



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 95 00090

(22) A bejelentés napja: 1995. 01. 12.

(30) Elsőbbségi adatok:

08/181,633 1994. 01. 13. US

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

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2000. 01. 28.

(11) Lajstromszám:

217 423 B

(51) Int. Cl.⁷

C 12 P 17/02

C 12 N 9/24

C 12 P 19/60

C 12 Q 1/34

(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) Szabadalmas:

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

(74) Képviseelő:

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

(54)

Eljárás 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxánok enzimes hidrolízissel történő előállítására, a hidrolízisre képes mikroorganizmusok és eljárás a kiválasztásukra

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó taxánok enzimes hidrolízissel történő előállítására, eljárás a hidrolízis végrehajtására képes mikroorganizmusok szelektálására, valamint a hidrolízishez előnyösen alkalmazható mikroorganizmusok biológiai-
lag tiszta tenyésztése.

A találmány szerint az enzimes hidrolízist úgy végzik, hogy egy, a 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó

cukorcsoportot tartalmazó taxánt egy, az említett cukorcsoporthoz hidroxicsoporthá történő hidrolízisét katalizálni képes mikroorganizmussal vagy az említett mikroorganizmusból származó enzimmel érintkezésbe hozzák, és a hidrolízist végrehajtják.

A találmány szerinti eljárással előállított taxánok rákellenes szerként hatásosak, vagy ilyen hatású vegyületek előállításához intermediereként felhasználhatók.

HU 217 423 B

A találmány tárgya eljárás 7-helyzetben cukorcsoporthoz, különösen xilozilcsoporthoz tartalmazó taxánok enzim hidrolízissel való átalakítására 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó származékokká. Az így kapott vegyületek lehetnek farmakológiailag hatásos taxánok – mint például a paclitaxel és analógjai –, vagy köz-benső termékként felhasználhatók farmakológiailag hatásos taxánok előállítására.

A taxánok a gyógyszeriparban használatos diterpének. Például az (A) általános képletű taxánok közé tartozó paclitaxelről (Taxol®) – amelynek képletében Ph jelentése fenilcsoport, Ac jelentése acetyl-csoport és Bz jelentése benzoilcsoport – kimutatták, hogy rákellenes szerként hatásos.

A természetben előforduló taxánok – például a paclitaxel – megtalálhatók növényi anyagokban, és azokból izolálhatók. Ezek a taxánok azonban sokszor csak viszonylag kis mennyiségben vannak jelen a növényi anyagokban, így például a paclitaxel esetében a vegyület egyik forrásul szolgáló, lassan növekvő tiszafából igen sok lenne szükséges. Ezért a szakmában tovább folynak a kutatások a természetben előforduló taxánok – például a paclitaxel – szintetikus vagy félig szintetikus előállítására, valamint az ilyen vegyületek szintetikus analógjainak előállítására.

Mind farmakológiailag hatásos végtermékként (mint a paclitaxel), mind pedig más, farmakológiailag hatásos vegyületek (például a baccatin III vagy 10-dezacetil baccatin III) félig szintetikus előállításának köz-benső termékeként különösen fontosak az olyan taxánok, amelyek 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmaznak. Viszont a növényi anyagokból például extrakcióval kinyerhető taxánok 7-helyzetben hidroxicsoporthoz helyett például egy glikozidkötéssel kapcsolódó xilozilcsoporthoz tartalmaznak. Ezért a fenti előnyös, hidroxicsoporthoz tartalmazó vegyületek előállításához jól használhatók az olyan módszerek, amelyekkel 7-helyzetben cukor-, különösen xilozilcsoporthoz tartalmazó taxánok 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó származékokká alakíthatók át.

A találmány tárgya eljárás 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó taxánok előállítására a megfelelő, 7-helyzetben cukor-, különösen xilozilcsoporthoz tartalmazó taxánokból kiindulva. A találmány tárgya közelebbről eljárás legalább egy, a 7-es szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporthoz tartalmazó taxánt előállítására, amely abból áll, hogy legalább egy olyan taxánt, amely a 7-es szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó cukorcsoporthoz tartalmaz, egy olyan mikroorganizmussal vagy ebből származó enzimmal hozunk érintkezésbe, amely képes arra, hogy ennek a cukorcsoporthoz tartalmazó hidroxicsoporthoz történő hidrolízist katalizálja, és a hidrolízist végrehajtsuk.

A találmány szerinti eljárás hatásos módszer 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó taxánoknak 7-helyzetben cukorcsoporthoz tartalmazó taxánokból történő előállítására. Ezt a módszert felhasználhatjuk egyetlen taxán hidrolízisére vagy különböző taxánok keverékének egymás utáni vagy egyidejű hidrolízisére. Az eljárás egyik előnyös megvalósításában taxánoknak pél-

dául növényi anyagokból extrakcióval kinyerhető keverékét hidrolizáljuk. Ebben a kiindulási anyagként használt keverékben a 7-helyzetben cukorcsoporthoz tartalmazó, hidrolizálendő taxán(ok) mellett olyan taxánok is lehetnek jelen, amelyek a C-7 helyen cukorcsoporthoz eltérő, például hidroxicsoporthoz tartalmaznak.

A találmány egyik előnyös megvalósítása eljárás legalább egy, 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó (I) általános képletű taxánt

10 – amely képletben

R¹ jelentése hidroxil- vagy acil-oxi-csoport, különösen egy (III) általános képletű csoport, ahol

R⁶ és R⁷ jelentése egymástól függetlenül alkil-, alkoxil-, alkenil-, alkenil-oxil-, alkinil-, alkinil-oxil-, cikloalkil-, cikloalkoxil-, cikloalkenil-, cikloalkenil-oxil-, aril-, aril-oxil-, heterociklusos vagy heterociklo-oxil-csoport; és

R⁸ jelentése hidrogénatom, alkoxil-karbonil-csoport vagy egy hidroxil-védőcsoport;

20 R² jelentése acil-oxil-, különösen alkil-karbonil-oxil-csoport vagy hidroxicsoporthoz; és

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

25 vagy sőt előállítására, ami abból áll, hogy legalább egy, 7-helyzetben cukorcsoporthoz tartalmazó (II) általános képletű taxánt

– amely képletben

30 R¹, R², R³ és R⁴ jelentése a fenti; és a

„cukor” jelentése egy, a 7-es szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó cukorcsoporthoz –

vagy sőt érintkezésbe hozzuk egy olyan mikroorganizmussal vagy ebből származó enzimmal, amely képes arra, hogy a 7-helyzetű cukorcsoporthoz tartalmazó hidroxicsoporthoz történő hidrolizálását katalizálja, és a hidrolízist végrehajtsa.

A találmány oltalmi köre az (I) és (II) általános képletű vegyületek nem specifikált királis centrumainak minden sztereokonfigurációjára kiterjed, akár önmagában van a vegyület (vagyis más sztereoizomereket gyakorlatilag nem tartalmaz), akár más sztereoizomerekkel keverve van jelen.

A találmány szerinti eljárás különösen jól használható akkor, ha taxánok keverékéből indulunk ki – például növényi anyagok extrakciója esetén, ahol a paclitaxelt más taxánokkal keverten kapjuk meg, amelyek közül egy vagy több a 7-helyzetben egy cukorcsoporthoz tartalmaz –, és egy 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartalmazó taxánt, például paclitaxelt akarunk előállítani.

