SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285923

(21) Číslo prihlášky: **483-2000**

(22) Dátum podania prihlášky: **30. 9. 1998**

(24) Dátum nadobudnutia účinkov patentu: **2. 11. 2007**
Vestník ÚPV SR č.: **11/2007**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **MI97A002255**

(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **3. 10. 1997**

(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **IT**

(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **12. 9. 2000**
Vestník ÚPV SR č.: **09/2000**

(47) Dátum sprístupnenia patentu verejnosti: **10. 10. 2007**

(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:

(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/EP98/06226**

(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO99/18229**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. (2006):

C12P 19/00

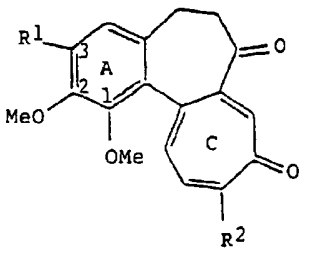
(73) Majiteľ: **INDENA S.P.A., Milano, IT;**

(72) Pôvodca: **Bombardelli Ezio, Milano, IT;**
Ponzone Cesare, Milano, IT;

(74) Zástupca: **Majlingová Marta, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob prípravy 3-O-glykozylkolchicónových zlúčenín**

(57) Anotácia:
Opisuje sa spôsob prípravy 3-O-glykozylkolchicónových zlúčenín vzorca (I), kde R^1 je glykozidový zvyšok, R^2 je C_{1-6}alkoxy alebo C_{1-6}tioalkyl, biotransformáciou kolchicónových zlúčenín, v ktorých R^1 je OH alebo metoxyskupina, pomocou *Bacillus megaterium*.



(I)

SK 285923 B6

Oblasť vynálezu

Tento vynález sa týka biotransformácie kolchicinoidných zlúčenín, spôsobenej vybranými mikrobiálnymi kmeňmi, na príslušné 3-O-glykozylové deriváty. Spôsob podľa tohto vynálezu poskytuje zlúčeniny glykozylované výlučne v polohe C-3 aromatického kruhu A, vychádzajúc z uvedených kolchicónových zlúčenín, vo vysokých výťažkoch a čistote.

Zlúčeniny získané biotechnologickým spôsobom podľa tohto vynálezu, najmä tiokolchicozón (3-O-glykozyltiokolchicón všeobecného vzorca (I), kde R^1 = -OCH_3 a R^2 = -SH_3), sú účinné látky mimoriadneho farmakologického významu, najmä na prípravu nových protinádorových liekov.

Doterajší stav techniky

V minulosti sa vynaložilo veľa námahy na získanie vysoko špecifických glykozylovaných zlúčenín všeobecného vzorca (I) a príbuzných kolchicinoidných zlúčenín, buď pomocou chemických reakcií, alebo pomocou biotransformácie.

Chemický spôsob pozostáva v postupnosti nešpecifických reakcií, ktoré neselektívne obsahujú rôzne polohy molekuly, ktoré vedú k zmesi glykozylovaných derivátov, pričom niektoré z nich sú neúčinné. Z toho dôvodu sú výťažky po konverzii v účinnom produkte špecificky glykozylovanom v polohe C-3 aromatického kruhu, veľmi nízke.

Biologický prístup sa týka najmä biotransformácie kolchicinoidných zlúčenín (ktoré sú nepriamo príbuzné s kolchicónovými zlúčeninami), ako je napríklad kolchicín a tiokolchicín, pomocou kultúry *Centella Asiatica*, na monoglykozylované deriváty v polohe C-2 a C-3 aromatického kruhu; takáto transformácia nie je z toho dôvodu vysoko selektívna a poskytuje nedostatočné výťažky a produktivitu (Solet, J. M., a ďalší, Phytochemistry 33, 4, 817 až 820, 1993).

Ďalšie úsilie biotransformovať kolchicinoidné zlúčeniny poskytlo len demetyláciu metoxyskupín viazaných na aromatickom kruhu (v polohe C-2 a C-3), v každom prípade vždy charakterizovanú limitovanými výťažkami a produktivitou a chudobnou regioselektivitou.

