Acta Pharmaceutica Hungarica 71 44–56. 2000.

Mikrobiológiai kutatások a magyar gyógyszeripar fejlesztésére

AMBRUS GÁBOR

Gyógyszerkutató Intézet Kft., 1325 Budapest, Postafiók 82.

Summary

Ambrus, G.: Microbiological research for the Hungarian pharmaceutical industry

A survey is presented on the last 50 years of biotechnological R & D activities in the Institute for Drug Research, Budapest. In the 1950s and 1960s this Institute played an important role in the industry of antibiotics in Hungary, contributing to the development of manufacturing processes for streptomycin, oxytetracycline, neomycin and nystatine. In the late 1950s a microbial screening program was initiated, which led to the discovery of several new antibiotics and the isolation of microorganisms producing medically important, known antibiotics and other therapeutical agents of microbial origin from natural sources. In the 1970s and 1980s the biotechnological research group elaborated new industrial processes for the production of several antibacterial antibiotics, such as gentamycin C, sisomicin, tobramycin, apramycin, kanamycin B and mupirocin and the antitumor antibiotic daunomycin. In the last 15 years new processes have been developed for manufacturing the immunosuppressants cyclosporin A and mycophenolic acid and the hypocholesterolemic agents mevinolin and pravastatin as well as recombinant hirudin, a thrombin inhibitor. Research on steroid bioconversions has also been continued from the mid 1950s up to now. In the early 1960s manufacturing processes were developed for the anti-inflammatory prednisolone and the anabolic drug methandrostenolone. The results on microbial transformations (stereoselective reduction, hydroxylation) were utilized in the synthesis of contraceptive drugs. Since the mid 1960s several new microbial processes have been discovered for the selective side chain cleavage of natural sterols, resulting in various key intermediates for the synthesis of a wide variety of steroid drugs.

Összefoglalás

Az elmúlt 50 évben a Gyógyszerkutató Intézetben az antibiotikumok, a mikrobiológiai eredetű enzim-inhibitorok és immunszuppresszánsok, valamint a szteroid biokonverziók kutatása területén elért eredményeket és ezek ipari hasznosítását mutatja be a közlemény.

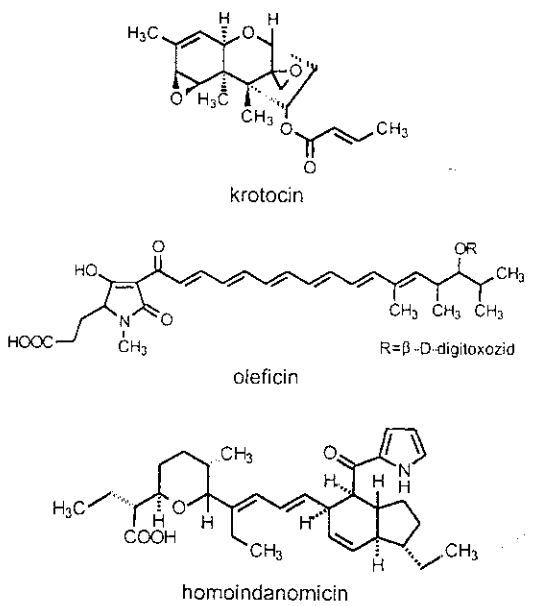
A Gyógyszerkutató Intézet megalapításától kezdve fontos szerepet játszott a magyar antibiotikum kutatás megalapozásában és elősegítette az antibiotikum gyártás kialakulását azáltal, hogy kutatói a sztreptomicin, az oxitetraciklin, a neomicin, a nisztatin és más, az antibiotikumok aranykorát képviselő gyógyszer hatóanyagok hazai ipari előállításában jelentős szerepet játszottak.

Az antibiotikum termelés módszereinek meghonosítása és fejlesztése céljából az intézeti mikrobiológiai kutatócsoport behatóan foglalkozott az említett antibiotikumokat termelő *Streptomyces* törzsek fiziológiájának tanulmányozásával. Így, például az oxitetraciklint termelő *Streptomyces rimosus*-nál vizsgálták a karbonkatabolikus represszió hatását az antibiotikum képződésre [1, 2]. Ugyancsak részletesen tanulmányozták az elágazó láncú esszenciális aminosavak metabolizmusának szabályozását a *Streptomyces rimosus*-ban, mert azt találták, hogy ez összefüggésben van az oxitetraciklin termelőképességgel [3, 4, 5]. Az elágazó láncú aminosavak bioszintetikus anyagcsere útjaira vonatkozó vizsgálataikat később kiterjesztették más mikroorganizmusokra, *Pseudomonas aeruginosa*-ra és *Escherichia coli*-ra is [6, 7].