A találmány szerinti eljárás során a kiindulási anyagként használt taxán 7-helyzetű csoportjának sztereokonfigurációja a végtermékben előnyösen változatlan marad. A 7-helyzetű szubsztituens abszolút sztereokonfigurációja előnyösen azonos a paclitaxel 7-helyzetű hidroxicsoporthoz tartalmazó konfigurációjával.

A leírásban az „enzimes eljárás” vagy „enzimes módszer” kifejezés olyan, a találmány szerinti eljárást vagy módszert jelent, amelyben egy mikroorganizmust vagy ebből származó enzimet alkalmazunk. A „hidroliz-

zis” a leírásban egy cukorcsoporthoz hidroxicsoporthoz való átalakítását jelenti, amit a találmány szerint például úgy érthetünk el, hogy a hidrolizálendő anyagot vízzel és/vagy egy alkalmas alkohollal hozzuk érintkezésbe. Az, hogy a találmány szerinti eljárásban „egy mikroorganizmust vagy ebből származó enzimet alkalmazunk”, nemcsak egyetlen, hanem két vagy több mikroorganizmus vagy enzim alkalmazását is jelentheti.

A „cukor” kifejezés mono-, di-, oligo- vagy poliszacharidokat, különösen ötös vagy hatos gyűrűt tartalmazó cukrokat – mint például galaktóz, glükóz, mannóz, arabinóz, ribóz, vagy előnyösen xilóz – vagy ezekből képzett diszacharidokat, például xilózil-xilózt jelent. A „7-es szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó cukorcsoporthoz” kifejezés olyan cukrot jelent, amely egy taxánrész 7-es pozíciójához glikozidkötéssel közvetlenül kapcsolódik. A cukorcsoporthoz közeli előnyös az (a) általános képletű xilózilcsoporthoz, ahol a képletben a hullámvonallal jelzett kötés lehet α vagy előnyösen β konfigurációjú.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkil” vagy „alk” kifejezés adott esetben szubsztituált, egyenes vagy elágazó láncú telített, a normál láncban előnyösen 1–12 szénatomos szénhidrogén-csoportot, például metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, terc-butil-, izobutil-, pentil-, hexil-, izohexil-, heptil-, 4,4-dimetil-pentil-, oktil-, 2,2,4-trimetil-pentil-, nonil-, decil-, undecil-, dodecil-csoportot és hasonlókat jelent. A szubsztituens lehet például egy vagy több halogénatom, alkoxi-, alkil-tio-, alkenil-, alkinil-, aril-, cikloalkil-, cikloalkenil-, hidroxil- vagy védett hidroxil-, karboxil-, alkoxi-karbonil-, alkil-karbonil-oxi-, karbamoil-, amino-, mono- vagy dialkil-amino- vagy merkaptó-csoport.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „kis szénatomszámú alk” vagy „kis szénatomszámú alkil” kifejezés egy fenti, adott esetben szubsztituált alkilcsoporthoz jelent, amely a normál láncban 1–4 szénatomot tartalmaz.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkoxi-” és „alkil-tio-csoport” kifejezés olyan, a fentiekben leírt alkilcsoporthoz jelent, amely egy oxigén- vagy kénhídon keresztül $[(\text{O}-)]$ vagy $(\text{S}-)$ kötődik. Az „alkoxi-karbonil-csoport” egy karbonilcsoporthoz keresztül kötődő alkoxycsoportot jelent. Az „alkil-karbonil-oxi-csoport” olyan alkilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődő karbonilcsoporthoz át kötődik. A „monoalkil-amino-”, illetve „dialkil-amino-” csoport egy, illetve két fenti alkilcsoporthoz szubsztituált aminocsoportot jelent.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkenilcsoporthoz” kifejezés olyan, adott esetben szubsztituált fenti alkilcsoporthoz jelent, amely legalább egy szén-szén kettős kötést tartalmaz. A szubsztituens lehet egy vagy több fenti alkilcsoporthoz, vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoporthoz lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkenil-oxi-csoport” kifejezés olyan fenti alkenilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkinilcsoporthoz” kifejezés olyan, adott esetben szubsztituált fenti alkinilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

tuált fenti alkilcsoporthoz jelent, amely legalább egy szén-szén hármas kötést tartalmaz. A szubsztituens lehet egy vagy több fenti alkilcsoporthoz, vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoporthoz lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „alkinil-oxi-csoport” kifejezés olyan fenti alkinilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „cikloalkil” kifejezés adott esetben szubsztituált, telített karbociklusos gyűrűrendszerrel jelent, amely előnyösen 1–3 gyűrűt és ezek mindegyikében 3–7 szénatomot tartalmaz. Szubsztituálatlan cikloalkilcsoporthoz például a ciklopropil-, ciklobutil-, ciklopentil-, ciklohexil-, cikloheptil-, ciklooktil-, ciklododecil-, ciklododecil- és az adamantilcsoporthoz. Ezek szubsztituense lehet egy vagy több fenti alkilcsoporthoz, vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoporthoz lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „cikloalkoxi” kifejezés olyan fenti cikloalkilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „cikloalkenil” kifejezés olyan, adott esetben szubsztituált csoportot jelent, mint a fenti cikloalkilcsoporthoz, azzal az eltéréssel, hogy legalább egy szén-szén kettős kötést is tartalmaz, amitől a gyűrű részlegesen telítetlenné válik. A szubsztituens lehet egy vagy több fenti alkilcsoporthoz, vagy egy vagy több, a fentiekben az alkilcsoporthoz lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „cikloalkenil-oxi” kifejezés olyan fenti cikloalkenilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „ar” vagy „aril” kifejezés adott esetben szubsztituált karbociklikus aromás csoportot jelent, amely előnyösen 1–2 gyűrűt és ezekben 6–12 szénatomot tartalmaz. Ilyen szubsztituálatlan csoportok például a fenil-, bifenil- és naftilcsoporthoz. A szubsztituens lehet egy vagy több – előnyösen legfeljebb három – nitrocsoporthoz, vagy a fentiekben alkilcsoporthozként vagy az alkilcsoporthoz lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az „aril-oxi” kifejezés olyan fenti arilcsoporthoz jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „heterociklo-” vagy „heterociklusos” kifejezés olyan, adott esetben szubsztituált, teljes mértékben telített vagy telítetlen, aromás vagy nem aromás ciklusos csoportot jelent, amelynek legalább egy gyűrűjében legalább egy heteroatom van. Ezek a csoportok előnyösen egy vagy két 5 vagy 6 tagú gyűrűt tartalmaznak. A heterociklusos csoport a gyűrűben tartalmazhat például 1 vagy 2 oxigénatomot, 1 vagy 2 kénatomot, és/vagy 1–4 nitrogénatomot. A heterogyűrűk a gyűrűrendszer bármely szénatomján vagy heteroatomján keresztül kapcsolódhatnak. Ilyen heterociklusos csoportok például a tienil-, furil-, pirrolil-, piridil-, imidazolil-, pirrolidinil-, piperidinil-, azepinil-, indolil-, izoindolil-, kinolil-, izokinolil-, benzotiazolil-, benzoxazolil-, benzimidazolil-, benzoxadiazolil- és a benzofurazanol-csoport. A szubsztituens lehet egy vagy több fenti alkilcsoporthoz, vagy egy vagy több, a

fentiekben az alkilcsoportok lehetséges szubsztituenseként megadott csoport. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „heterociklo-oxi” kifejezés olyan fenti heterociklusos csoportot jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „halogén” vagy „halo” kifejezés klór-, bróm-, fluor- vagy jódatomot jelent.