Huffort C. D. a ďalší (J. Pharm. Sc., 68, 10, 1239 až 1242, 1979) použitím *Streptomyces griseus* a/alebo *Streptomyces spectabilis* a Bellet P. a ďalší (GB-923421, 1959) použitím rozdielnych kmeňov *Streptomyces* a ostatných druhov baktérií a húb, sa pokúšali transformovať kolchicín a jeho deriváty na zodpovedajúce 3-demetylované deriváty. Výsledky týchto známych metód potvrdzujú, čo bolo uvedené v súvislosti s neselektivitou zúčastnených mikrobiálnych enzýmov, napríklad pôsobenie v polohe C-2, C-3 alebo C-10 alkaloidovej molekuly. Okrem toho, úroveň produktivity uvedených katalytických systémov je dosť malá, čo má za následok nízke konverzné výťažky, malé substrátové koncentrácie, ktoré môžu byť použité a častú degradáciu tropolónového kruhu.

V poslednom čase Poulev a ďalší (J. Ferment. Bioeng. 79, 1, 33 až 38, 1995) opísali špecifickú demetyláciu pomocou bakteriálnych mikroorganizmov, ale naďalej s chudobnými výťažkami a produktivitou.

Enzýmová aktivita z mikroorganizmov podobných uvedeným (*Streptomyces, Bacillus* atď.) sa použila na biotransformáciu iných zlúčenín, ako napríklad maytanzinoidov (US patent 4 361 650: Izwa, M. a ďalší, J. Antibiotics, 34, 12, 1587 až 1590, 1981). Tiež v tomto prípade katalyzovaná reakcia spočíva výlučne v demetylácii, charakterizovanej nízkymi konverznými výťažkami a produktivitou.

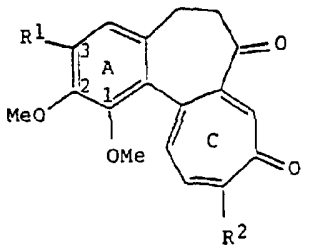
Glykozyltransferázová aktivita α-amylázy z *Bacillus megaterium* už bola opísaná (Brumm, P.J., a ďalší, Starch, 43, 8, 319 až 323, 1991); akceptor špecifickosti (výlučne glukózy alebo glukozidov) sa stáva zvlášť vysokým. Cyklo-dextrínglukozyltransferázy, produkované rovnakými mikrobiálnymi zdrojmi, katalyzujú α-1,4-trans-glukozyláciu rubusozidu (β-D-glukozyl ester 13-O-β-glukozyl--steviolu), vychádzajúc zo škrobu. Taktiež v tejto biokonverzii akceptor transferáznej reakcie je substrát glycidovej frakcie (Darise, M., a ďalší, Agric. Bioel. Chem., 48, 10, 2483 až 2488, 1984). Cyklodextrínglykozyltransferázy sa teda použili na prípravu cyklodextrínov G6 a G8 zo škrobu (Kithata, S., Okada, S., Agric. Biol. (Chem., 38, 12, 2413 až 2417, 1974).

Tieto príklady ukazujú vysokú substrátovú špecifickosť účinkov glykozyl-transferázy exprimovanej pomocou *Bacillus megaterium*, ktoré zahŕňajú len glukozylové akceptory, a teda sa nedajú očakávať žiadne reakcie na sekundárnych metabolitoch, ktoré majú odlišnú, komplexnú molekulovú štruktúru, ako napríklad kolchicóny. V skutočnosti nie sú známe žiadne príklady použitia uvedených mikroorganizmov pre enzýmovú konverziu kolchicónových zlúčenín na 3-glykozylové deriváty.

Teraz sa zistilo, že kmene *Bacillus megaterium*, schopné rastu v prítomnosti vysokých koncentrácií kolchicónu (R^1 = -OCH_3, R^2 = -OCH_3), 3-demetylkolchicónu a príslušných tio-derivátov, majú nesmierne vysokú, veľmi špecifickú biotransformačnú aktivitu uvedených substrátov na glykozylované deriváty výlučne v polohe C-3 aromatického kruhu. Takáto transformácia sa uskutoční vo veľmi krátkom čase a je charakterizovaná prekvapivo vysokými výťažkami.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je spôsob prípravy 3-O-glykozylkolchicónových zlúčenín vzorca (I)



(I),

kde

R^1 je glykozidový zvyšok, najmä O-glykozidový zvyšok,

R^2 je C_{1-6}alkoxy alebo C_{1-6}tioalkyl,

ktorý pozostáva z biotransformácie zlúčenín, v ktorých R^1 je OH alebo metoxyskupina pomocou *Bacillus megaterium*.

