

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.11.2010**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **03.08.2011**
(Věstník č. 31/2011)

(21) Číslo dokumentu:

2010-790

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12R 1/07 (2006.01)

C12P 17/16 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Zentiva, k.s., Praha 10 - Dolní Měcholupy, CZ

(72) Původce:

Babiak Peter, 08001 Prešov, SK

Hájíček Josef, Nehvizdy, CZ

Kyslíková Eva, Praha 10, CZ

Kyslík Pavel, Praha, CZ

(74) Zástupce:

Rott, Růžička & Guttman Patentové, známkové a
advokátní kanceláře, Ing. Jana Fuchsová, Vinohradská
37, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Kmen mikroorganismu Bacillus sp. B71
CCM 7718**

(57) Anotace:

Předložené řešení spočívá v cílené přípravě a izolaci kmenem mikroorganismu Bacillus sp. B71 CCM 7718, využitelného zejména pro oxidaci vybraných sulfidů na sulfoxidy s vysokou enantioselektivitou bez následné oxidace sulfoxidů na sulfony a způsobu přípravy biomasy mikroorganismu použitelné pro zmíněné biotransformace. Mikroorganismus je využitelný k přípravě enantiomerně čistého esomeprazolu.

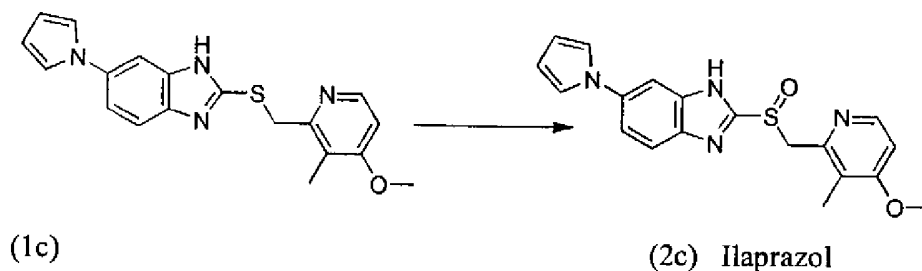
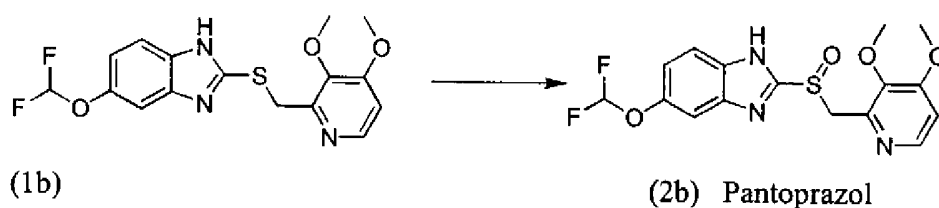
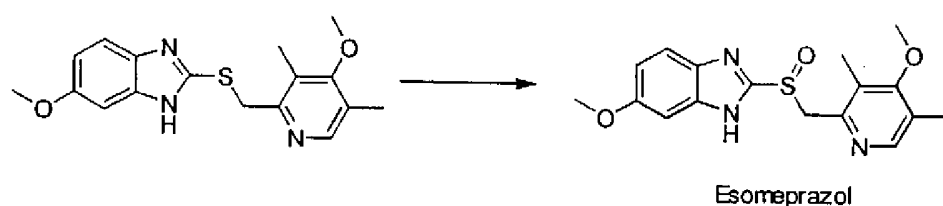
Kmen mikroorganismu *Bacillus* sp. B71 CCM 7718

202010-490

18422

Oblast techniky

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Bacillus* sp. B71 CCM 7718 oxidujícího sulfid 1a na sulfoxid 2a bez následné oxidace sulfoxidu na sulfon. Mikroorganismus podle vynálezu poskytuje při této oxidaci S-enantiomer se stoprocentní stereoselektivitou. S- enantiomer omeprazolu 2a je účinnou léčivou látkou zvanou esomeprazol.