A „taxán” kifejezés olyan vegyületet jelent, amely egy, az alábbiak szerinti taxánrészt tartalmaz. A „taxán-rész” egy (b) képletű vázszerkezetet tartalmaz [a (b) képlettrajzon a gyűrűrendszer számozását is feltüntetjük], amely lehet szubsztituált, és gyűrűrendszerében etilénese telítetlenséget tartalmazhat. Előnyösek az olyan taxánrészek, amelyek – mint például a paclitaxel esetében – 4- és 5-helyzetben egy kondenzált oxetángyűrűt, a C-11 és C-12 hely között pedig etilénese kettős kötést tartalmaznak.

A „hidroxil- vagy hidroxilcsoport védőcsoportja” bármely olyan csoportot jelenthet, amely képes egy szabad hidroxilcsoportot megvédeni, és azon reakció lejátszódása után, amelyhez alkalmazták, a molekula többi részeinek károsítása nélkül eltávolítható. Az ilyen csoportok és szintézisük leírása megtalálható az alábbi szakirodalmi helyeken: T. W. Greene: „Protective Groups in Organic Synthesis [John Wiley and Sons (1981)]; Fieser & Fieser.

A „só” kifejezés magába foglalja a szerves és/vagy szervetlen savakkal és/vagy bázisokkal képzett savas és/vagy bázisos sókat.

Az önállóan vagy más csoport részeként használt „acil” kifejezés azt a molekularészt jelenti, amely egy karbonsavból a karboxicsoporthidroxicsoporthjának eltávolítása után visszamarad. Az önállóan vagy más csoport részeként használt „acil-oxi” kifejezés olyan fenti acilcsoportot jelent, amely egy oxigénhídon keresztül kötődik.

A találmány szerinti eljárásához kiindulási anyagként bármely olyan, 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánt használhatunk, amelyen a találmány szerinti enzimese hidrolízis végrehajtható. Ezek előnyösen xilozilcsoportot tartalmazó taxánok, amelyek képződhetnek természetes úton, mint például a 7-xilozil-taxol, 7-xilozil-10-dezacetil-taxol, 7-xilozil-baccatin III, 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III, 7-xilozil-cefalomannin, 7-xilozil-10-dezacetilcefalomannin, 7-xilozil-taxol C vagy 7-xilozil-10-dezacetil-taxol C. A fenti vegyületek használhatók önmagukban, vagy egymással vagy más taxánokkal keverve. A „természetes úton” képződő taxán kiindulási anyagai előnyösen taxánt termelő növényi szövetekből növényi sejtenyésztéssel és/vagy extrakcióval állíthatók elő. E célra előnyösen használhatók a *Taxus* nemzetséghez tartozó növények – mint *Taxus baccata*, *Taxus cuspidata*, *Taxus brevifolia*, *Taxus wallichiana*, *Taxus media*, *Taxus hicksii*, különösen a *Taxus x. media hicksii* – szövetei. A szövetek származhatnak a gyökérből, a tűlevelekből, a kéregből vagy a teljes magoncából. A 7-helyzetben xilozilcsoportot tartalmazó taxánok és az előállításukra szolgáló előnyös módszerek leírása megtalálható például az alábbi szakirodalmi helyeken: D. G. I. Kingston [Pharmac. Ther., Vol. 52,

1–34 (1991)], K. V. Rao [Pharmaceutical Research, Vol. 10, No. 4, 521–524 (1993)], valamint V. Senilh és munkatársai [J. Nat. Prod., 47, 131–137 (1984)].

A találmány szerinti eljárás kiindulási anyagaiként szolgáló, 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánok úgy is előállíthatók, hogy egy taxán C-7 helyére egy cukorcsoportot viszünk be. Ennek egyik módja, hogy egy 7-helyzetben hidroxicsoporthat tartalmazó taxánt egy új eljárással, enzimese konverzióval a megfelelő, 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánná alakítunk át. Tehát a találmány további tárgya eljárás legalább egy – 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó cukorcsoportot tartalmazó, előnyösen (II) általános képletű – taxán előállítására, ami abból áll, hogy legalább egy, 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporthat tartalmazó, előnyösen (I) általános képletű taxánt valamilyen cukor jelenlétében olyan enzimmel vagy mikroorganizmussal hozunk érintkezésbe, amely képes arra, hogy a 7-helyzetű hidroxicsoporthat cukorcsoporttá történő átalakítását katalizálja, és az átalakítást végrehajtsa. Bármely olyan enzimet vagy mikroorganizmust alkalmazhatunk, amely a cukorcsoporttá történő átalakítást katalizálja, ezek közül előnyösek a találmány szerinti hidrolízise eljárás katalizálására a későbbiekben felsorolt enzimek és mikroorganizmusok, de olyan körülmények között alkalmazva, amelyek az ellenkező irányú reakciónak kedveznek. A reakciókörülményeket – mint közeg, hőmérséklet, pH és hasonló – szintén választhatjuk a találmány szerinti hidrolízise eljárásra a későbbiekben leírt körülmények közül, de módosíthatjuk is azokat, például úgy, hogy egy cukorcsoport bevitelének elősegítésére a jelen lévő víz mennyiségét minimálisra csökkentjük.

A találmány egyik megvalósításában egy 7-helyzetben hidroxicsoporthat tartalmazó taxánból a fenti enzimese módszerrel előállítjuk a megfelelő, 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó származékot, az így kapott taxánt egy, a C-7-től eltérő helyen a kívánt módon módosítjuk – e reakció során a cukorcsoport hidroxivédő csoportként működik –, azután végrehajtsuk a találmány szerinti enzimese hidrolízist, így végül olyan taxánszármazékot kapunk, amely 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporthat tartalmaz.

A találmány szerinti enzimese hidrolízishez bármely olyan mikroorganizmust vagy ebből származó enzimet, például izolált enzimet alkalmazhatunk, amely a hidrolízis katalizálására képes. Az enzimese vagy mikrobiális anyagokat eredetüktől és tisztaságuktól függetlenül használhatjuk szabad, vagy egy hordozóanyagon immobilizált – például fizikai adszorpcióval vagy beágyazással megkötött – állapotban.

A találmány céljára alkalmazhatók például a *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Sporosarcina*, *Oscillospira*, *Planococcus*, *Lactobacillus*, *Kurtzia*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Neisseria* vagy *Kingella* nemzetséghez (genus) tartozó mikroorganizmusok. Előnyösen alkalmazható fajok (species) a *Micrococcus* nemzetségből például a *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lylae*, *Mic-*

rococcus varians, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus agilis*, *Micrococcus kristinae*, *Micrococcus nishinomiyaensis*, *Micrococcus sedentarius*, *Micrococcus halobius*; a *Bacillus* nemzetségből például a *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus fastidiosus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus insolitus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus pantothenicus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus marinus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus pasteurii*, *Bacillus azotoformans*, *Bacillus macquariensis*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus firmus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus badius*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus alvei*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus schlegelii*, *Bacillus larvae*; a *Flavobacterium* nemzetségből például a *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium baulstinum*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Flavobacterium odoratum*, *Flavobacterium multivorum*, *Flavobacterium spiritivorum*. Még előnyösebben alkalmazható fajok a *Moraxella* nemzetség *Moraxella* alnemzetségéből (subgenus) például a *Moraxella* (*Moraxella*) *lacunata*, *Moraxella* (*Moraxella*) *bovis*, *Moraxella* (*Moraxella*) *nonliquefaciens*, *Moraxella* (*Moraxella*) *atlantae*, *Moraxella* (*Moraxella*) *phenylpiruvica*, *Moraxella* (*Moraxella*) *osloensis*, valamint a *Branhamella* subgenusből a *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, *Moraxella* (*Branhamella*) *caviae*, *Moraxella* (*Branhamella*) *ovis*, *Moraxella* (*Branhamella*) *cuniculi*.