Bacillus megaterium je gram-pozitívna spóra generujúca baktériu s priemerom bunky väčším než 1,0 μm; rastúca aeróbne na niekoľkých médiách kultúr; kataláza-pozitívna; hydrolyzačná želatína. Dokázalo sa, že kmene *Bacillus megaterium*, ktoré môžu byť použité podľa tohoto vynálezu, sú schopné uspokojivo rásť a je ich možné udržiavať životaschopné taktiež vo vysokých koncentráciách kolchicónu, tiokolchicónu (R^1 = -OCH_3, R^2 = -OCH_3) a príslušných 3--demetylových derivátov (nad 2 g/l), ako bolo dokázané skúškou rastu a mikroskopickou analýzou. Príbuzné druhy, ako napríklad *Bacillus cereus*, práve pri koncentrácii sub-

strátu 1 g/l dokazujú ťažkosti v raste (absorbancie 10 až 15 % kontroly).

Vysoká selektívnosť a efektívnosť biotransformácie je prekvapivá a nezvyčajná, pretože úrovne výťažkov sa pohybujú od 70 % do 95 %.

Ďalej, mikroorganizmy použité v biokonverzii sú schopné udržať permanentnú katalytickú aktivitu, dokonca v opakovaných fermentačných krokoch, z toho dôvodu poskytujú špecifickú biokonverziu v jednotlivých dávkach a kontinuálnych spôsoboch. Tento spôsob preto poskytuje vysokú úroveň produktivity a reprodukovateľnosti.

Výrazná reakčná regioselektivita zabezpečuje, ďalej pozoruhodné produkčné výťažky, vysokú kvalitu a čistotu výsledných produktov, teda poskytuje 100 % čistotu, s jednoduchým poprúdovým spracovaním.

Ďalej, dôležitými výhodami je redukovaný výskyt kroku čistenia a izolácie produktu, ekonomickosť procesu a afidabilita a bezpečnosť použitia.

Operatívne sekvencie použiteľné v spôsobe podľa vynálezu zahrnujú:

A. Selekciu kultúr *Bacillus meaterium* schopných rásť v prítomnosti vysokých koncentrácií kolchicónových substrátov, vychádzaním z prírodných zdrojov alebo zo zbierky kmeňov.

B. Selekciu izolátov z A), na skúšku transformačnej katalytickej aktivity na zodpovedajúce 3-O-glykozylové deriváty, pomocou biokonverzných skúšok na špecifických substrátoch, podávaných v postupne stúpajúcich koncentráciách.

C. Mikrobiologickú charakterizáciu kmeňov vybraných z B.

D. Postupné zvýšenie biotransformačných výťažkov, prostredníctvom cielenej špecifickej selekcie bakteriálnej populácie z B.

E. Štúdium a optimalizáciu kritických fermentačných parametrov na optimalizáciu biotransformácie.

F. Štúdium a optimalizáciu metód na udržanie vysokoproduktívnych kultúr, zaručene stabilných homogénnych inokúl na produktívne použitie na priemyselné účely.

G. Rozšírenie spôsobu vo fermentore, v dávkach, jednotlivých dávkach a plynulým spôsobom.

H. Vývoj a optimalizácia metód na poprúdový spôsob a na izoláciu produktu.

Konkrétne, mikroorganizmus použitý v tomto vynáleze môže byť vybraný zo zbierky kultúr získaných z kmeňových depozitových centier, alebo z pôdnych vzoriek rôznych zdrojov alebo z vopred vybraných priemyselných kmeňov, pomocou selektívnej obnovy na rôznych agarových médiách obsahujúcich organické dusíkové zdroje (peptóny, kvasinkové extrakty, mäsové extrakty, asparagín atď.) a uhlíkové zdroje (glycerín, škrob, maltóza, glukóza atď.) s pH 5 až 8, výhodne 6 až 7. Inkubačné teplotné rozsahy sú od 20 °C do 45 °C, výhodne od 28 °C do 40 °C.