Dosavadní stav techniky

Omeprazol patří do skupiny léků tzv. inhibitory protonové pumpy a poprvé byl popsán v EP-A-0 005 129. Inhibitory protonové pumpy jsou přípravky určené k léčbě acidopeptických onemocnění. Mezi tato onemocnění patří refluxní choroba jícnu, vředová choroba gastroduodenální (*Helicobacter* pozitivní), gastropatie z nesteroidních antiflogistik, vředy endokrinního původu, stresové vředy a hemoragická gastropatie. Inhibitory protonové pumpy

jsou přípravky bezpečné, s minimem interakcí. (Jirásek,V. Acidopeptická onemocnění – hlavní indikace pro inhibitory protonové pumpy. Interní Med., 2008, 6). Omeprazol je racemátem R- a S- enantiomerů, přičemž aktivní formou je pouze S-enantiomer. Poprvé byl uveden ve formě racemátu na trh v USA v roce 1989 firmou AstraZeneca jako magnezium sůl pod názvem Losec a Prilosec. V současné době tato firma vyrábí lékovou formu na bázi S-enantiomeru. Příprava chirálně čistého S-enantiomeru omeprazolu asymetrickou oxidací prochirálního sulfidu (1a) za použití oxidačního činidla a chirálního komplexu titanu je popsána v WO-A-96/02535.

Chemická příprava neracemického S-omeprazolu z racemické směsi krystalizací pomocí esteru kyseliny mandlové je popsána v WO-A-94/27988 a krystalizací pomocí inkluzních komplexů s cyklodextriny v WO-A-02/098423.

Biokonverze prekurzorů prazolů na prazoly byla popsána v WO-A-96/17077.

Dále bylo identifikováno několik mikroorganismů se schopností oxidovat sulfidy 1 na sulfoxidy 2 v US 5 840 552A.

Doposud nebyla popsána schopnost oxidovat sulfidy 1 na sulfoxidy 2 kmeny mikroorganismů rodu *Bacillus*.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen mikroorganismu *Bacillus* sp. B71 CCM 7718 schopný oxidovat sulfid 1a na sulfoxid 2a. Předmětem vynálezu je také postup kultivace uvedeného kmene a jeho použití pro biotransformaci prekurzorů prazolů 1a, 1b a 1c na prazoly 2a, 2b a 2c. Výhodné vlastnosti kmene spočívají ve stereoselektivitě enzymu účastnícího se biotransformace (100% tvorba S-enantiomeru) a nulovém rozsahu následné oxidace S-enantiomeru na sulfon.

Podrobný popis vynálezu

Kmen *Bacillus* sp. B71 CCM 7718 byl získán rozsáhlým screeningem více než 1000 sbírkových a z přírody izolovaných kmenů nejrozličnějších rodů (kvasinky, plísňe a bakterie) a následnou chemickou mutagenezí.

Nejprve bylo získáno 127 bakteriálních kmenů se schopností transformovat sulfid 1a na sulfoxid, avšak pouze 5 kmenů transformovalo sulfid na sulfoxid s převahou S-formy. Izolát

s nejvyšší konverzí sulfidu 1a na sulfoxid 2a a současně neoxidující produkt 2a na sulfon, získaný ze zeminy dlouhodobě kontaminované sírou, byl označen jako izolát B07. Byla provedena chemická mutageneze tohoto izolátu a mutant vykazující 100% S-enantioselektivitu byl taxonomicky zařazen jako *Bacillus* sp. a označen jako kmen B71. Předmětný bakteriální kmen systematicky nepatří mezi popsané kmeny oxidující sulfid 1a na sulfoxid 2a.

Nový kmen, který je předmětem tohoto vynálezu, je uložen v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) Masarykovy University v Brně, Tvrdého 14, pod označením CCM 7718. Vlastnosti kmene určené při jeho klasifikaci a ukládání ve sbírce CCM, Brno, jsou uvedeny v Tab. 1.

Mutant B71 byl kultivován v třepaných baňkách na mediu LB o pH 7 – 7,2 a složení (v g.l⁻¹): trypton 10, kvasničný extrakt 5, NaCl 10 doplněném sulfidem 1a v koncentracích 0,1 – 0,5 g/l, při teplotě 25 – 35 °C, pH během kultivace drženo v rozmezí 6 – 10. Byly vybrány optimální kultivační podmínky, za kterých byl kmen kultivován v míchaném bioreaktoru. Kultivace v bioreaktoru probíhaly za následujících podmínek: přítokovaná kultivace s automatickou regulací pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku (udržováno přidáváním 3M vodného roztoku KOH a regulací vzdušnění), kde přidávaný roztok obsahoval živiny nebo kombinaci živin a sulfidu 1a.

