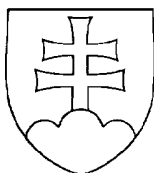


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 322

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. 6:

C 12P 17/12
C 07D 213/80
C 07D 241/24
C 12N 1/20//
(C 12N 1/20,
C 12R 1 : 01)

(21) Číslo prihlášky: 137-93

(22) Dátum podania: 25.02.93

(31) Číslo prioritnej prihlášky: 672/92

(32) Dátum priority: 04.03.92

(33) Krajina priority: CH

(40) Dátum zverejnenia: 06.10.93

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 07.10.98

(86) Číslo PCT:

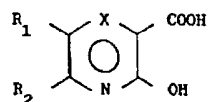
(73) Majiteľ patentu: LONZA A. G. (Dir.: Basel), Gampel/Wallis, CH;

(72) Pôvodca vynálezu: Kiener Andreas, Dr., Visp/Kanton Wallis/, CH;
Tschech Andreas, Dr., Aarau, CH;
Tinschert Andreas, Dipl. biológ, Brig, CH;
Heinzmann Klaus, Visperterminen/Wallis, CH;

(54) Názov vynálezu: **Mikrobiologický spôsob hydroxylácie dusíkatých heterocyklických karboxylových kyselín, mikroorganizmy Ki101 DSM 6920 a dusíkaté hydroxyheterocyklické karboxylové kyseliny**

(57) Anotácia:

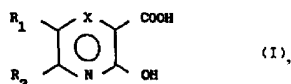
Vynález sa týka nového mikrobiologického spôsobu prípravy dusíkatých hydroxyheterocyklických karboxylových kyselín alebo ich rozpustných solí všeobecného vzorca (I). Východiskovou látkou sú dusíkaté heterocyklické karboxylové kyseliny. Vynález sa ďalej týka nových, na spôsob prípravy vhodných mikroorganizmov.



(I)

Oblasť techniky

Vynález sa týka nového mikrobiologického spôsobu prípravy dusíkatých hydroxyheterocyklických karboxylových kyselín alebo ich rozpustných solí všeobecného vzorca (I)



pri ktorom sa vychádza z zodpovedajúcich dusíkatých heterocyklických karboxylových kyselín. Vynález sa týka aj nových mikroorganizmov vhodných na spôsob prípravy.

V nasledujúcom texte sa ako dusíkaté heterocyklické karboxylové kyseliny, hydroxylované alebo nehydroxylované, chápu tiež ich rozpustné soli, ako napríklad ich alkalické soli alebo amónne soli.

Doterajší stav techniky

Dusíkaté 2-hydroxyheterocyklické karboxylové kyseliny sú dôležitými medziproduktmi pri syntézach účinných látok. Napríklad kyseliny 2-hydroxynikotínové sa používa ako východisková látka na prípravu kyseliny 2-chlórnikotínovej (US patentový spis 4 081 451), ktorá je napríklad dôležitým medziproduktom na výrobu farmaceutických prostriedkov (Ann. Pharm. Fr., 1980, 38 (3), str., 243-252).

Dosiaľ nie sú známe žiadne mikrobiologické spôsoby prípravy dusíkatých hydroxyheterocyklických karboxylových kyselín.

Úlohou vynálezu je poskytnúť jednoduchý a ekologický mikrobiologický spôsob prípravy chemicky ťažko dostupných dusíkatých 2-hydroxyheterocyklických karboxylových kyselín.

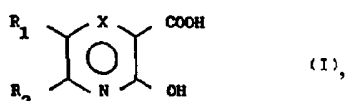
Podstata vynálezu

Túto úlohu vyriešil spôsob prípravy podľa vynálezu uvedený v patentovom nároku 1 a nové mikroorganizmy podľa patentového nároku 6.

Spôsob podľa vynálezu spočíva v tom, že sa dusíkatá heterocyklická karboxylová kyselina všeobecného vzorca (II)



kde R₁ a R₂ sú rovnaké alebo rozdielne a znamenajú atóm vodíka, atóm halogénu alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu a X znamená atóm dusíka alebo skupinu CR₃, v ktorej R₃ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu, ako substrát, prevedie pomocou mikroorganizmov, ktoré zužitkujú kyselinu 6-metylnikotínovú a ktoré obsahujú špecifickú hydroxylázu, na dusíkatú hydroxyheterocyklickú karboxylovú kyselinu všeobecného vzorca (I)



kde R₁, R₂ a X majú uvedený význam.