Schopnosť rastu kultúry v prítomnosti toxických koncentrácií transformovaných kolchicónových substrátov je vyhodnotená technikami skalárneho riedenia a paralelným umiestňovaním na platne, na rozdielnych agarizovaných substrátoch, časť ktorých bola predtým pridaná ku kolchicónovej zlúčenine (napríklad 3-demetyltiokolchicón), v koncentráciách od 0,1 až 3 g/l (tak, aby inhibovali rast hlavnej časti mikroorganizmu).

Kolónie schopné rastu v opísaných podmienkach sa odstránili zo sterilného média a umiestnili sa na rôzne agarizované médiá tak, aby sa preskúšala ich čistota a homogenita rastu.

Médiami kultúr použitými na udržanie kultúry sú typické mikrobiologické substráty, obsahujúce organické dusíkové zdroje (peptóny, kvasinkové extrakty, tryptón, mäsové extrakty atď.), uhlíkové zdroje (glukóza, maltóza, glycerín atď.), s pH 5 až 8, výhodne 6 až 7. Inkubačné teplotné rozsahy sú od 20 °C do 45 °C, výhodne 28 °C až 40 °C.

Vybrané organizmy sa potom analyzujú na schopnosť rastu v ponorenej kultúre, v prítomnosti kolchicónových zlúčenín a transformovania posledných na zodpovedajúce 3-glykozylové deriváty.

Uvedené skúšky sa vykonali v 100 ml bankách obsahujúcich 20 ml tekutej kultivačnej pôdy, s rozdielnou formuláciou kultivačnej pôdy, obsahujúcej jeden alebo viac organických dusíkových zdrojov (kvasinkové extrakty, peptóny, tryptóny, kazeínové hydrolyzáty, mäsové extrakty, kukuričný extrakt atď.), jeden alebo viac uhlíkových zdrojov (glukóza, glycerol, škrob, sacharóza atď.), anorganické fosforové a dusíkové zdroje, a anorganické soli rôznych iónov (K^+, Na^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++}, Mn^{++} atď.).

Vzorky kultúr sa môžu voliteľne podrobiť mutagénnym spracovaniam, pomocou konvenčných mutagénnych techník (ožiarenie s UV lúčmi atď.) na vyvolanie mutantov, ktoré majú špecifickú biokonverznú aktivitu, ktorá môže byť vyhodnotená rovnakými spôsobmi, ako boli uvedené.

Vzorky kultúr z každej biokonverznej skúšky, sa analyzovali vyhodnotením produkcie 3-glykozylových derivátov, prostredníctvom TLC a HPLC analýzy.

Schopnosť výberu mikroorganizmov z transformujúcich kolchicónových substrátov na príslušné 3-glykozylové deriváty sa potvrdila prostredníctvom biokonverzných skúšok v bankách v 300 ml objeme, v tých istých roztokoch kultúr, ako boli použité vo výberovom kroku.

Mikroorganizmy, ktoré poskytli pozitívnu odpoveď, sa použili v testoch na optimalizáciu biokonverzie, v odlišných kultivačných médiách v 300 ml objeme. Skúmané sú hlavné kultúrne a fermentačné parametre: organické dusíkové zdroje, uhlíkové zdroje, minerálne soli, teplota, prevzdušňovanie miešaním, pH, inkubačná doba, podiel inokula, subkultúrne kroky, doba a tvar pridania substrátu na transformáciu.

Vybrané bakteriálne mikroorganizmy, schopné spôsobiť biotransformáciu podľa tohto vynálezu, môžu rásť na tuhých a tekutých substrátoch kultúr, obsahujúcich jeden alebo viac organických dusíkových zdrojov; výhodne kvasinkové extrakty, mäsové extrakty, peptón, tryptón, kazeínové hydrolyzáty, kukuričný extrakt, atď. Uhlíkové zdroje použiteľné na rast a biotransformáciu sú glukóza, fruktóza, sacharóza, glycerol, sladové extrakty atď., výhodne glukóza, fruktóza a glycerín. Kultúrny prostriedok ďalej obsahuje anorganické fosforové zdroje a soli K^+, Na^+, Mg^{++}, NH_4^+ atď.

Vybrané mikroorganizmy môžu rásť pri teplote od 20 °C do 45 °C, výhodne od 28 °C do 40 °C, s pH medzi 5 a 8, výhodne 6 až 7. Pri rovnakých podmienkach, sú mikroorganizmy, vzaté do úvahy, schopné transformácie kolchicónových zlúčenín na zodpovedajúce 3-glykozylové deriváty. Uvedené transformácie sa vyskytnú v ponorenej kultúre, v bankách inkubovaných na rotačnej trepačke, s miešaním od 150 do 250 otáčok/minútu.