1960-tól egy széleskörű mikrobiológiai screening programot indítottak az Intézetben, részben új anti-

biotikumok felfedezésére, részben azzal a céllal, hogy olyan taxonómiailag új mikroorganizmus törzseket izoláljanak, melyek gyógyászatilag értékes, ismert hatóanyagokat termelnek. A programban vizsgált mikroorganizmusok természetes forrásainak kiválasztása ökológiai, talajtani, éghajlati tényezők gondos figyelembevételével történt [8, 9, 10]

A screening program keretében számos, különböző szerkezeti típusba tartozó és eltérő hatásspektrumú új antibiotikum izolálására került sor. Ezek közül a gombaellenes szeszkviterpén antibiotikum, a krotocin [11, 12], a baktérium elleni, polién szerkezeti típusú oleficin [13, 14, 15] és a fém-kationokat hordozó pirrol-éter szerkezeti csoportba tartozó homoindanomicin [16] szerkezeti képletét az *1. ábrán* mutatjuk be.



1 ábra Néhány kiválasztott antibiotikum szerkezete a Gyógyszerkutató Intézetben izolált új antibiotikumok közül

A screening munka során az izolált bioaktív metabolitok gyors, kémiai azonosításának megkönnyítésére adatbázist létesített Intézetünk a National Cancer Institute-tal (Bethesda Md., USA) együttműködve 1975–76-ban. Ez az adatbank, mely az Intézet antibiotikum kutatásának korai, lyukkártya rendszerű dokumentációs rendszerén alapult és „Bioactive Natural Product Database" néven vált ismertté, magában foglalja az összes ismert bioaktív, mikroorganizmusok által, illetve tengeri organizmusok által termelt metabolitot, valamint a magasabb rendű növények és szárazföldi állatok által bioszintetizált antimikrobiális, tumorgátló és antivirális hatóanyagokat [17, 18, 19].

Az adatbázisban jelenleg több mint 38 000 bioaktív, természetes eredetű termék – ebből mintegy 22 000 mikrobiológiai eredetű metabolit, 10 000 növényekből, 5 000 tengeri organizmusokból és 1 000 szárazföldi állatokból származó hatóanyag – jellemző adatai vannak összegyűjtve. Az adatbázis számítógéppel kereshető formában tartalmazza a termékek eredetét (termelő faj), fizikai és kémiai tulajdonságait (beleértve az UV-színképet), biológiai aktivitását (antimikrobiális spektrum, tumorgátló, illetve vírus ellenes hatás adatok), farmakológiai és toxikológiai tulajdonságait.

A 80-as években az adatbázis antibiotikumokra vonatkozó része könyvsorozat formájában lett publikálva [20]. Éveken át az adatbank a már publikált metabolitokra vonatkozó új adatokkal, valamint az újonnan leírt vegyületekkel folyamatosan ki lett egészítve és 1987-től a tudományos kutatók számára hozzáférhetővé vált a Medimpex-től megrendelhető szolgáltatásként.

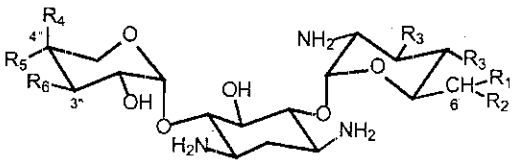
Mikrobiológiai screening programunk keretében jelenleg új makrolid szerkezetű angiogenezis inhibitorok kutatásával foglalkozunk, melyek tumorok metasztázisainak kifejlődését gátolják [21]. E kutatási programban a Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Pathológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetével működünk együtt.

Az új mikrobiológiai eredetű hatóanyagok kutatásával párhuzamosan, a magyar gyógyszeripar elvárásainak eleget téve biotechnológiai kutató-fejlesztő tevékenységünk nagyon jelentős részben, ismert, terápiásan fontos antibiotikumok és nagy értékű, ismert mikrobiológiai eredetű gyógyszerek gazdaságos, új előállítási eljárásainak kifejlesztésére irányult.

A magyar antibiotikum termeléshez való hozzájárulásunkat az elmúlt három évtizedben az *I. táblázatban* foglaltuk össze.