Különösen előnyösen alkalmazható mikroorganizmusok a *Moraxella* sp. ATCC 55475, a *Bacillus macerans* ATCC 55476, a *Bacillus circulans* ATCC 55477 és a *Micrococcus* sp. ATCC 55478. Az „ATCC” jelölés a mikroorganizmusok azonosító száma deponálási helyükön: American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852). A fenti mikroorganizmusok 1993. szeptember 30-án lettek letétbe helyezve.

A biológiailag tiszta *Moraxella* sp. ATCC 55475, *Bacillus macerans* ATCC 55476, *Bacillus circulans* ATCC 55477 és *Micrococcus* sp. ATCC 55478 új mikroorganizmusok. A találmány oltalmi köre magába foglalja ezen mikroorganizmusok mutánsainak, így például a kémiai, fizikai – például ultraibolya besugárzás – vagy biológiai, például molekuláris biológiai technikákkal módosított változatoknak a találmány szerinti hidrolízises eljárásban történő felhasználását is.

A *Moraxella* sp. ATCC 55475 olyan táptalajon tenyészthető, amely 3,0 g marhahúskivonatot, 10,0 g peptont és 5,0 g nátrium-kloridot tartalmaz, pH-ját 7-re állítjuk, és 20 percig 121 °C-on sterilizáljuk. A mikroorganizmus jellemzői: gram-negatív, mozgásra nem képes (non-motile), nem spórázó pálcikák (1–2 µm); aerob szaporodás sokféle táptalajon; csak tetrametil-p-fenilén-diamin alkalmazása esetén kataláz-pozitív és oxidáz-pozitív (talajmintából izoláltuk, amelynek származási helye: Delaware Gap National Recreational Area, New Jersey).

A *Bacillus macerans* ATCC 55476 olyan táptalajon tenyészthető, amely 3,0 g marhahúskivonatot, 10,0 g

peptont és 5,0 g nátrium-kloridot tartalmaz, pH-ját 7-re állítjuk, és 20 percig 121 °C-on sterilizáljuk. A mikroorganizmus jellemzői: gram-pozitív, mozgó, spórázó pálcikák; aerob szaporodás sokféle táptalajon; kataláz- és oxidáz-pozitív; a glükózt gyengén erjeszti; a zselatint elfolyósítja (talajmintából izoláltuk, amelynek származási helye Arlington, Texas).

A *Bacillus circulans* ATCC 55477 olyan táptalajon tenyészthető, amely 3,0 g marhahúskivonatot, 10,0 g peptont és 5,0 g nátrium-kloridot tartalmaz, pH-ját 7-re állítjuk, és 20 percig 121 °C-on sterilizáljuk. A mikroorganizmus jellemzői: gram-pozitív, mozgó, spórázó pálcikák; aerob szaporodás sokféle táptalajon; kataláz- és oxidáz-pozitív; a glükózt gyengén erjeszti; a zselatint nem folyósítja el (famintából izoláltuk, amelynek származási helye Hamilton Square, New Jersey).

A *Micrococcus* sp. ATCC 55478 olyan táptalajon tenyészthető, amely 3,0 g marhahúskivonatot, 10,0 g peptont és 5,0 g nátrium-kloridot tartalmaz, pH-ját 7-re állítjuk, és 20 percig 121 °C-on sterilizáljuk. A mikroorganizmus jellemzői: gram-pozitív, gömb alakú, 0,5–1 µm átmérőjű coccus; a sejtek párokban vagy csoportokban vannak jelen; mozgásra nem képes; nem spórázó; aerob szaporodás sokféle táptalajon; kataláz- és oxidáz-pozitív; a glükózt erjeszti (talajmintából izoláltuk, amelynek származási helye Harriman Park, Tuxedo, New York).

A találmány további tárgyát képezi egy szűrési (screening; szkrinelési) eljárás a találmány szerinti enzim hidrolízisre képes mikroorganizmusok kiválasztására. Egy 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánnak a találmány szerinti enzim hidrolizálására alkalmas mikroorganizmus kiválasztásához előnyösen alkalmazható az új szkrinelési eljárás, amely az alábbi lépésekből áll:

i) kiválasztunk egy táptalajt, amely a szelektálandó mikroorganizmus szaporítására alkalmas;

ii) kiválasztunk egy indikátorglikozidot;

iii) a mikroorganizmust szaporítás céljából érintkezésbe hozzuk az i) lépés szerinti táptalajjal és az ii) lépés szerinti indikátorglikoziddal;

iv) az indikátorglikozid jelenlétében vizsgáljuk a hidrolízist; és

v) teszteljük a mikroorganizmust a 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxán hidrolízise szempontjából, és kiválasztjuk azokat a mikroorganizmusokat, amelyek képesek a fent megadott hidrolízisre.

A „glikozid” olyan vegyületet jelent, amely előállítható úgy, hogy egy cukor aldehid- vagy ketocsoportja egy alkohol (amely cukor is lehet) hidroxicsoportjával reagál, és glikozidkötést (–O–) hoz létre; a vegyület hidrolízise során megkapjuk a cukrot és egy aglikont (vagyis a lehasított alkoholt). Az „indikátorglikozid” olyan glikozidot jelent, amelynek a hidrolízis során képződő aglikon része ultraibolya fényben fluoreszkál – mint például a 4-metil-umbelliferil-β-D-xilopiranozid, – vagy megváltoztatja a színét – mint például a p-nitro-fenil-β-D-xilozid –, és így jelenlétében megállapítható, hogy az enzim hidrolízis végbemegy-e egy adott mikroorganizmus hatására. Az indikátorglikozid előnyösen valamilyen

xilozid. A 7-xilozil-taxánok hidrolizálására alkalmas mikroorganizmusok kiválasztásához előnyösen nagy terjedelmű aglikonrészt tartalmazó indikátor-xilozidokat használunk.

A fenti i) lépésben a szaporítóközeg (táptalaj) a szénatomok forrásaként egy glikozidot, például xilánt vagy más xilozidot tartalmaz, amely a glikozidkötésnél hidrolizálható, hogy a közeget feldúsítsuk a xilozidkötést hidrolizálni képes mikroorganizmusok számára, s így elősegítsük a kiválasztásukat. Az i) lépésben a mikroorganizmusokat például úgy hozzuk érintkezésbe a táptalajjal, hogy híg, vizes talajszuszpenziót, amely a mikroorganizmusokat tartalmazza, agar táptalajra oltjuk. A mikroorganizmusokat az indikátorglikoziddal például úgy hozzuk érintkezésbe, hogy egy táptalajlemezre, amelyen a mikroorganizmusokat elszaporítottuk, ráöntjük az indikátorglikozidot tartalmazó lágy agart, vagy úgy, hogy az indikátorglikozidot előbb adjuk hozzá a táptalajhoz, mint a mikroorganizmusokat.