V dôsledku špeciálnej kinetiky zúčastnenej biotransformácie, ktorá sa týka mikrobiálneho rastu, sú optimálne podmienky na potrebu biotransformácie rovnaké ako podmienky, ktoré sú optimálne na rast. Preto, kultúry vhodné podporiť dobrý mikrobiologický rast, ako napríklad tie, ktoré sú založené na uvedených organických a anorganických zložkách, sú tiež použiteľné na dobrú aktivitu biotransformácie zúčastneného substrátu. Tento sa pridá ku kultúre

vo východiskovom fermentačnom kroku, alebo vo frakčných alikvótnych častiach východiskových zo začatia fermentácie.

Biotransformácia podľa tohto vynálezu je založená na enzýmovej konverzii, ktorá vychádza v priebehu rastúcej exponenciálnej fázy a pokračuje s paralelnou progresiou k tomuto rastu; maximálne úrovne konverzie na 3-glykozylové deriváty (veľmi vysoké: nad 95 %) sa dosiahnu v priebehu prvých 48 až 72 hodín, čo záleží na dobe sčítania substrátov. Regioselektivita biotransformácie je úplná: ak nebola nikdy dokázaná prítomnosť 2-glykozylových derivátov vo vzorkách kultúr. Výsledné produkty sú výlučne mimobunkové.

Substrát, ktorý má byť transformovaný, sa môže pridať do acetónového alebo alkoholového roztoku, do zmesi alkoholu a vody, do dioxánu atď. Biotransformácia podľa tohto vynálezu sa môže odmerať na fermentačnej úrovni, udržiavaním nezmenených kultúrnych podmienok, obzvlášť sa to týka kultúrneho roztoku, teploty a doby spracovania. Na účely získania dobrých rastov, sú dôležité adekvátne úrovne prevzdušňovania miešaním, najmä úrovne prevzdušňovania 1 až 2 litre vzduchu na liter kultúry za minútu (vvm), výhodne sú požadované 1,5 až 2 vvm.

Produkty vyplývajúce z biokonverzie sú extrahované z tekutých roztokov kultúry po separácii biomasy z tekutej frakcie centrifugáciou a obnovou supernatantu, alebo mikrofiltráciou a obnovou permeátu. Kultúra sa môže upraviť s alkoholmi, s ohľadom na optimálnu obnovu produktu.

Čistenie a izolácia biotransformačných produktov sa môže uskutočniť použitím chromatografických techník na separáciu na absorpčné živice a elúciou s alkoholmi, výhodne s metanolom. Hydrometanolové roztoky obsahujúce tento produkt môžu byť ďalej čistené pomocou extrakcie s lipofilnými organickými rozpúšťadlami, výhodne s dichlórmetánom. Po ďalšej úprave so zmesami alkoholov a organických rozpúšťadiel, sa môže produkt získať v čistom stave z výsledných alkoholových roztokov kryštalizáciou. Glukóza môže byť nahradená inými cukrami, ako napríklad fruktózou alebo galaktózou, bez spôsobenia straty glykozyltransferázovej aktivity.

Nasledujúce príklady opisujú vynález v ďalších detailoch.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Alikvotné časti kultúr *Bacillus megaterium* izolovaných z poľnohospodárskych pôd, sa resuspendujú v 20 ml sterilného fyziologického roztoku, a podrobia skalárnemu zriedeniu na 1 : 10 000 000 zrieďovacieho faktora. Suspenzie v rôznych roztokoch sa nanášajú na platne s LB-Agarovým kultivačným médiom a s LB-Agarom spolu s tiokolchicónom alebo 3-demetyltiokolchicónom, až do finálnej koncentrácie 2 g/l (pozri tabuľku). Kultúry sa inkubujú pri 28 °C, počas 3 až 4 dní, v tme. Kolónie rastú na selekčnom prostriedku, pridané s kolchicónovou zlúčeninou, sa izolujú a čistia pomocou umiestnenia na neselekčnom prostriedku, uvedené vzorky sa inkubujú tak, ako je uvedené, ale počas kratšieho času (24 hodín).