I. táblázat

Széles antibakteriális spektrumú aminoglükozid-antibiotikumok
gentamicin C komplex
sziszomicin
tobramicin
kanamicin B
apramicin
Helyi alkalmazású, baktérium ellenes antibiotikum
mupirocin
Tumorgátló antibiotikum
daunomicin
Finomvegyszerként használt antibiotikumok
aktinomicin D
mitramicin
oligomicin
tiosztrepton



Antibiotikum	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
6'-Metilgentamicin A	CH_3	OH	OH	H	OH	$NHCH_3$
6'-Metilgentamicin A_1	CH_3	OH	OH	OH	H	$NHCH_3$
3"-N-Demetilgentamicin C_2	CH_3	NH_2	H	OH	CH_3	NH_2
4"-Demetilgentamicin C_1	CH_3	$NHCH_3$	H	OH	H	$NHCH_3$
4"-Demetilgentamicin C_2	CH_3	NH_2	H	OH	H	$NHCH_3$
4"-Demetilgentamicin C_{1a}	H	NH_2	H	OH	H	$NHCH_3$

2. ábra. A gentamicin antibiotikum-komplex új komponensei

A 70-es években aminoglikozid-antibiotikumokkal kapcsolatos kutatásaink eredményeként új gyártási eljárást fejlesztettünk ki több széles spektrumú antibiotikum, a humán gyógyászatban alkalmazott gentamicin C-komplex [22, 23], a sziszomicin [24, 25], a tobramicin [26, 27], valamint az állatgyógyászatban, illetve súlyhozam növelésben használt apramicin és kanamicin B [26] előállítására. Ezeket az eljárásokat a Chinoin és a Biogal Gyógyszergyárak hasznosították antibiotikum termelésükben.

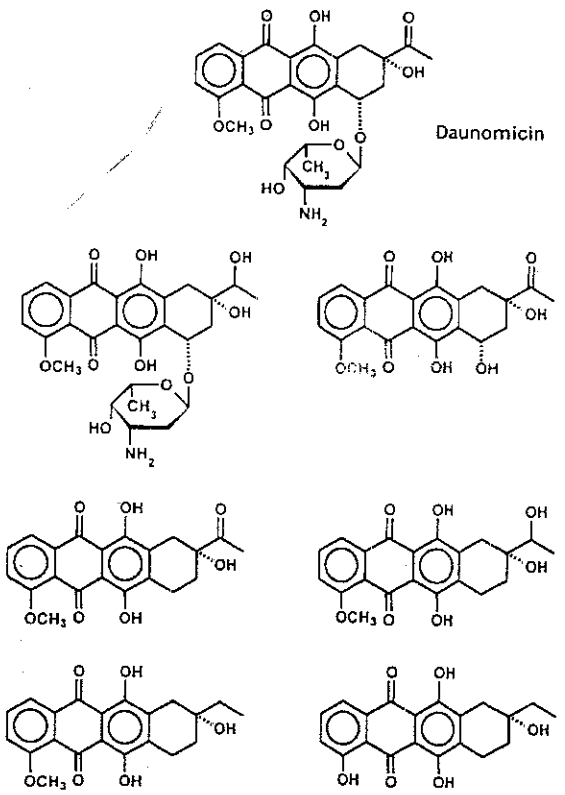
A fenti aminoglikozid-antibiotikumok gyártási technológiájának kifejlesztése során számos új, minorkomponensként jelentkező antibiotikumot izoláltunk. A 2. *ábrán* a gentamicin-komplexből elkülönített új komponensek képletét láthatjuk [28].

Az aminoglikozid-antibiotikumok fermentációs előállítási eljárásainak kifejlesztéséhez új kromatográfiás [29] és mikrobiológiai [30] módszereket dolgozott ki kutatócsoportunk a fermentlevekben lévő antibiotikum-komplexek vizsgálatára és komponenseik mennyiségi meghatározására.