Pod pojmom "mikroorganizmy zužitkujúce kyselinu 6-metylnikotínovú, ktoré obsahujú špecifickú hydroxylázu" sa rozumie nasledujúce:

Ak sa napríklad pestuje biomasa z kalu čistiacich zariadení ako inokulum s kyselinou 6-metylnikotínovou, získajú sa mikroorganizmy zužitkujúce kyselinu 6-metylnikotínovú, t. j. mikroorganizmy, ktoré rastú s kyselinou 6-metylnikotínovou ako jediným zdrojom uhlíka, dusíka a energie. Ak sa metódami bežnými v odbore podrobia selekcii mikroorganizmy, ktoré úplne odbúravajú kyselinu 6-metylnikotínovú cez kyselinu 6-hydroxy-6-metylnikotínovú ako medziprodukt, získajú sa mikroorganizmy, ktoré obsahujú špecifickú hydroxylázu. To znamená, že sa získajú mikroorganizmy, ktoré špecificky hydroxylujú jediný atóm uhlíka, ktorý leží medzi kyselinovou funkciou a atómom dusíka.

Na spôsob podľa vynálezu sú vhodné v podstate všetky mikroorganizmy, ktoré sa týmto spôsobom podrobili selekcii, napríklad z kalov čistiacich zariadení alebo vzoriek pôdy. Tieto mikroorganizmy nie sú v literatúre opísané a sú súčasťou vynálezu.

Výhodne sa pri spôsobe podľa vynálezu používajú mikroorganizmy s označením Ki101 (DSM 6920), rovnako ako aj ich descendenty a mutanty. Mikroorganizmy boli uložené 10. 02. 1992 v Nemeckej zbierke pre mikroorganizmy a bunkové kultúry GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Vedecký opis mikroorganizmov Ki 101 (DSM 6920):

bunková forma	drobné tyčinky
šírka μm	0,4 - 0,5
dĺžka v μm	1,0 - 1,5
pohyblivosť	-
kmitanie	-
Gram-reakcia	-
lýza 6-%ným KOH	+
aminopeptidáza (Cerný)	+
spóry	-
oxidáza	+
kataláza	+

Rod cez 16S rRNA-sekvenčnú analýzu sa nedal určiť.

Selekcia a pestovanie týchto mikroorganizmov s kyselinou 6-metylnikotínovou sa uskutočňuje metódami bežnými v odbore.

Počas selekcie sa účelne uskutoční "screening" mikroorganizmov za aeróbných podmienok. Výhodne sa mikroorganizmy počas "screeningu" pestujú v pokoji (nie za trepania).

Množstvo kyseliny 6-metylnikotínovej je počas selekcie a pestovania účelné až do 1 % hmotn., výhodne do 0,5 % hmotn.

Selekcia a pestovanie sa účelne uskutočňujú pri hodnote pH od 5 do 9, výhodne od 6 do 8.

Teplota počas selekcie a pestovania môže byť medzi 15 až 50 °C, výhodne medzi 25 až 40 °C.

Zvyčajne sa selekcia a pestovanie uskutočnia v médiu obsahujúcom minerálne soli, výhodne v médiu s obsahom minerálnych solí, ktorého zloženie je uvedené v tabuľke I.

Keď sa dosiahne vhodná optická hustota pri 650 nm (OD₆₅₀) od 0,5 do 100, môžu sa mikroorganizmy zbierať buď metódami bežnými v odbore, alebo sa môže substrát, dusíkatá heterocyklická kyselina, pridať priamo k mikroorganizmom na vlastnú reakciu (biotransformáciu). Vlastná biotransformácia sa potom uskutoční s nerastúcimi bunkami metódami v odbore bežnými.

Ako substráty všeobecného vzorca (II) môžu sa použiť napríklad kyselina nikotínová, kyselina pyrazínkarboxylová alebo ich halogénderiváty alebo C₁-C₄ alkylderiváty.

Ako halogénderiváty kyseliny nikotínovej alebo kyseliny pyrazínkarboxylovej sa výhodne hydroxylujú kyselina 6-chlórnikotínová, kyselina 5,6-dichlórnikotínová a kyselina 5-chlórpyrazínkarboxylová.