Během kultivace byl sledován stupeň konverze a enantiomerní nadbytek (ee) S-enantiomeru analýzou odebraných vzorků kultury: vzorky byly smíchány s etylacetátem (EA) a látky 1a a 2a byly extrahovány třepáním 15 min při teplotě 28 °C. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byla stanovena konverze látky 1a na 2a a enantioselektivita biotransformace.

Dalším testováním bylo zjištěno přijatelné rozmezí podmínek vhodných jak pro jednorázovou, tak pro přítokovanou kultivaci kmene podle vynálezu: teplota 15 – 35 °C, pH v rozsahu 3 – 10 (nastavováno 0,2M citrátovým pufrům v rozmezí pH 3 až 6; 0,2M fosfátovým pufrům pro pH 7 – 8; 0,2M tris pufrům pro pH 9 – 10), při frekvenci míchání zahájené na 300 ot/min a upravované během kultivace na 200 – 840 ot/min, pro zajištění 2 – 60 % maximálního nasycení média kyslíkem, po dobu 12 – 48 hodin.

Tab. 1 – Charakteristika kmene *Bacillus* sp.B 71 CCM 7718

A. Morfologie (mikroskopie)	
Tvar buněk	tyčinky, nepravidelný tvar, po dvou
Spóry	spóry oválné, zduřující buňku, umístěné centrálně
Gram-barvení	pozitivní
B. Morfologie kolonií na TSA agaru	
C. Růstové podmínky	
Teplota	Roste dobře při 28 – 35 °C, roste i při 37 °C
pH	6,0-10,0
Vztah ke kyslíku	aerobní
Růst v přítomnosti 10,0% NaCl	negativní
D. Fyziologická charakteristika	
Hydrolyza škrobu	negativní
Hydrolyza kaseinu	negativní
Hydrolyza eskulinu	negativní
Hydrolyza tyrozinu	negativní
Hydrolyza o-nitrofenyl- β -D-galaktozidu	negativní
Hydrolyza lecithinu	negativní
Hydrolyza želatiny	pozitivní
Hydrolyza Tweenu 80	pozitivní
Hydrolyza DNA	pozitivní
Redukce nitrátů	negativní
Kyselina z glukózy	negativní
Kyselina z xylózy	negativní
Kyselina z manitolu	negativní
Kyselina z celociózy	negativní
Kyselina z laktózy	negativní
Kyselina z fruktózy	negativní
Kyselina z inozitolu	negativní
Růst na Simons citrátu	negativní
Ureáza	negativní
Kataláza	pozitivní
Oxidáza	pozitivní
Arginin dihydroláza	negativní
Hemolýza	negativní
Utilizace etanolu, metanolu	negativní
Utilizace aminokyselin	pozitivní

Ze schopnosti kmene CCM 7718, který je předmětem vynálezu, oxidovat sulfid 1a na sulfoxid 2a se stoprocentní (S)-enantioselektivitou při úplné absenci následné oxidace sulfoxidu na sulfon vyplývá reálný předpoklad využití předmětného kmene pro výrobu omeprazolu ve farmaceutickém průmyslu.

Aniž by se jimi jeho rozsah omezoval, je vynález v následujících příkladech detailně ilustrován popisem způsobu získání kmene *B. sp* B71 CCM 7718 a způsobu jeho kultivace, zaměřené na biotransformační aktivitu vybraných sulfidů na sulfoxidy.

Přehled obrázků

Obr. 1 Časový průběh koncentrace biomasy (X - ■) a biotransformační aktivity (konverze - ♦) v jednorázové kultuře kmene B71 CCM7718 v třepané baňce při kultivační teplotě 30°C v LB mediu dle příkladu 2.