Následne sa kultúry prenesú do rovnakého agarového prostriedku, do skúmavky a inkubujú tak, ako bolo uvedené počas 24 hodín.

Alikvotné časti kultúr, vybrané, ako bolo uvedené, sa použijú na naočkovanie 100ml Erlenmeyerovej banky, obsahujúcej 20 ml kultúrneho prostriedku ST (pozri tabuľku), pridané s tiokolchicónom alebo 3-demetyltiokolchicónom, až do 0,4 mg/ml finálnej koncentrácie. Uvedené kultúry sa inkubovali cez noc pri 28 °C, na rotačnej trepačke, pri 200 otáčkach/minútu.

Transformácia kolchicónových substrátov sa kontroluje analýzami alikvotných častí tekutých roztokov kultúr, zobratých každé 3 až 4 hodiny, pri TLC na silikagéli, s acetónom : octanom etylnatom : vodou 5 :4 : 1 premývací systém.

Po 4 dňoch inkubácie, sa alikvotné časti kultúr, ktoré preukázali zjavnú katalytickú aktivitu na 3-glykozylové deriváty, regenerujú na platniach, pomocou skalárneho zrieďovania tak, ako bolo opísané, na prípravu nového inokula v skúmavke. Biotransformačná skúška v banke sa opakuje v rovnakých podmienkach, ako bolo uvedené, ale použitím zjavne vyšších konečných koncentrácií tiokolchicónu a 3-demetyltiokolchicónu (1 mg/ml). Navyše aktívne jednoduché kultúry (substrátová konverzia podobná alebo vyššia než 70 %) sa použijú na prípravu inokúl v zmrazených skúmavkách (cryotubách).

Tabuľka

Zloženie kultivačného média

1) LB-Agar	
Triptón	10 g/l
Kvasinkové výťažky	5 g/l
NaCl	10 g/l
Agar-agar	15 g/l
pH 7	
Sterilizácia: 121 °C x 20'	

2) Živná pôda	
Glukóza	20 g/l
Glycerín	10 g/l
Peptón	15 g/l
Kvasinkové výťažky	5 g/l
NaCl	3 g/l
NH_4Cl	3 g/l
K_2HPO_4	8 g/l
KH_2PO_4	3 g/l
$MgSO_4 . 7H_2O$	0,5 g/l
pH 7	
Sterilizácia: 121 °C x 20'	

Príklad 2

Opakuje sa postup opísaný v príklade 1, vychádzajúc z kultúr *Bacillus megaterium*, odvodených z nasledovných zbierkových kmeňov (Deutsche Sammlung vom Mikroorganismen, Braunschweig, Nemecko):

DSM 90,
DSM 322,
DSM 333,
DSM 1667,
DSM 1670,
DSM 1671.

Kultúry vybrané ako v príklade 1 a pridané k tiokolchicónu (1 mg/ml) sa inkubujú počas 4 dní v tekutej kultúre: TLC analýza zistí vyskytnutú transformáciu substrátu do tiokolchikozónu, s konverzným výťažkami meniacimi sa od 30 % do 70 %.

Príklad 3

Alikvótne časti vzoriek kultúr v skúmavke, vybraných, ako bolo opísané v uvedenom príklade, sa použijú na očkovanie 100 ml Erlenmeyerovej banky obsahujúcej 20 ml živnej pôdy ST.

Kultúry živnej pôdy sa inkubovali pri + 30 °C, na rotačnej trepačke pri 200 otáčkach/minútu, počas noci. Po inkubácii sa kultúry pridali s glycerínovým sterilným roztokom do 20 % finálnej koncentrácie. Kultúry sa potom rozptýlili v 2 ml cryotubách a okamžite sa ponorili do tekutého dusíka.

Po niekoľkých dňoch, sa 10 % kultúr rýchlo rozpustilo pri 37 °C. Alikvotné časti každej cryotuby sa použili na očkovanie 100 ml Erlenmeyerovej banky, obsahujúcej 20 ml prostriedku ST, ktorý sa následne inkuboval pri + 28 °C, cez noc (pred-kultúra), pri 200 otáčkach/minútu. Po inkubácii sa prenesú 2 ml každej pred-kultúry do 20 ml sterilného čerstvého prostriedku ST, pridal sa 3-demetyltiokolchicón, na 1 g/l finálnej koncentrácie. Biotransformácia sa uskutočňuje a skontroluje v podmienkach opísaných v príklade 1. Analýza potvrdila, že transformácia substrátu na 3-glykozylový derivát sa vyskytla v kvantitatívnych termínoch opísaných skôr (80 % a vyššie), teda poskytnutím katalytickej stability mrazenej kultúry.