Ako derivát kyseliny C₁-C₄-alkylpyrazínkarboxylovej sa výhodne hydroxyluje kyselina 5-metylpyrazínkarboxylová.

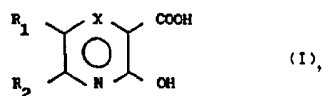
Substrát sa na biotransformáciu môže pridávať kontinuálne alebo jednorázovo. Výhodne sa substrát pridáva tak, aby koncentrácia substrátu v kultivačnom médiu neprekročila 10 % hmotn., výhodne 7 % hmotn.

Ako médium sa môžu použiť na biotransformáciu média bežné v odbore. Výhodne sa biotransformácia uskutočňuje v nízkomolárnom fosfátovom pufrí.

Zvyčajne sa biotransformácia vykonáva so suspenziou mikroorganizmov, ktorá má optickú hustotu od 0,5 do 100 pri 650 nm (OD₆₅₀), výhodne od 5 do 50.

Biotransformácia sa účelne vykonáva pri teplote od 15 do 50 °C, výhodne od 25 do 35 °C a pri hodnote pH od 5 do 9, výhodne od pH 6,5 do 7,5. Po obvyklom reakčnom čase od 5 hod. do 3 dní sa môže hydroxylovaný produkt všeobecného vzorca (I) izolovať v odbore bežnými metódami, napr. oxyslením bezbunkového supernatantu.

Dusíkaté hydroxyheterocyklické karboxylové kyseliny pripravené týmto spôsobom všeobecného vzorca (I)



v ktorom ak X znamená atóm dusíka, R₁ a R₂ sú zhodné alebo rozdielne a znamenajú atóm vodíka, atóm halogénu alebo C₁-C₄-alkyllovú skupinu s výnimkou, že R₁ a R₂ nie sú súčasne atómom vodíka, rovnako ako keď X znamená CH-funkciu, R₁ a R₂ znamenajú atóm halogénu, nie sú v literatúre opísané.

Najvýhodnejšími z týchto nových zlúčenín sú kyselina 5,6-dichlór-2-hydroxynikotínová, kyselina 3-hydroxy-5-methylpyrazínkarboxylová a kyselina 3-hydroxy-5-chlórpyrazínkarboxylová.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Izolácia mikroorganizmov zužitkujúcich kyselinu 6-metylnikotínovú

300 ml Erlenmeyrova banka sa naplní 100 ml média obsahujúceho minerálne soli, ktoré obsahuje 1 mmol kyseliny 6-metylnikotínovej (tabuľka 1) a zmieša sa s 10 ml kalu z čistiacej zariadení firmy LONZA AG vo Vispe, Švajčiarsko alebo sa zmieša so vzorkou pôdy z podniku LONZA, Vispa a inkubuje sa v pokoji pri 30 °C. Po 10 dňoch sa v niektorých kultúrach mohla spektrofotometricky preukázať kyselina 2-hydroxy-6-metylnikotínová. Tieto kultúry sa potom niekoľkokrát preočujú do čerstvého média obsahujúceho minerálne soli. Potom sa bunkové suspenzie, ktoré tvoria kyselinu 2-hydroxy-6-metylnikotínovú naniesú na rovnaké médium, ktoré obsahuje 1,6 % (hmotn./obj.) agaru. Agarové doštičky sa potom inkubujú pri 30 °C v atmosfére, ktorá obsahuje 4 % O₂ a 96 % N₂. Jednotlivé kolónie sa preniesú do kvapalného média a inkubujú sa v pokoji. Bakteriálny kmeň s označením Ki101 (DSM 6920) vytvoril počas rastu na kyseline 6-metylnikotínovej kyselinu 2-hydroxy-6-metylnikotínovú.

bujú sa v pokoji. Bakteriálny kmeň s označením Ki101 (DSM 6920) vytvoril počas rastu na kyseline 6-metylnikotínovej kyselinu 2-hydroxy-6-metylnikotínovú.