Miután a találmány szerinti szkrínelési eljárás gyors és hatékony i)–iv) lépéseit végrehajtottuk, a szaporodásban lévő vagy már elszaporított mikroorganizmus-telepeket az v) lépésben a cukorcsoport hidrolízisének kimutatására egy 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánnal kellőképpen hosszú időn át inkubáljuk. Ezt végezhetjük például úgy, hogy az agarlemezről eltávolított telepeket 7-xilozil-taxánnal kis rázólabdikokban szaporítjuk, azután a sejteket eltávolítjuk, és a kapott terméket a cukorcsoport hidrolízisének kimutatására például nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) elemezzük.

A találmány szerinti hidrolízishez enzimeként alkalmazhatunk hidrolázokat, előnyösen glikozidázokat, például xilozidázt vagy glikanázokat. Előnyösen alkalmazhatók a mikroorganizmusokból, különösen a fenti mikroorganizmusokból származó enzimek. Ezeket például extrakciós és tisztítási módszerekkel izolálhatjuk.

A mikroorganizmusokat használhatjuk ép, nedves sejtek, vagy például liofilizálással, permetezéssel vagy hővel szárított sejtek alakjában, vagy feldolgozott sejtanyag, például feltárt sejtek vagy sejtextraktum alakjában. Használhatunk génebézési módszerekkel kialakított mikroorganizmusokat is. A gazdasejt lehet bármilyen sejt – így például *Escherichia coli* –, amit úgy módosítunk, hogy olyan gén(ek)e tartalmazzon, amely(ek) egy vagy több, a fenti reakciók katalizálására képes enzimet expresszál(nak).

Ha egy vagy több mikroorganizmust használunk, a találmány szerinti enzimes hidrolízist végezhetjük a fermentáció után (kétlépcsős eljárás), vagy azzal egyidejűleg, tehát úgy, hogy a fermentációt és a hidrolízist egyszerre hajtjuk végre (egylépcsős eljárás).

A mikroorganizmusok szaporítását egy alkalmas közegben végezzük, amely tápanyagot nyújt a mikrobasejteknek. A tipikus szaporítóközeg tartalmazza a szén- és nitrogénatomok, valamint egyéb elemek (például nyomelemek) forrását. Induktorokat is adhatunk hozzá, vagyis olyan vegyületeket, amelyek elősegítik az enzim kívánt aktivitásának kialakulását a mikrobasejtekben.

Szénforrásként használhatunk cukrokat – mint például maltóz, laktóz, glükóz, fruktóz, glicerint, szorbit,

szacharóz, keményítő, mannit, propilénglikol, xilán és hasonló –, szerves savak sóit – mint nátrium-acetát, nátrium-citrát és hasonló –, vagy alkoholokat, mint például etanol, propanol és hasonló.

5 A nitrogénforrás lehet N–Z amine A, kukoricalevél, szójakorpa, marhahúskivonat, élesztő kivonat, melasz, sütőélesztő, tripton, étkezési szója, pepton, élesztő-amin, aminosavak, mint nátrium-glutamát és hasonló, nátrium-nitrát, ammónium-szulfát és hasonló.

10 A nyomelemek közé tartoznak a magnézium, mangán, kalcium, kobalt, molibdén, réz, nikkel, vas, nátrium és kálium sói. Foszfátokat is alkalmazhatunk nyomnyi vagy nagyobb mennyiségben.

15 Az alkalmazott közeg többféle szén- és nitrogénforrást, valamint többféle tápanyagot is tartalmazhat.

Előnyösen vizes közeget alkalmazunk, amely lehet a példákban leírt közegek valamelyike.

A reakciókeverék keverése és levegőztetése befolyásolja a szaporodás folyamán rendelkezésre álló oxigén mennyiségét. A keverést előnyösen 100–250 fordulat/perc sebességgel végezzük, a levegőztetés előnyös mértéke a közeg térfogatának körülbelül 1–10-szeresét kitevő levegőmennyiség percenként.

20 A mikroorganizmusok szaporítását és a találmány szerinti hidrolízist előnyösen körülbelül 4 és körülbelül 8,5 közötti pH-jú közegben, körülbelül 24 és körülbelül 37 °C közötti hőmérsékleten végezzük. A hidrolízist in vitro például 1–72 órán át, vagy előnyösen addig végezzük, míg a kívánt termék mennyisége eléri a maximumát. A hidrolízis folyamán a pH-t előnyösen 7 alatt tartjuk, például akkor, ha 10-dezacetil-taxol vagy 10-dezacetil-baccatin III van jelen, és a C–7 hely epimerizációját minimálisra kívánjuk csökkenteni. A találmány szerinti hidrolízist előnyösen pH 4 és 7 között, vagyis 35 nem bázisos körülmények között hajtjuk végre.

Ugyancsak előnyös, ha a hidrolízis reakcióközegeként vizes oldatot használunk, de alkalmazhatunk valamilyen szerves folyadékot, vagy egy szerves és egy szervesetlen folyadék egymással elegyedő vagy nem elegyedő (kétfázisú) keverékét is. A 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxán kiindulási anyagaiból a kiindulási anyagok és a reakcióközeg összes tömegére számítva előnyösen 0,0025–2,5 tömegszázaléknyit használunk.

40 Az enzimből vagy mikroorganizmusból a kiindulási anyagra számítva annyit használunk, amennyi a találmány szerinti enzimes hidrolízis katalizálásához szükséges. A találmány szerinti hidrolízissel előnyösen 90%-nál magasabb kihozattal (a 7-helyzetben hidrolizált vegyület százalékaránya a 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánhoz viszonyítva) érünk el. A hidrolízis a kiindulási anyagként használt taxán 7-helyzetű csoportjára szelektív lehet, ami azt jelenti, hogy nagyobb (például 100%) arányban kapunk olyan vegyületeket, amelyek csak 7-helyzetben hidrolizáltak anélkül, hogy a többi helyen hidrolízis ment volna végbe.

55 A találmány szerinti, 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó, valamint egyéb, például az alábbiakban leírt taxánok izolálását és tisztítását végezhetjük például extrakcióval, desztillálással, átkristályosítással vagy oszlop-kromatográfiával.

A taxánok olyan diterpének, amelyek egy, a fentiek szerinti taxánrészt tartalmaznak. Különösen fontosak azok a taxánok, amelyek taxánrészükben a 13-as helyen egy oldalláncot tartalmaznak, mint például a paclitaxel. A gyógyászatiag hatásos taxánszármazékok, például a paclitaxel, tumorelleses szerként használhatók a mell-, petefészek-, vastagbél- vagy tüdőrákban, melanómában vagy leukémiában szenvedő betegek kezelésében.

