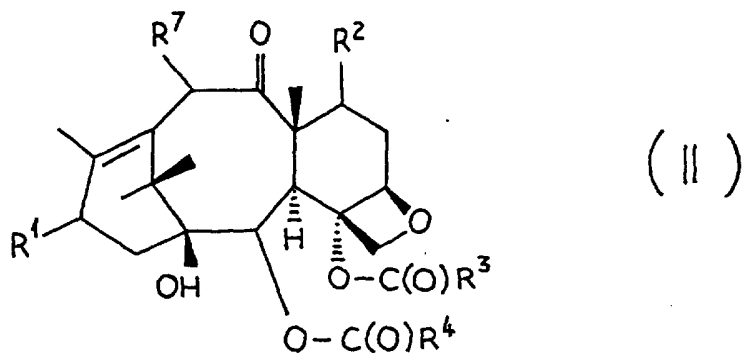
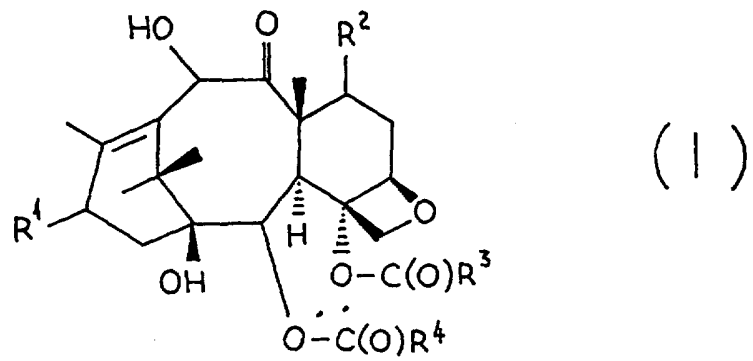
25 44. Biológiaiilag tiszta Nocardioides albus ATCC 55 425 mikroorganizmus. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

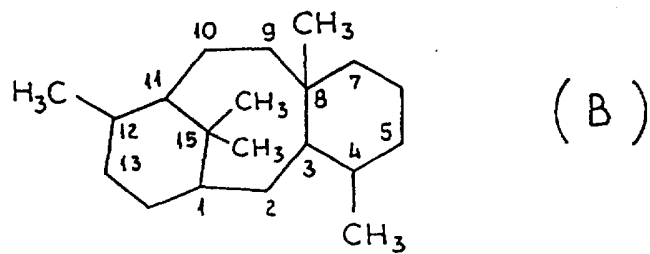
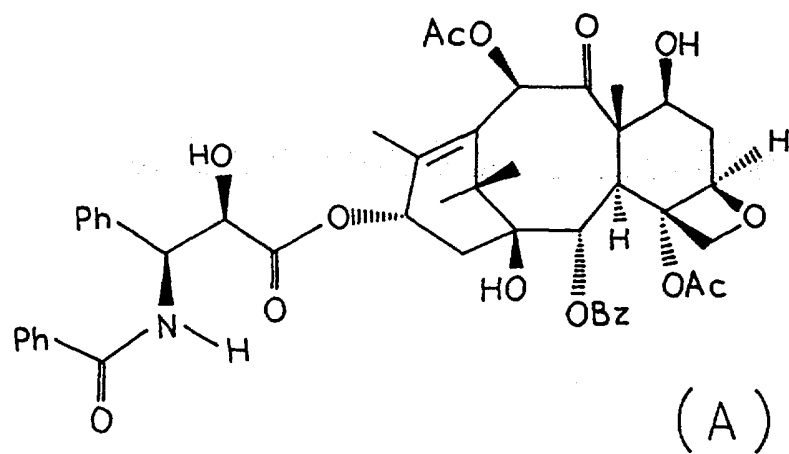
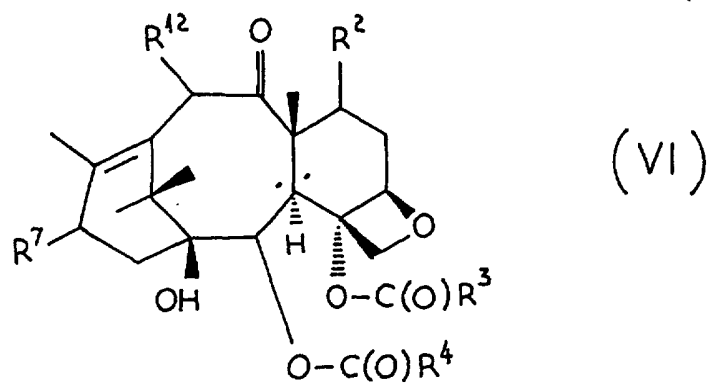
45. Biológiaiilag tiszta Nocardioides luteus ATCC 55 426 mikroorganizmus. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

30 46. A Nocardioides albus ATCC 55 424 törzsből izolált enzim, *azzal jellemezve*, hogy katalizálja a 28. igénypont szerinti hidrolízist. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

35 47. A Nocardioides albus ATCC 55 425 törzsből izolált enzim, *azzal jellemezve*, hogy katalizálja a 28. igénypont szerinti hidrolízist. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)

48. A Nocardioides luteus ATCC 55 426 törzsből izolált enzim, *azzal jellemezve*, hogy katalizálja a 28. igénypont szerinti hidrolízist. (Elsőbbsége: 1994. 07. 01.)





[A]