Príklad 2

Mikrobiologická oxidácia kyseliny nikotínovej na kyselinu 2-hydroxynikotínovú

Mikroorganizmy s označením Ki101 (DSM 6920) sa inkubujú v 800 ml média obsahujúceho minerálne soli (tabuľka 1) s pridaním 8 mmol kyseliny 6-metylnikotínovej v 1 litrovej Fernbachovej banke pri 30 °C na trepačke pri 100 ot./min. (otáčky za min.). Inokulum má 5 % (obj./obj.). Po 5 dňoch je OD₆₅₀ približne 0,5. Potom sa bunky zoberú a jedenkrát sa premyjú 50 molárnym fosfátovým pufrí s hodnotou pH 7,0. Potom sa bunky resuspendujú v 20 ml 50 mM fosfátovom pufrí s hodnotou pH 7,0., ktorý obsahuje 200 mg (1,38 mmol) sodnej soli kyseliny nikotínovej. OD₆₅₀ je 20. Po 6 hod. inkubácie na trepačke pri 30 °C sa chromatografiou v tenkej vrstve už nedokázala kyselina nikotínová. Potom sa biomasa odstredí a supernatant sa okyslí na hodnotu pH 2,5, aby sa kyselina 2-hydroxynikotínová vyzrážala. Pomocou ¹H-NMR (DMSO) analýzy sa nedokázala v izolovanom produkte žiadna nečistota. Spolu sa izolovalo 140 mg (1 mmol) kyseliny 2-hydroxynikotínovej, čo zodpovedá výťažku 72 %, vzhľadom na kyselinu nikotínovú.

Tabuľka 1

Zásobné roztoky média obsahujúceho minerálne soli

Zásobný roztok 1:

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	156,0 g
NH ₄ Cl	10,0 g
K ₂ SO ₄	1,2 g
pH upraviť s KOH na	7,0
destilovaná voda	500,0 ml

Zásobný roztok 2:

kyselina p-aminobenzoová	8,0 mg
D-biotin	2,0 mg
kyselina nikotínová	20,0 mg
Ca-D-pantotenát	10,0 mg
pyridoxalhydrochlorid	30,0 mg
tiaminhydrochlorid	20,0 mg
kyanokobalamin	10,0 mg
destilovaná voda	100,0 ml, sterilne filtrovať

Zásobný roztok 3:

HCl (37 %)	7,0 ml
FeCl ₂ · 4H ₂ O	1,5 g
ZnCl ₂	0,07 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1 g
H ₃ BO ₃	0,006 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,19 g
CuCl ₂ · 7H ₂ O	0,002 g
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0,024 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,036 g
destilovaná voda	1000,0 ml, autoklávať, 121 °C, 20 min.

Zásobný roztok 4:

NaOH	0,5 g
Na ₂ SeO ₃ · 5H ₂ O	0,003 g
Na ₂ WO ₄ · 2H ₂ O	0,004 g
destilovaná voda	1000,0 ml, autoklávať, 121 °C, 20 min.

Zásobný roztok 5:

MgCl₂ · 6H₂O 40,0 g
 CaCl₂ · 2H₂O 5,0 g
 destilovaná voda 200,0 ml, autoklávovať, 121 °C, 20 min.
 Kyselina 6-metylnikotínová (500 mM)
 sodná soľ kyseliny 6-metylnikotínovej 80,0 g
 destilovaná voda 1000,0 ml, autoklávovať, 121 °C, 20 min.

Rastové médium 10 mM kyselina 6-metylnikotínová
 roztok 1 25,0 ml
 kyselina 6-metylnikotínová 20,0 ml
 destilovaná voda 1000,0 ml, autoklávovať, 121 °C, 20 min.

Po sterilizácii sa pridá

roztok 2 0,5 ml
 roztok 3 1,0 ml
 roztok 4 1,0 ml
 roztok 5 0,5 ml

Tabuľka 2:

Príklad 3 až 7

Príklady 3 až 7 sa vykonávajú podľa príkladu 2. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 2.

Príklad	Východzia látka	Koncentr. hm/ob. ml	Objem ml	Čas [h]	Produkt	Výťažok
3	sodná soľ kys. 6-chlórnikotínovej	1 %	20	16	kys. 6-chlor-2-hydroxynikotínová izol.	70 %
4	sodná soľ kys. 5,6-dichlórnikotínovej	1 %	20	16	kys. 5,6-dichlor-2-hydroxynikotínová	20 % anal.
5	sodná soľ kys. pyrazínkarboxylovej	0,3 %	5	24	kys. 3-hydroxy-5-pyrazínkarboxylová	70 % anal.
6	sodná soľ kys. 5-metylpyrazínkarboxylovej	0,3 %	5	24	kys. 3-hydroxy-5-metylpyrazínkarboxylová	60 % anal.
7	sodná soľ kys. 5-chlóropyrazínkarboxylovej	0,3 %	5	24	kys. 3-hydroxy-5-chlóropyrazínkarboxylová	50 % anal.

v tabuľke 2:

hm/ob. znamená hmotnosť/objem

izol. znamená izolované

anal. znamená analyticky

Analytické údaje k príkladu 6

(kyselina 3-hydroxy-5-metylpyrazínkarboxylová)

¹H-NMR: (DMSO, 400 MHz) δ v ppm 2,4, s; 2,6, s; 3,8, s; 7,8, s.