Obr. 2 Časový průběh koncentrace biomasy (X - ■) a biotransformační aktivity (konverze - ♦) v přítokované kultuře (fed batch) kmene B71 CCM7718 v míchaném bioreaktoru při kultivační teplotě 30 °C v LB mediu dle příkladu 4.

Obr. 3 Časový průběh nárůstu biomasy (X- ■) a množství vzniklého produktu (produkt - ♦) v přítokované kultuře (double fed-batch) kmene B71 CCM7718 v míchaném bioreaktoru při kultivační teplotě 30 °C v LB mediu dle příkladu 5.

Příklady provedení

Příklad 1

*Izolace kmene *Bacillus sp.* B07 a jeho chemická mutagenéza*

Kmen *Bacillus sp.* B07 byl získán ze zeminy dlouhodobě kontaminované sírou. Vzhledem k nízkému mikrobiálnímu osídlení zeminy, byla autochtonní mikroflora pomnožena kultivací. 10 g zeminy bylo resuspendováno ve 100 ml LB média a třepáno 72 h při 28 °C na rotační třepačce (200 ot.min⁻¹). Takto pomnožená autochtonní mikroflora byla příslušně naředěna ve fyziologickém roztoku a vyseta na LB agar (trypton 10, kvasničný extrakt 5, NaCl 10 a agar 24 g .l⁻¹). Jednotlivé morfologicky odlišné kolonie izolátů, narostlé za 3 dny při 28 °C, byly přeočkovány na čerstvý LB agar a po nárůstu při 28°C byla u nich stanovena schopnost oxidovat sulfid na sulfoxid následujícím způsobem: 2 ml LB média v 12 jamkových kultivačních destičkách (mtwp) byly inokulovány příslušným izolátem a po 24 h kultivace (28 °C a 200 ot.min⁻¹) byl přidán substrát 1a v koncentraci 0,1 g.l⁻¹ a tím zahájen proces biotransformace. Po 24 h biotransformace (28 °C a 200 ot.min⁻¹) bylo k 1 ml vzorku přidáno 0,5 ml EA a kultivační kapalina byla extrahována po dobu 15 min. Po odstředění (15 min,

10 000 ot.min⁻¹) byla organická fáze použita pro kvalitativní stanovení sulfidu, sulfoxidu a sulfonu pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC):

TLC s indikátorem 245nm Whatman

eluční směs: chloroform : methanol : amoniak (90:9:1 V/V)

rf 1a = 8,3

rf 1b = 6,3

Stejným způsobem byly testovány izoláty získané z jiných přírodních lokalit i sbírkové kmeny. U mikroorganismů, kdy byla na TLC detekována přítomnost sulfoxidu, byla konverze dále kvantifikována na HPLC a stanovena ee sulfoxidu za následujících podmínek:

Kolona: Chiralpack AD 250x4,6 mm

Eluční směs: hexan: etanol (1:1 V/V) + 0,05% Et₃N

Průtok: 1,0mL/min

Nanášený objem 0,02mL

Detekce při vlnové délce 302nm

Retenční časy:

Látka 1a 5,1 min, Látka 2a enantiomer (S) 8,3 min, enantiomer (R) 12,4 min

Látka 1b 5,14 min, Látka 2b enantiomer A 7,21 min, enantiomer B 7,89 min

Z testovaných izolátů byly vybrány kmeny s nejvyšší konverzí sulfidu 1a na sulfoxid 2a, s nejvyšším ee S-formy 2a a absencí tvorby sulfonu. Ze 127 bakteriálních izolátů, které vykazovaly vysokou biotransformaci sulfidu 1a na sulfoxid 2a, pouze 5 mělo převahu (S) enantiomeru.