A találmány szerinti hidrolízissel előállított vegyületek igen jól használhatók egyrészt gyógyászatiag hatásos taxánszármazékokként, mint például a paclitaxel, másrészt az ilyen taxánok előállításának közbenső termékeiként. Ha például a találmány szerinti módon előállított vegyületek 13-helyzetben is hidroxicsoportot tartalmaznak – mint a baccatin III vagy a 10-dezacetilbaccatin III –, ezeket kapcsolhatjuk 13-helyzetben acil-oxi-oldalláncot képező közbenső termékekkel, például β -laktámokkal, így 13-helyzetben acil-oxi-oldalláncot tartalmazó taxánokat kapunk, amilyen például a paclitaxel és analógjai. A találmány szerinti módon előállított, 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó vegyületeket adott esetben módosíthatjuk, mielőtt a C-13 helyre az acil-oxi-oldalláncot kapcsolással bevinnénk. Ezenkívül a találmány szerinti eljárás végrehajtása előtt, alatt vagy után módosítást végezhetünk a C-13 helyen az 5,739,016 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerinti módon (a 13-helyzetű acil-oxi-csoport átalakítása hidroxicsoporttá enzimes hidrolízissel) és/vagy a C-10 helyen az 5,523,219 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerinti módon (a 10-helyzetű acil-oxi-csoport átalakítása enzimes hidrolízissel hidroxicsoporttá, vagy a hidroxicsoport átalakítása enzimes észterezéssel acil-oxi-csoporttá).

A találmány szerinti módon előállított, 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó, és adott esetben a fentiek szerint módosított vegyületek felhasználhatók például 13-helyzetben acil-oxi-oldalláncot tartalmazó – például a fent említett – taxánok előállítására. Az ilyen taxánok előállítására szolgáló módszerek leírása megtalálható a 400,971 számú európai közrebocsátási iratban a 4,876,399, a 4,857,653, a 4,814,470, a 4,927,012 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokban, az alábbi szakirodalmi helyen: D. G. I. Kingston [Pharm. Ther., 52, 1–34 (1991)], továbbá a WO 94/14787 számú, az EP-A 0 617018 számú és az EP-A 0 604910 számú közrebocsátási iratokban.

A találmány szerinti hidrolízishez előnyösen (II) általános képletű taxánokat vagy sóikat alkalmazunk, így az enzimes hidrolízissel a megfelelő (I) általános képletű vegyületeket vagy sóikat kapjuk.

Az (I) és (II) általános képletben R^2 jelentése előnyösen hidroxil- vagy $R^5-C(O)-O-$ általános képletű csoport, amelyben R^5 jelentése alkil-, például metilcsoport; R^3 jelentése előnyösen alkil-, például metilcsoport; R^4 jelentése előnyösen aril-, például fenilcsoport; és R^1 jelentése előnyösen hidroxicsoport vagy egy (III) általános képletű csoport, amelyben

R^6 és R^7 jelentése egymástól függetlenül alkil-, alkoxi-, alkenil-, alkenil-oxi-, alkinil-, alkinil-oxi-, cikloalkil-, cikloalkoxi-, cikloalkenil-, cikloalkenil-oxi-,

aryl-, aril-oxi-, heterociklusos vagy heterociklo-oxi-csoport; és

R^8 jelentése hidrogénatom, alkoxi-karbonil-csoport vagy egy hidroxil-védőcsoport.

A (II) általános képletű vegyületek közé tartozik például a 7-xilozil-taxol, 7-xilozil-10-dezacetil-taxol, 7-xilozil-baccatin III, 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III, 7-xilozil-cefalomannin, 7-xilozil-10-dezacetil-cefalomannin, 7-xilozil-taxol C és a 7-xilozil-10-dezacetil-taxol C.

A találmány szerinti eljárás végterméke előnyösen a paclitaxel (Taxol®) A képletű vegyület.

A találmány szerinti eljárások bármelyikében használhatjuk vagy előállíthatjuk a reagensek, illetve termékek sóit vagy szolvátjait, például hidrátjait.

Az alábbi példák a találmány részletesebb ismertetésére szolgálnak, annak oltalmi körét nem befolyásolják.

1. példa

20 A xilozidázok kiválasztása

Agarlemezeket készítettünk, amelyek 1% nyírfából származó xilánt, 0,1% élesztőkivonatot, 0,1% triptont és 1,5 agart tartalmaznak. Talajból vagy korhadó fából 2 g mintát 40 ml vízben szuszpendáltunk, a szuszpenziót 1:200 arányban hígítottuk, és a hígításból 0,1 ml-t rápermeteztünk a lemezre. A lemezeket 1 héten át szobahőmérsékleten (körülbelül 22 °C-on) inkubáltuk, majd 2 hétig 4 °C-on tároltuk. Ezután a lemezeket lefedtük 4 ml, körülbelül 40 °C hőmérsékletű 0,8%-os agarózzal, amely 1 mM 4-metil-umbelliferil- β -D-xilopiranozidot tartalmazott. Kiválasztottunk 125 db, nagy hullámhosszú ultraibolya fényben fluoreszkáló telepet, és ezeket 28 °C-os lemezekben 3 napig inkubáltuk.

Rázólombikokat, amelyek 1% nyírfaxilánt, 0,2% triptont, 0,2% élesztőkivonatot és annyi kálium-foszfátot tartalmaztak, hogy a keverék pH-ja 7 legyen, a lemezek egyikéről vett egy kacsnyi tenyésztéssel beoltottunk, és 28 °C-on 175 fordulat/perc sebességgel rázva 2 napig inkubáltuk, majd 0,2 ml metanolban 1 mg 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt adtunk hozzá, és az inkubálást még 2 napon át folytattuk. Az izolátumok egy másik csoportját a 7-xilozil-10-dezacetil-taxol hozzáadása előtt 1 napig, utána pedig 3 napig inkubáltuk. Ezután mindegyik lombik tartalmához 10 ml metanolt adtunk, és a mintákat az alább ismertetett HPLC 1. módszerrel vizsgáltuk 7-xilozil-10-dezacetil-taxol és 10-dezacetil-taxol jelenlétére. A 86 szkrínelt izolátum közül 9 termelt 10-dezacetil-taxolt kimutatható mennyiségben. A 10-dezacetil-taxolból a legnagyobb koncentrációt a Moraxella sp. ATCC 55475-tel kaptuk, ezt a mikroorganizmust szélesztett tenyésztéssel (restreak) tisztítottuk, és az alábbi példákban alkalmaztuk.

HPLC 1. módszer

55 Oszlop: Hewlett Packard hypersil 5 μ m ODS C18 200 $\times$ 4,6 mm.

Mozgófázis: 60% metanol, 40% víz.

Az oszlop hőmérséklete: szobahőmérséklet.

Detektálási hullámhossz: 235 nm.

A módszer leírása a következő szakirodalmi helyen is megtalálható: B. Monsarrat, E. Mariel, S. Cros, M.

Gares, D. Guenard, F. Gureitte–Voegelien és M. Wright [Drug Metabolism and Disposition, 18, 895–901 (1990)].

2. példa

A 7-xilozil-10-dezacetil-taxol hidrolízise

4 literes Erlenmeyer-lombikban 1 liter tápoldatot, amely pH=7-en 1% nyírfaxilánt, 0,2% triptont, 0,2% élesztőkivonatot, 0,1% kálium-dihidrogén-foszfátot és 0,1% dikálium-hidrogén-foszfátot tartalmazott, beoltottunk 10 ml Moraxella sp. ATCC 55475 tenyésztettel, és 3 napig 28 °C-on ráztuk. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk, 50 ml 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldattal mostuk, ismét lecentrifugáltuk, majd a fenti pufferoldat 30 ml-ében újraszuszpendáltuk, így ml-enként 0,122 g nedves sejtet tartalmazó szuszpenziót kaptunk. 1,5 ml sejtuszuszpenzióhoz 0,5 mg 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt adtunk 0,2 ml metanol és 0,3 ml víz elegyében. A szuszpenziót függőleges irányban 12/perc sebességgel forgatva 28 °C-on 21 órán át kevertük, majd a reakciót 2 ml metanollal leállítottuk, és egy mintát HPLC 1. módszerrel megvizsgáltunk. A reakcióelegyben 7-xilozil-10-dezacetil-taxol nem maradt, és 0,230 mg/ml 10-dezacetil-taxolt mutattunk ki (kihozatal: 107%).