Paralelné kontroly kultúr živnej pôdy, umiestnenej na LB agar okamžite po rozpustení, potvrdili životaschopnosť, homogenitu a čistotu mrazených kultúr.

Príklad 4

Alikvotné časti kultúr v cryotube, po rozpustení, sa použijú na očkovanie 300 ml Erlenmeyerovej banky obsahujúcej 50 ml prostriedku ST (pred-kultúry). Po inkubácii cez noc pri 30 °C, 250 otáčkach/minútu, sa prenesie 5 ml predkultúry do 50 ml rovnakého prostriedku pridaného s 3-demetyltiokolchicónom do 1 g/l finálnej koncentrácie. Kultúry sa inkubujú počas 4 dní, v rovnakých podmienkach, ako bolo opísané.

Každé 4 hodiny, sa vzorky zoberú na vyhodnotenie rastúcej úrovne (meranie absorbancie pri 600 nm), tiokolchicozónovej produkcie (TLC a HPLC), sterilnosti (na LB agar) a na mikroskopický morfologický prieskum.

TLC analýza sa uskutoční, ako je opísané v príklade 1. Na HPLC analýzu, 1 ml frakcií kultúr živnej pôdy sa pridajú s 9 ml metanolu a odstredia pri 13,000 otáčkach/minútu počas 2 minút. Obsah supernatantu v 3-glukozyl deriváte sa analyzuje obrátenou fázou HPLC, s izokratickou elúciou, pomocou voda : acetónitril 80 : 20 systémové elučné činidlo.

HPLC analýza dokazuje, že po 72 až 96 hodinách, sa biokonverzia substrátu na tiokolchicón značne dokončí.

Výsledný finálny výťažok na 3-glukozylový derivát, získaný biokonverziou, sa pohybuje od 70 % do 85 %.

Príklad 5

Opakuje sa postup opísaný v príklade 4, ale 3-demetyltiokolchicón sa pridá ku kultúram v dvoch častiach: 0,25 g/l pri začatí a 0,74 g/l po 24 hodinách.

Rastové a produkčné reakcie kultúr sú rovnaké ako tie získané v príklade 4, s tiokolchicozónovými výťažkami okolo 90 %.

Príklad 6

Jeden liter ST živnej pôdy v Erlenmeyerovej banke (inokulum) sa očkuje s cryotubnou kultúrou. Banky sa inkubujú cez noc pri 30 °C, 250 otáčkach/minútu. Inokulum sa prenesie do sterilného do 14l fermentora, obsahujúceho 9 l sterilnej živnej pôdy STL. Pridá sa 3-demetyltiokolchicón ku 1 g/l finálnej koncentrácie (25 % pri začatí, zvyšok po 20 hodinách). Fermentácia uskutočňuje udržanie vhodných úrovní miešacej aerácie (miešanie do 900 otáčko/minútu; aerácia 1 až 1,5 vvm, závislé od kultúry rastu).

Každé 2 hodiny sa zoberú vzorky z kultúr živnej pôdy a podrobia nasledujúcej analýze:

- optická hustota (OD) pri 600 nm,
- sterilná a čistiaca analýza kmeňov (na LB agar),
- mikroskopická morfológia (gram kmeň),
- analýza obsahu tiokolchicozónu, pomocou TLC a HPLC, ako bolo opísané v príklade 1 a 4, každý nezávisle.

Po približne 48 hodinách fermentácie, sa transformácia substrátu na tiokolchicozón takmer ukončí. Finálny výťažok je okolo 85 %.