Těchto 5 vybraných kmenů bylo dále kultivováno v 50 ml LB media v 500 ml kultivačních baňkách následujícím způsobem: medium bylo inokulováno danými kmeny narostlými na LB agaru a baňky byly inkubovány na rotačním třepacím stroji (200 ot.min⁻¹, 28 – 30 °C) po dobu 24 h (první vegetativní generace). 2 ml narostlé kultury byly použity pro inokulaci třech paralelních baňek s 50 ml půdy stejného složení (druhá vegetativní generace), které byly kultivovány za stejných podmínek. Ve 24. h kultivace byl do kultivační kapaliny přidán sulfid 1a v koncentraci 0,1 g.l⁻¹. Po 24 h biotransformace (28 °C a 200 ot.min⁻¹) byl vzorek kultury extrahován EA (15 min) a po odstředění (15 min, 10 000 ot.min⁻¹) byla organická fáze použita pro kvantitativní stanovení biokonverze pomocí HPLC (viz výše). Ze série 5 kmenů byl vybrán přírodní izolát ze vzorku zeminy kontaminované sírou, který vykazoval konverzi 36 %, ee 78 % (S) a neoxidoval sulfoxid na sulfon. Kmen byl označen jako B07.

Mutagenese:

Byla připravena první a druhá vegetativní generace kmene B07 jak je uvedeno výše, s tím rozdílem, že z kultury druhé generace byl v 15. h kultivace (exponenciální fáze růstu) asepticky odebrán vzorek a oddělena biomasa centrifugací. Biomasa byla promyta a resuspendována do stejného objemu 0,1 M fosfátového pufru pH 7,0. Tato suspenze buněk byla přidána k roztoku N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu v 0,1 M fosfátovém pufru tak, aby výsledná směs obsahovala cca 10^7 až 10^8 buněk a 150 μg uvedeného mutagenu na 1 ml směsi. Tato směs byla míchána 60 min při 28 °C a vyseta na LB půdu doplněnou agarem. Po inkubaci misek při 28 °C po dobu 48 h bylo získáno 600 monokoloniových izolátů, u kterých byla testována schopnost oxidace sulfidu 1a na sulfoxid 2a ve 12 jamkových mtwp stejným způsobem jako při screeningu. Tímto způsobem byl získán bakteriální izolát, označený B71, který vykazoval 45% konverzi sulfidu 1a na sulfoxid 2a s ee 100% (S) a nulovou oxidací sulfoxidu 2a na sulfon. Kmen byl taxonomicky zařazen jako *Bacillus* sp. B71 a deponován ve sbírce mikroorganismů pod číslem CCM7718.

Příklad 2

Jednorázová kultivace Bacillus sp. B71 CCM 7718

Jednorázové kultivace probíhaly v 500 ml kultivačních baňkách se 100 ml LB media (pH 7,0) na reciprokém třepacím stroji (200 ot.min^{-1} , 30°C). pH kultivační kapaliny v průběhu kultivace nebylo upravováno. Kultivační media byla inokulována 2% kulturou 1. vegetativní generace (viz. příklad 1).

Časový průběh koncentrace biomasy (suchá hmotnost - X) a schopnost buněk oxidovat sulfid 1a (% konverze) jsou uvedeny v obr. 1: v časových intervalech byly odebírány 2 ml vzorky kultivační kapaliny a přeneseny do 12 jamkových mtwp. Dále bylo postupováno podle příkladu 1 (druhá vegetativní generace): do vzorku kultury byl přidán sulfid 1a v koncentraci 0,1 g.l^{-1} a po 24 h biotransformace bylo kvantitativně detekováno procento konverze látky 1a na 2a. Z průběhu grafu je zřejmé, že nejvyšší schopnost biokonverze (70%) vykazuje kultura v průběhu exponenciální fáze růstu, tzn. od 8. do 15. h kultivace. Poté dochází k prudkému poklesu biokonverzní aktivity kultury.

Příklad 3

Jednorázová kultivace Bacillus sp. B71 CCM 7718 v přítomnosti sulfidu 1a v koncentraci 0,1 g.l^{-1}

Jednorázová kultivace proběhla za stejných podmínek jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že v 0. h kultivace byl do půdy přidán sulfid 1a v koncentraci $0,1 \text{ g.l}^{-1}$. Maximální hodnoty biokonverze (55%) bylo dosaženo až ve 44 h kultivace, s ee 100% (S), kdy kultura byla ve stacionární fázi růstu.

