

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217930

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 P 29/00

(22) Přihlášeno 10 07 81
(21) (PV 5327-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 12 84

(75)

Autor vynálezu

PALEČKOVÁ FRANTIŠKA dr., VONDRÁČKOVÁ JITKA dr., ČULÍK KAREL dr.,
VONDRÁČEK MILOSLAV dr., PRAHA

(54) Kmen *Streptomyces rimosus* CCM 3506

Vynález se týká nového kmene *Streptomyces rimosus* CCM 3506, který transformuje 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.

Vynález se týká kmene *Streptomyces rimosus* CCM 3506, transformujícího 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin (doxycyklin), při kultivaci v tekutých živných půdách, obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku, např. sacharózu nebo škrob, zdroje asimilovatelného dusíku, např. kukuřičnou máčecí vodu nebo mouku kukuřičnou, bavlňovou či sojovou a minerální živné soli.

Zmíněný kmen umožňuje výrobu tetracyklinového antibiotika doxycyklinu biologickou cestou. Dosud běžně klinicky užívaná tetracyklinová antibiotika, tj. chlortetracyklin, tetracyklin a oxytetracyklin, mají velmi široké uplatnění, přesto však mají některé vlastnosti, které jejich použití brzdí. Jde např. o vysrážení ve formě nerozpustné báze, čímž poklesne absorpce, nežádoucí působení na střevní mikrofloru apod. Naproti tomu doxycyklin se rychle a úplně absorbuje, vytvoří při nižších dávkách vysokou koncentraci v krvi, je asi třikrát účinnější než dosud užívané tetracykliny.

6-deoxy-tetracykliny se dosud vyrábějí chemickou cestou (C. R. Stephens se sp., J. Am. Chem. Soc. 80, 5324, 1958; americký patentový spis č. 3 200 149), a to postupem, který je náročný na suroviny (drahé katalyzátory), na přístrojové vybavení a na dodržování fyzikálních parametrů.

Biologický postup má své přednosti i výhody pro svoji jednoduchost. Genetickou cestou se podařilo připravit kmen *Streptomyces rimosus*, schopný transformovat 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin. Anhydrotetracykliny lze snadno získat působením silné minerální kyseliny, například chlorovodíkové, z tetracyklinů.

Ve francouzském patentovém spisu č. 2 187 301 je popsána příprava kmene *Streptomyces alboflavus* a *lusitanus* transformující anhydrotetracykliny. Jako hlavní a podstatný znak přípravy je uvedena dokonalá dehydratace kultury.

Postup vedoucí k získání nového kmene podle vynálezu se liší rozdílným genetickým přístupem. Vychází ze znalosti biosyntézy tetracyklinu, zvláště pak z posledních dvou až čtyřech fází (P. A. Miller a sp., Bioch. Bioph. Res. Comm. 18, 325, 1965; americký patentový spis č. 3 433 709) a zaměřuje se na blokování poslední fáze, tj. biosyntézy oxytetracyklinu, přípravou variant neprodukcujících oxytetracyklin (OTC⁻). Kmeny OTC⁻ jsou z hlediska genetického dvojího typu: vzniklé buď zablokováním 5a,11a-dehydrogenázové aktivity a pak konečným produktem je 5a,11a-dehydro-5-hydroxytetracyklin nebo zablokováním hydrolázové aktivity (týká se hydroxylace v pozici 6) a vzniká 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin. Tudiž ne všechny OTC⁻ kmeny transformují anhydrooxytetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin, ale jen kmeny s porušenou hydroxylázovou a zachovanou 5a,11a-dehydrogenázovou aktivitou. Selekcí nebo mutagenním zásahem byly z kmenů OTC⁻ získány kmeny schopné transformace.

Kmen *Streptomyces rimosus* CCM 3506 byl připraven genetickými zásahy zaměřenými v první fázi na izolaci kmenů OTC⁻ a ve druhé fázi pak na kmeny schopné transformace. Výchozím kmenem byl kmen *Streptomyces rimosus* ATCC 10970. Pro mutagenní pokusy byly připravovány suspenze spor smytím kultury ze šikmého agaru spolurační půdy 10 ml sterilní destilované vody a třikrát promyty destilovanou vodou. Před použitím byla suspenze filtrována přes vatový filtr. 7 ml suspenze spor v Petriho misce o průměru 70 mm bylo ozařováno ze vzdálenosti 200 mm germicidní lampou Phillips TUV 40W po dobu 30s. Během pokusu byla suspenze míchána elektromagnetickým míchadlem. V pokusech přežívalo $1 \cdot 10^{-1}$ % spor. Izoláty z těchto pokusů byly vybírány podle toho, zda ztratily schopnost produkovat OTC, což se zjišťovalo screening testem. Z kolonií izolátů byly očkovány horní plošky válečků agarové sporulační půdy a ty kultivovány v Petriho miskách o průměru 100 mm. Misky jednoho pokusu byly uloženy ve skleněných krabicích s nádobkou s vodou, aby nevysychaly, a byly inkubovány 5 dnů při 28 °C. Poté byly přeneseny na testovací misky s kmenem *Bacillus subtilis* 6633 citlivým na OTC. Po 18 hodinách kultivace byly vybírány kmeny bez inhibičních zon, tj. kmeny OTC⁻.