Príklad 7

Opakuje sa postup opísaný v príklade 6, ale po 48 hodinách fermentácie, sa regeneruje len 90 % kultúry živnej pôdy, na extrahovanie produktu (frakcia 1). Zvyšok 10 % sa pridal sterilne do fermentora s 9 l čerstvého sterilného prostriedku ST obsahujúceho 10 g 3-demetyltiokolchicónu. Fermentácia sa uskutoční tak ako bolo opísané v príklade 6. Po 48 hodinách, sa nazbiera 9 l kultúr živnej pôdy a extrahuje (frakcia 2). Zvyšný objem kultúr živnej pôdy sa pridá sterilne s 9-krát viac l sterilného čerstvého prostriedku ST obsahujúceho čerstvý 3-demetyltiokolchicón (10 g). Fermentácia sa uskutoční tak, ako bolo uvedené. Po 48 hodinách sa kultúry živnej pôdy kompletne nazbierajú a extrahujú (frakcia 3). Biotransformačná aktivita kmeňov zostala stabilná pri všetkých troch testoch, s konverznými výťažkami okolo 80 %.

Príklad 8

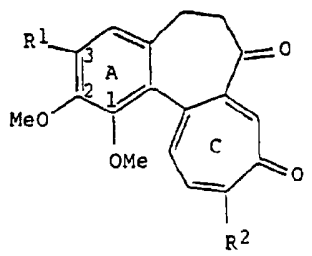
Finálne kultúry živnej pôdy z fermentácie (celkový objem: okolo 27 l) sa koncentrujú pod vákuom do jemného zvyšku a pokračuje s etanolom.

Po separácii filtráciou, sa voda-etanolová frakcia koncentruje do vody, pod vákuom a čistí opakovanou extrakciou s metylénchloridom. Vodné frakcie sa koncentrujú a po prispôsobení pH na 10 s hydroxidom sodným, extrahujú s chlórmetylén-etanolovými zmesami.

Spojené organické fázy sa koncentrujú pod vákuom. Výsledná suspenzia sa pridá k etanolu, koncentruje a nechá kryštalizovať. Druhá kryštalizácia s etanolom sa uskutoční po ďalšom kroku znovu rozpustenia hmoty v etanol-chloroformovej zmesi.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob prípravy 3-O-glykozylkolchicónových zlúčenín všeobecného vzorca (I)



(I),

kde

R^1 je glykozidový zvyšok, R^2 je C_{1-6}alkoxy alebo C_{1-6}tioalkyl,

vyznačujúci sa tým, že pozostáva z biotransformácie zlúčenín, v ktorých R^1 je OH alebo metoxyskupina pomocou *Bacillus megaterium*.

2. Spôsob prípravy zlúčenín vzorca (I), **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že R^1 je O-glykozidový zvyšok.

3. Spôsob podľa nárokov 1 a 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že kmene *Bacillus megaterium* sa vyberú na základe ich schopnosti rastu v prítomnosti vysokých koncentrácií kolchicónových substrátov, ktoré majú byť transformované.

4. Spôsob podľa nároku 3, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že koncentrácia je v rozmedzí od 0,1 do 3 g/l.

5. Spôsob podľa nárokov 1 až 4, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že *Bacillus megaterium* je kultivovaný v tuhom alebo kvapalnom médiu.

6. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že médium obsahuje aspoň jeden organický dusíkový zdroj.

7. Spôsob podľa nároku 6, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že organický dusíkový zdroj je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z mäsových extraktov, peptónov, tryptónov, kazeínových hydrolyzátov, kukuričných extraktov.

8. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že médium obsahuje aspoň jeden uhlíkový zdroj.

9. Spôsob podľa nároku 8, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že uhlíkový zdroj je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z glukózy, fruktózy, glycerolu.

10. Spôsob podľa nároku 5, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že médium obsahuje aspoň jeden zdroj anorganických solí K^+, Na^+, Mg^{++}, NH_4^+.

11. Spôsob podľa nárokov 1 až 10, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uskutočňuje pri pH v rozmedzí od 5 do 8.

12. Spôsob podľa nároku 11, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pH je v rozmedzí od 6 do 7.

13. Spôsob podľa nárokov 1 až 12, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uskutočňuje pri teplote v rozsahu od 20 °C do 45 °C.

14. Spôsob podľa nároku 13, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že teplota je v rozsahu od 28 °C do 40 °C.

15. Spôsob podľa nárokov 1 až 14, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že sa uskutočňuje pri maximálnej úrovni prevzdušňovania od 1 do 2 litrov vzduchu na liter kultúry za minútu.

16. Spôsob podľa nároku 15, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že úroveň prevzdušňovania je v rozsahu od 1,5 do 2 litrov vzduchu na liter kultúry za minútu.

Koniec dokumentu