A példában lejátszódó reakció az [A] reakcióvázlaton látható.

3. példa

A 7-xilozil-taxol hidrolízise

A 2. példa szerint előállított sejtuszuszpenzió 1,5 ml-éhez 0,5 mg 7-xilozil-taxolt adtunk 0,2 ml metanol és 0,3 ml víz elegyében. A szuszpenziót 12/perc sebességgel forgatva 28 °C-on 21 órán át kevertük, majd a reakciót 2 ml metanollal leállítottuk, és egy mintát HPLC 1. módszerrel megvizsgáltunk. A reakcióelegyben 0,011 mg/ml 7-xilozil-axol maradt, és 0,167 mg/ml taxolt találtunk (kihozatal: 77%).

4. példa

A 7-xilozil-baccatin III hidrolízise

Moraxella sp. ATCC 55475-öt tenyésztettünk rázólombikokban 28 °C-on, pH=7-es közegben, amely 2% glicerint, 0,2 triptont, 0,2% élesztőkivonatot, 0,1% dikálium-hidrogén-foszfátot, 0,1% kálium-dihidrogén-foszfátot, 0,02% magnézium-szulfát-heptahidrátot ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,001% nátrium-kloridot, 0,001% vas(II)-szulfát-heptahidrátot és 0,001 mangán-szulfát-tetrahidrátot tartalmazott. Egy 1 ml-es fiolából 100 ml közeget oltottunk be. Ebből a tenyészetből 4 nap múlva 15 ml-es adagokat átooltottunk 4 literes, 1-1 liter tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikokba. 3 nap múlva a sejteket lecentrifugáltuk, 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldattal mostuk, ismét lecentrifugáltuk, azután fagyaszttva tároltuk.

1 mg 7-xilozil-taxolt, 200 mg (0,108 egység), a 08/077,979 számú, amerikai egyesült államokbeli nyilvánosságra hozott szabadalmi bejelentésben ismertezett Nocardiodides albus ATCC 55425-től származó C-13 dezaciláz enzimet, 0,2 ml metanolt, 0,2 ml 1M pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatot és 3,6 ml vizet 48 fordulat/perc sebességgel 24 °C-on 17 órán át kevertünk. 15 óra elteltével a fenti 1. módszerrel végzett

HPLC-elemzés azt mutatta, hogy a C-13 oldallánc eltávolítása a szubsztrátról teljesen végbement. Az oldatból, amely most már 7-xilozil-baccatin III-at tartalmazott, 2 ml-t hozzáadtunk a fenti Moraxella sp. sejttenyészet 1 ml-éhez (a sejtek nedves tömege 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatban 0,24 g), és 48 fordulat/perc sebességgel 24 órán át kevertük. A reakcióelegyeket 6 ml metilén-dikloriddal extraháltuk, az extraktumokat megszáritottuk, majd metanolban újra feloldottuk, és HPLC 1. módszerrel vizsgáltuk. 0,101 mg/ml baccatin III-at találtunk, ez a 7-xilozil-taxol kiindulási koncentrációjára vonatkoztatva 102%-os kihozatalt jelent.

5. példa

A 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III hidrolízise

A sejttenyészetet a 4. példában leírt módon állítottuk elő. 1 mg 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt, 200 mg (0,108 egység) 4. példa szerinti C-13 dezaciláz enzimet, 0,2 ml metanolt, 0,2 ml 1M pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatot és 3,6 ml vizet 48 fordulat/perc sebességgel 24 °C-on 17 órán át kevertünk. 15 óra elteltével a fenti 1. módszerrel végzett HPLC elemzés azt mutatta, hogy a C-13 oldallánc eltávolítása a szubsztrátról teljesen végbement. Az oldatból, amely most már 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III-at tartalmazott, 2 ml-t hozzáadtunk a fenti Moraxella sp. sejttenyészet 1 ml-éhez (a sejtek nedves tömege 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatban 0,24 g), és 48 fordulat/perc sebességgel 24 órán át kevertük. A reakcióelegyeket 6 ml metilén-dikloriddal extraháltuk, az extraktumokat megszáritottuk, majd metanolban újra feloldottuk, és HPLC 1. módszerrel vizsgáltuk. 0,099 mg/ml 10-dezacetil-baccatin III-at találtunk, ez a 7-xilozil-10-dezacetil-taxol kiindulási koncentrációjára vonatkoztatva 103%-os kihozatalt jelent.

6. példa

A 7-xilozil-10-dezacetil-taxol hidrolízise szubcelluláris frakciókkal

Moraxella sp. ATCC 55475-öt 28 °C-on 3 napon át ráztunk 6 db 4 literes Erlenmeyer-lombikban, amelyek mindegyike 1 liter 2. példa szerinti tápoldatot tartalmazott. A beoltás előtt a tápoldatot a xilán részleges elbonthatására 2 napon át 28 °C-on 2 ml/liter Novo SP431 xilánázal kezeltek. A sejteket lecentrifugáltuk, 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldattal mostuk, ismét lecentrifugáltuk, majd ugyanezen pufferrel 210 ml-re feltöltöttük. Ezután a sejteket ultrahangos kezeléssel feltártuk, 20 percig 27 504 g-vel centrifugáltuk, majd a felülúszót 20 percig 47 807 g-vel centrifugáltuk. Ez utóbbi centrifugálás felülúszójából 17 ml-t 1 órán át 100 100 g-vel centrifugáltunk, és az így kapott pelletet 17 ml 50 mM pH=7 kálium-foszfát pufferoldatban újra szuszpendáltuk. A fehérjekoncentráció a 100 100 g-vel végzett centrifugálással kapott felülúszóban 4,72 mg/ml, az újraszuszpendált pelletben pedig 1,65 mg/ml volt. 1,9 ml pellethez, illetve felülúszó frakcióhoz 0,1 ml metanolban 0,5 mg 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt adtunk, és a kémcsöveket 15 órán át 25 °C-on inkubáltuk. Ezután a reakciót 2 ml metanollal leállítottuk, és a mintákat

HPLC 1. módszerrel elemeztük. Az alábbi eredményeket kaptuk:

Minta	Termék: 10-dezacetil- taxol, mg/ml	Szubsztrát 7-xilozil-10- dezacetil-ta- xol, mg/ml	10-dezacetil- taxol kihozatal, %
Enzim nélkül	0,000	0,256	
Felülúsó	0,038	0,237	18
Pellet	0,206	0,038	96

7. példa

Tiszafakivonat hidrolízise

Moraxella sp. ATCC 55475-öt tenyésztettünk rázó-lombikokban a 4. példában leírtak szerint. A sejteket a 6. példa szerinti módon centrifugáltuk és mostuk, majd mikrofluidizátoron kétszer áteresztve $8,2 \cdot 10^8$ Pa (12 000 psi) nyomáson feltártuk. A feltáratlanul maradt sejteket 20 percen át $27\,504 \times g$ -vel végzett centrifugálás-sal eltávolítottuk. A felülúsót 1 órán át $100\,100 \times g$ -vel centrifugáltuk, és az így kapott pelletet annyi 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatban szuszpendáltuk, hogy a fehérjekoncentráció 17 mg/ml legyen. 0,05 ml 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatot, Taxus Hickii magoncok etanolos extraktumából 0,2 ml-t, 20 mg polivinil-pirrolidont (az inhibáló hatású növényi fenolok eltávolítására) és 0,75 ml vizet 12 fordulat/perc sebességgel 25°C -on 1 órán át kevertünk. Ezután 1 ml pellet-szuszpenziót, illetve 1 ml 50 mM pH=7-es kálium-foszfát pufferoldatot adtunk hozzá, és az inkubálást 25°C -on 3 napon át 12 fordulat/perc sebességgel folytattuk.