Pro kmen *Streptomyces rimosus* ATCC 10970 bylo použito jako mutagenu pouze UV-záření. Z pokusů byl získán kmen OTC⁻, který se stal mateřským kmenem kmene *Streptomyces rimosus* CCM 3506 podle vynálezu. Z pokusů výše uvedeným testem byla zjištěna frekvence reverzí 1,5 %. Zbývající izoláty byly dále testovány screening testem podle schopnosti transformovat 5-hydroxy-anhydro-tetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin tak, že byly čárově očkovány na Petriho misky vždy jeden kmen na jednu misku a po 5denní kultivaci při 28 °C bylo do vzdálenosti 10 mm od kultury umístěno malé množství 5-hydroxy-anhydrotetracyklinu. Po dalších 20 hodinách působení při 28 °C byly misky hodnoceny podle barvy záření v ultrafialovém světle: 5-hydroxy-anhydrotetracyklin svítí citronově žlutě, 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin oranžově zlatě. Tímto testem byly vyloučeny kmeny netransformující.

Posledním testem bylo sledování vlastní transformace kultivací na třepačce ($3,83.s^{-1}$, výchylka 25 mm) při 26 až 38 °C, výhodně při 28 °C, ve dvou stupních. Vegetativní inokulum je kultivováno 30 hodin a jím v množství 3,3 % obj. očkována produkční fáze. Ta je kultivována za týchž podmínek jako vegetativní inokulum. Roztok 5-hydroxy-anhydrotetracyklinu ve směsi dimethylformamidu s vodou (1:1), v koncentraci 5 až 12 g/l lze přidat na začátku kultivace, výhodnější je však přidavek v době dobře narostlé kultury. Kultivace končí kolem 120. hodiny. Přítomnost 6-deoxy-5-hydroxytetracyklinu se testuje papírovou chromatografií nebo chromatografií na tenké vrstvě, v systému kyselina citrónová - n-butanol - chloroform. Výsledky chromatografie se potvrzují autobiografií, tj. přenesením chromatogramů jednotlivých kmenů na misky s testovacím kmenem *Bacillus subtilis* 6633, tedy biologickou účinností. Kmen *Streptomyces rimosus* CCM 3506 podle vynálezu se neliší morfologicky od výchozího kmene, je však odlišný svými fyziologickými vlastnostmi, které jsou projevem genetických změn: jde o neschopnost biosyntetizovat oxytetracyklin a o schopnost transformovat 5-hydroxyanhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.

Nový kmen *Streptomyces rimosus* byl uložen v československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, Tř. Obránců míru 10, pod č. CCM 3506.

V následujícím příkladu provedení je ilustrována kultivace nového kmene a provedení transformace 5-hydroxyanhydrotetracyklinu na 6-deoxy-5-hydroxy-tetracyklin.

P ř í k l a d p r o v e d e n í

Kulturou kmene *Streptomyces rimosus* CCM 3506 vyrostlou na šikmém agaru sporulační půdy Medium 196 Difco se kličkou spor očkuje 30 ml živné půdy ve varné baňce o objemu 500 ml. Tato půda má složení:

kukuřičná máčecí voda	1,0 % hm.
sacharóza	1,5
hydrogenfosforečnan amonný	0,2
dihydrogenfosforečnan draselný	0,2
síran hořečnatý krystalický	0,025
vodovodní voda do	100,0

pH před sterilizací 6,6, po sterilizaci (30 minut při 120 °C) asi 6,3. Kultivace na rotační třepačce ($3,83.s^{-1}$, výchylka 25 mm) při 28 °C trvá 30 hodin.

Získaným vegetativním inokulem se množství 3,3 % obj. očkuje 30 ml produkční půdy ve varných baňkách o objemu 500 ml tohoto složení:

kukuřičná máčecí voda	3,0 % hm.
sacharóza	1,25
chlorid vápenatý	0,95
hydrogenfosforečnan amonný	0,26
vodovodní voda do	100,0

pH před sterilizací 6,6, po sterilizaci (30 minut při 120 °C) asi 6,7.

Po naočkování se kultivuje na rotační třepačce ($3,83.s^{-1}$, výchylka 25 mm) při 28 °C, za 72 hodin se přidá 1,2 ml roztoku anhydroxytetracyklinu ve směsi dimethylformamid - voda (1:1), obsahujícího 250 mg anhydroxytetracyklinu v 1 ml. Po 48 hodinách se stanoví přítomnost 6-deoxy-5-hydroxytetracyklinu papírovou chromatografií a jeho biologická účinnost autobiografií.

Antibiotikum se převede do fermentační kapaliny okyselením na pH 1. Z čirého filtrátu se izoluje z kyselého prostředí jako sůl s aromatickou sulfokyselinou nebo při neutrálním pH jako komplex se zinkem nebo vápníkem a hořčíkem. Tyto sloučeniny se pak převedou na hydrochlorid. Celkový výtěžek operace je 50 až 55 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen *Streptomyces rimosus* CCM 3506 transformující 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.