Příklad 4

Přítokovaná (fed-batch, 5% roztok kvasničného extraktu-YE) kultivace Bacillus sp.B71 CCM 7718 v bioreaktoru

Přítokovaná kultivace probíhala v míchaném bioreaktoru Biostat MD: pracovní objem 3 l, vzdušnění $3 \text{ l vzduchu.min}^{-1}$, počáteční frekvence míchání $300 \text{ otáček.min}^{-1}$, při teplotě 30°C . LB medium obsahující sulfid 1a v koncentraci $0,1 \text{ g.l}^{-1}$ bylo inokulováno 5% kulturou druhé generace (viz příklad 1) s tím rozdílem, že kultivační medium pro přípravu druhé generace kultury bylo od počátku kultivace doplněno sulfidem 1a v koncentraci $0,1 \text{ g.l}^{-1}$. pH media bylo regulováno od 4.h kultivace (pH 7,8). Po počátečním poklesu koncentrace rozpuštěného kyslíku v mediu na 30% byl spuštěn přítok 5% roztoku kvasničného extraktu a byly udržovány konstantní otáčky míchadla. Režimem feedování byla udržována koncentrace rozpuštěného kyslíku (pO_2) v rozmezí 25 – 35 % hodnoty maximálního nasycení media kyslíkem. V průběhu kultivace v bioreaktoru byly v pravidelných časových intervalech odebírány vzorky kultury a stanoveny následující parametry: koncentrace biomasy (suchá hmotnost buněk, cdw), konverze sulfidu 1a na sulfoxid 2a (%) a ee sulfoxidu 2a. Obr. 2 uvádí časový průběh koncentrace biomasy a biotransformační aktivity. Za tohoto režimu kultivace bylo po 16 hodinách dosaženo konečné koncentrace biomasy $7,8 \text{ g.l}^{-1}(\text{cdw})$, konverze 76,3% a ee (S) 100 %.

Příklad 5

Přítokovaná (double fed-batch, 5% roztok YE a $0,3 \text{ g.l}^{-1}$ sulfidu 1a) kultivace Bacillus sp.B71 CCM 7718 v bioreaktoru

Přítokovaná kultivace probíhala za stejných podmínek jako v příkladu 4 s tím rozdílem, že byla přidávána směs obsahující navíc sulfid 1a v koncentraci $0,3 \text{ g.l}^{-1}$. Obr. 3 uvádí časový průběh nárůstu biomasy a tvorby produktu. Od 14.h do 22.h kultivace byl dočasně zastaven přítok příkrmovacího roztoku, čemuž odpovídá zastavení nárůstu biomasy i tvorby produktu. Po té bylo příkrmování obnoveno. Za tohoto režimu kultivace bylo po 36 hodinách dosaženo konečného množství biomasy 71 g (suché hmotnosti) a množství produktu 2a 0,65 g.

Biotransformace substrátu 1a souvisí s růstem mikroorganismu *Bacillus sp.B71 CCM 7718* a závisí na rychlosti růstu kultury.

Příklad 6

Jednorázová kultivace Bacillus sp.B71 CCM 7718 v přítomnosti sulfidu 1b

Jednorázová kultivace proběhla za stejných podmínek jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že v 0. h kultivace byl do půdy přidán sulfid 1b. Po 44 h biotransformace byla hodnota konverze na sulfid 2b 8% a ee 100% (enantiomer A).