A mintákat az alábbiakban leírt HPLC 2. módszerrel elemezve a következő eredményeket kaptuk:

Minta	Termék: 10-dezacetil-taxol, mg/ml	Szubsztrát 7-xilozil- 10-dezacetil-taxol, mg/ml
Enzim nélkül	0,020	0,020
100 100 $\times$ g pellet	0,028	0,009

HPLC 2. módszer

Oszlop: Phase Separations Inc. (Norwalk, CT) microbore spherisorb phenyl $150 \times 2,0$ mm, $3\,\mu\text{m}$.
Mozgófázis: „A” oldószer: trifluor-ecetsavval pH=4-re állított kálium-dihidrogén-foszfát; „B” oldószer: acetonitril.

Idő (perc)	„A” oldószer (%)	„B” oldószer (%)
0	75	25
20	55	45
23	40	60
24	25	75
28	75	25

Oszlophőmérséklet: 35°C .

Detektálási hullámhossz: 230 nm.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás egy, a 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó hidroxicsoporthoz tartozó taxán előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 7-helyzetben közvetlenül kapcsolódó cukorcsoporthoz tartozó taxán egy, az említett cukorcsoporthoz tartozó hidroxicsoporthoz történő hidrolízist katalizálni képes mikroorganizmussal vagy az említett mikroorganizmusból származó enzimmel érintkezésbe hozunk, és a hidrolízist végrehajtjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként olyan taxánt használunk, amelyben a cukorcsoporthoz tartozó xilozilcsoporthoz tartozó taxán.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás egy, a 7-helyzetben hidroxicsoporthoz tartozó taxánként egy (I) általános képletű vegyület – mely képletben

R¹ jelentése hidroxil- vagy acil-oxi-csoport;

R² jelentése acil-oxi- vagy hidroxicsoporthoz; és

R³ és R⁴ jelentése egymástól függetlenül hidrogénatom, alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, cikloalkenil-, arilcsoporthoz tartozó taxán vagy heterociklusos csoport – vagy egy sójának előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy, a 7-helyzetben cukorcsoporthoz tartozó taxán (II) általános képletű taxán – mely képletben

R¹, R², R³ és R⁴ jelentése a fenti; és a

„cukor” jelentése egy, a 7-es szénatomhoz közvetlenül kapcsolódó cukorcsoporthoz tartozó taxán

vagy egy sóját érintkezésbe hozzuk az említett cukorcsoporthoz tartozó taxán a hidrolízist katalizálni képes mikroorganizmussal vagy ebből származó enzimmel.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (II) általános képletű vegyületként olyan taxánt alkalmazunk, amelyben a cukorcsoporthoz tartozó xilozilcsoporthoz tartozó taxán.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás az (I) általános képletű paclitaxel, 10-dezacetil-taxol, baccatin III, 10-dezacetil-baccatin III, cefalomannin, 10-dezacetil-cefalomannin, taxol C és/vagy 10-dezacetil-taxol C előállítására, *azzal jellemezve*, hogy (II) általános képletű taxánként 7-xilozil-taxolt, 7-xilozil-10-dezacetil-taxolt, 7-xilozil-baccatin III-at, 7-xilozil-10-dezacetil-baccatin III-at, 7-xilozil-cefalomannint, 7-xilozil-10-dezacetil-cefalomannint, 7-xilozil-taxol C-t és/vagy 7-xilozil-10-dezacetil-taxol C-t alkalmazunk.

6. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a hidrolízishez xilozilcsoporthoz tartozó taxán kiindulási anyagként xilozilcsoporthoz tartozó taxánok keverékét alkalmazzuk.

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a taxánok keverékét a Taxus nemzetséghez tartozó növények szöveteiből növényi sejtenyésztéssel és/vagy extrakcióval nyerjük ki.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a Flavobacterium, Acinetobacter, Moraxella, Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina, Oscillospira, Planococcus, Lactobacillus, Kurthia, Micrococcus, Stomatococcus, Staphylococcus, Arthrobacter, Neisseria vagy Kingella nemzetséghez tartozó mikroorganizmust alkalmazunk.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a Flavobacterium, Moraxella, Micrococcus vagy Bacillus nemzetséghez tartozó mikroorganizmust alkalmazunk.

10. A 9. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként a Moraxella sp. ATCC 55475-öt, Bacillus macerans ATCC 55476-ot, Bacillus circulans ATCC 55477-et vagy Micrococcus sp. ATCC 55478-at alkalmazzuk.

11. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a Flavobacterium, Acinetobacter, Moraxella, Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina, Oscillospira, Planococcus, Lactobacillus, Kurthia, Micrococcus, Stomatococcus, Staphylococcus, Arthrobacter, Neisseria vagy Kingella nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazunk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy egy, a Flavobacterium, Moraxella, Micrococcus vagy Bacillus nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazunk.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a Moraxella sp. ATCC 55475, Bacillus macerans ATCC 55476, Bacillus circulans ATCC 55477 vagy Micrococcus sp. ATCC 55478 mikroorganizmusból származó enzimet alkalmazzuk.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy paclitaxelt vagy paclitaxellé átalakítható taxánt állítunk elő.

15. Eljárás egy, a 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxánnak enzimés hidrolízissel a megfelelő 7-helyzetben hidroxicsoportot tartalmazó származékká való átalakítására képes mikroorganizmus kiválasztására, *azzal jellemezve*, hogy

i) kiválasztunk egy, a szelektálandó mikroorganizmus szaporítására alkalmas táptalajt;

ii) kiválasztunk egy indikátorglikozidot;

iii) a mikroorganizmust szaporítás céljából érintkezésbe hozzuk az i) lépés szerinti táptalajjal és az ii) lépés szerinti indikátorglikoziddal;

iv) teszteljük a mikroorganizmust a 7-helyzetben cukorcsoportot tartalmazó taxán hidrolízisére, és kiválasztjuk azokat a mikroorganizmusokat, melyek a fent megadott hidrolízisre képesek.

16. Moraxella sp. ATCC 55475 mikroorganizmus biológiailag tiszta tenyészet.

17. Bacillus macerans ATCC 55476 mikroorganizmus biológiailag tiszta tenyészet.

18. Bacillus circulans ATCC 55477 mikroorganizmus biológiailag tiszta tenyészet.

19. Micrococcus sp. ATCC 55478 mikroorganizmus biológiailag tiszta tenyészet.

20. Az 1. igénypont szerinti hidrolízisre képes, a Moraxella sp. ATCC 55475, a Bacillus macerans ATCC 55476, a Bacillus circulans ATCC 55477 vagy a Micrococcus sp. ATCC 55478 mikroorganizmusból izolált enzim.