¹³C-NMR: (DMSO, 100,5 MHR) δ v ppm 20, t; 40, m; 130, s; 134, s; 155, s; 164, s; 170, s.

Analytické údaje k príkladu 7

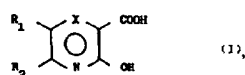
(kyselina 3-hydroxy-5-chlóropyrazínkarboxylová)

¹H-NMR: (D₂O a dioxan, 400 MHz) δ ppm 3,8, s; 4,7, s; 8,0, s.

¹³C-NMR: (D₂O a dioxan, 100,5 MHz) δ ppm 132, s; 133, s; 145, s; 149, s; 164, s; 172, s.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Mikrobiologický spôsob hydroxylácie dusíkatých heterocyklických karboxylových kyselín alebo ich rozpustných solí všeobecného vzorca (I)



kde R₁ a R₂ sú zhodné alebo rozdielne a znamenajú atóm vodíka, atóm halogénu alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu a X znamená atóm dusíka alebo CF₃ skupinu, kde R₃ znamená atóm vodíka alebo atóm halogénu, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa dusíkatá heterocyklická karboxylová kyselina alebo jej rozpustné soli všeobecného vzorca (II)



kde R₁ a R₂ a X majú uvedený význam, ako substrát, premenia pomocou mikroorganizmov zužitkujúcich kyselinu 6-metylnikotínovú a obsahujúcich špecifickú hydroxylázu, na produkt všeobecného vzorca (I)

2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa ako substrát použijú dusíkaté heterocyklické karboxylové kyseliny všeobecného vzorca (II)



kde R₁ a R₂ sú rovnaké alebo rôzne a znamenajú atóm vodíka, atóm chlóru alebo metylovú skupinu a X znamená atóm dusíka alebo CH skupinu.

3. Spôsob podľa aspoň jedného nároku 1 a 2, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa reakcia vykonáva s mikroorganizmami označenými Ki101 DSM 6920 alebo ich descendentami a mutantmi.

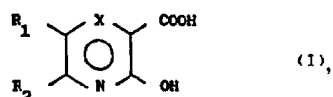
4. Spôsob podľa aspoň jedného nároku 1 až 3, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa reakcia vykonáva pri jednorázovom alebo kontinuálnom pridaní substrátu tak, že koncentrácia substrátu nepresiahne v kultivačnom médiu 10 % hmotnostných.

5. Spôsob podľa aspoň jedného nároku 1 až 4, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že sa reakcia vykonáva pri teplote od 15 do 50 °C a pri pH od 5 do 9.

6. Mikroorganizmy, ktoré zužitkovávajú kyselinu 6-metylnikotínovú ako jediný zdroj uhlíka, dusíka a energie cez kyselinu 2-hydroxy-6-metylnikotínovú.

7. Mikroorganizmy, podľa nároku 6 s označením Ki101 uložené pod DSM 6920 a ich descendenty a mutanty, zachovávajúce si schopnosti pôvodného mikroorganizmu.

8. Dusíkaté hydroxyheterocyklické karboxylové kyseliny všeobecného vzorca (I)



v ktorom keď X znamená atóm dusíka, R₁ a R₂ sú rovnaké alebo rôzne a znamenajú atóm vodíka, atóm halogénu alebo C₁-C₄-alkylovú skupinu s výnimkou, že R₁ a R₂ neznamenajú spoločne atóm vodíka a keď X znamená CH skupinu, R₁ a R₂ znamená atóm chlóru.

9. Kyselina 5,6-dichlor-2-hydroxynikotínová.

10. Kyselina 3-hydroxy-5-metylpyrazínkarboxylová.

11. Kyselina 3-hydroxy-5-chlóropyrazínkarboxylová.

Koniec dokumentu