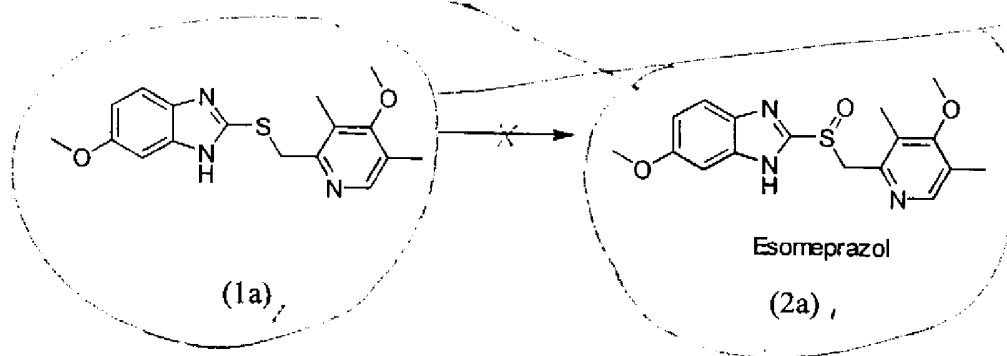
Příklad 7

Jednorázová kultivace Bacillus sp.B71 CCM 7718 v přítomnosti sulfidu 1c

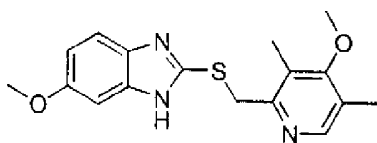
Jednorázová kultivace proběhla za stejných podmínek jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že v 0. h kultivace byl do půdy přidán sulfid 1c. Po 44 h biotransformace byla hodnota konverze na sulfid 2c 8% (enantiomer A).

Patentové nároky

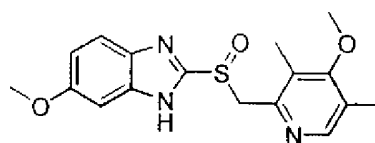
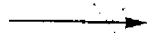
1. Kmen mikroorganismu *Bacillus* sp. B71 CCM 7718, schopný transformovat sulfid 1a na S-omeprazol 2a se stoprocentním enantiomerním nadbytkem bez následné oxidace sulfoxidu na sulfon.



2. Způsob přípravy biomasy kmene *Bacillus* sp. B71 CCM7718 podle nároku 1 vyznačující se tím, že mikroorganismus je kultivován v jednorázové kultivaci při teplotě $15 \div 35$ °C, pH v rozsahu $3 \div 10$, při frekvenci míchání zahájené na 300 ot/min a upravované během kultivace na $200 \div 840$ ot/min, pro zajištění $2 \div 60$ % maximálního nasycení média kyslíkem, po dobu $12 \div 48$ hodin.
3. Způsob přípravy biomasy kmene *Bacillus* sp. B71 CCM7718 podle nároku 1 vyznačující se tím, že mikroorganismus je kultivován v přítokované kultivaci při teplotě $15 \div 35$ °C, pH v rozsahu $3 \div 10$, při frekvenci míchání zahájené na 300 ot/min a upravované během kultivace na $200 \div 840$ ot/min, pro zajištění $2 \div 60$ % maximálního nasycení média kyslíkem, po dobu $12 \div 48$ hodin a přidávaný roztok obsahuje směs aminokyselin.
4. Způsob přípravy kmene *Bacillus* sp. B71 CCM7718 podle nároku 3 vyznačující se tím, že přidávaný roztok je doplněn sulfidem 1a v koncentraci $0,1 \div 5$ mg/ml.
5. Použití kultury kmene dle nároku 1 pro biotransformace sulfidů 1a, 1b a 1c na sulfoxidy 2a, 2b a 2c.

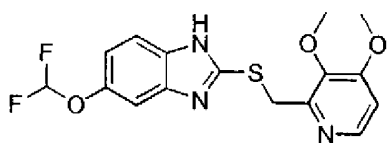


(1a)

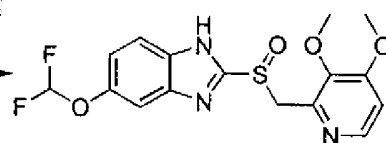
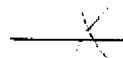


Esomeprazol

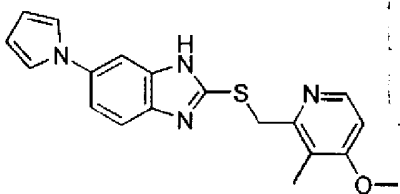
(2a)



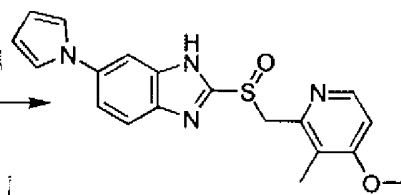
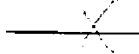
(1b)



(2b)



(1c)



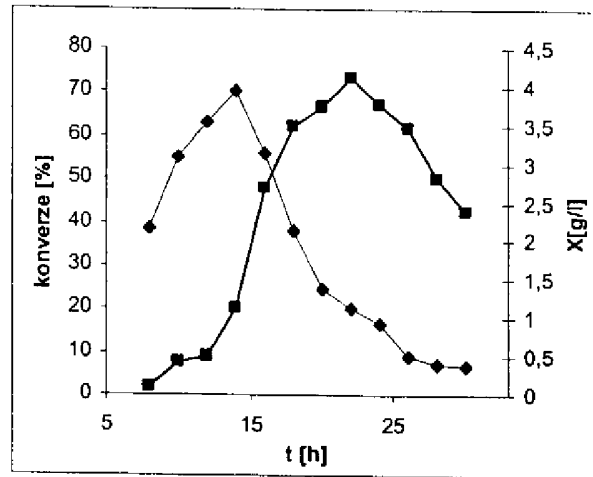
(2c)

01.11.1

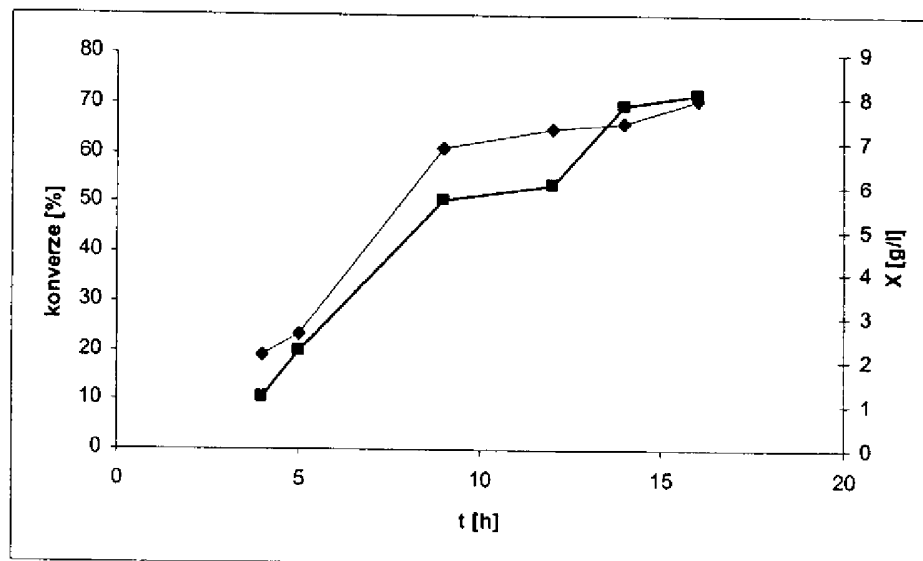
PV2010-490

16422

1/2

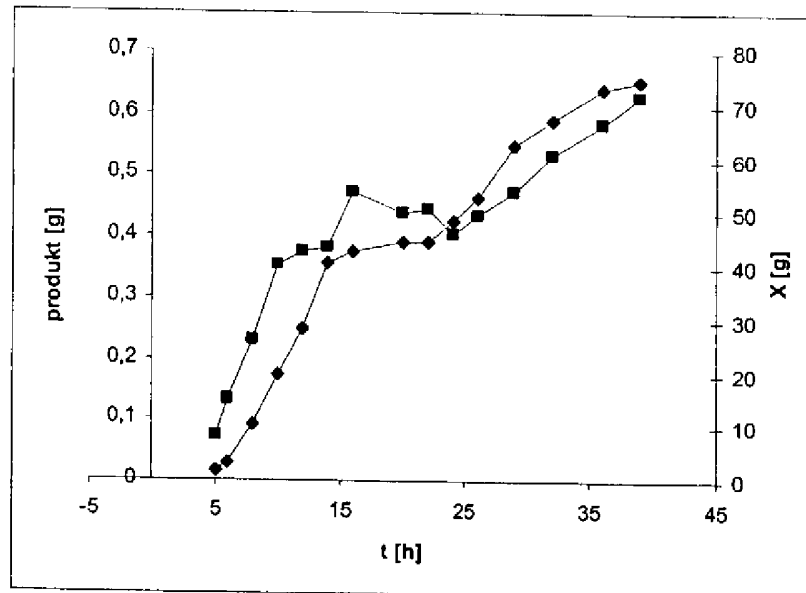


OBR. 1



OBR. 2

2/2



OBR. 3