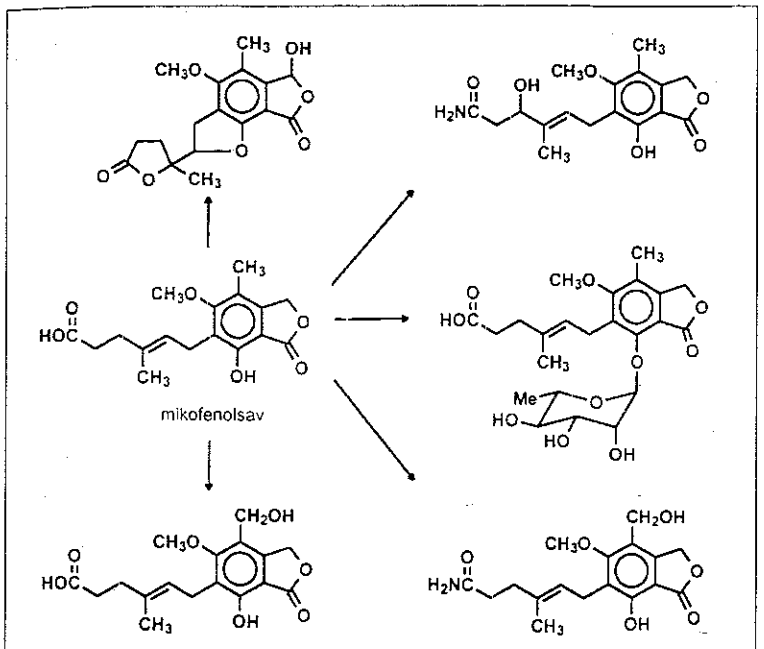
A mikrobiológiai screening programunk első szakaszában aktinomiceta törzsek tenyészetéből izoláltunk antibiotikumokat. A 80-as évek közepén antibiotikumot termelő baktériumok izolálására indítottunk kutatási programot. 1987-ben izoláltunk egy pszeudomonsav antibiotikum-komplexet termelő baktérium törzset és később fermentációs eljárást fejlesztettünk ki a mupirocin antibiotikum ipari előállítására, amely a fő komponense a pszeudomonsav-komplexnek [31, 32].

A mupirocin különleges hatásmechanizmussal, az izoleucil-t-RNS-szintetáz enzim gátlása útján nagyon hatásos a Gram-pozitív baktériumok ellen. 1985-ben vezette be a Beecham cég bőrfertőzések kezelésére lokálisan alkalmazható antibiotikumként. Eljárásunk a Biogal Gyógyszergyárban került hasznosításra.

Új tumorgátló antibiotikumok keresését célzó kutatási programunk keretében 1976-ban izoláltunk egy daunomicint termelő *Streptomyces coerulescens* törzset. Erről a fajról korábban nem volt ismeretes, hogy daunomicint termel [33]. A daunomicinnek és e törzs által termelt metabolitjainak képletét a 3. *ábra* mutatja. Az antraciklin szerkezeti típusú antibiotikumok kutatását folytatva a 80-as években eljárást dolgoztunk



3. ábra. A daunomicinnek és metabolitjainak előállítása Streptomyces coerulescens-szel



4 ábra A mikofenolsav mikrobiológiai átalakítása

ki a daunomicin előállítására. A daunomicin a doxorubicin rákelleni gyógyszer szintézisének kulcsintermedierjeként került hasznosításra.

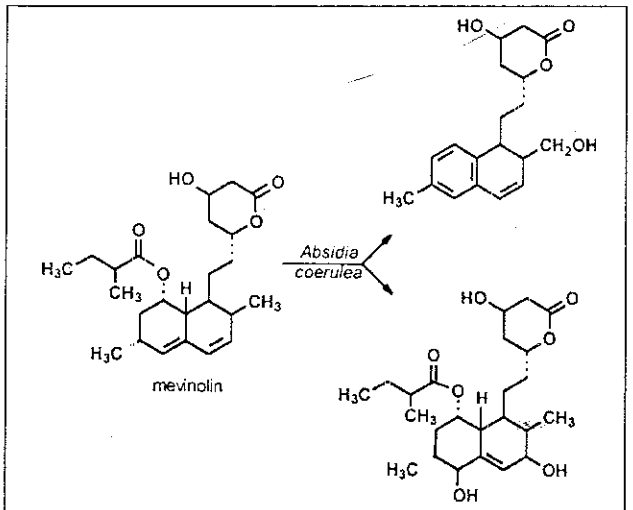
Ugyancsak kifejlesztettünk fermentációs eljárásokat az aktinomicin D, a mitramicin, az oligomicin és a tiosztrepton előállítására. Ezeket az antibiotikumokat részben Intézetünk kísérleti üzeme, részben a Reanal Finomvegyszergyár gyártotta és az utóbbi forgalmazta finomvegyszerként.

Kutatócsoportunk új genetikai módszereket (protoplasztfúzió, *in vitro* rekombinációs technikák) [34, 35, 36, 37] vezetett be a tradicionális mutagén kezelések mellett az antibiotikumot termelő aktinomiceták, baktériumok és fonalas gombák termelőképességének fokozására az MTA Biológiai Kutatóközpont Genetikai Intézetével és a Szegedi Egyetem Mikrobiológiai Tanszékével együttműködve.

Az elmúlt három évtizedben intenzív kutatás folyt világszerte a gyógyászat legkülönbözőbb területein alkalmazható új, mikrobiológiai eredetű gyógyszerek felfedezésére. Az első, nagyjelentőségű eredményt a Sandoz gyógyszervállalatnál érték el a ciklosporin A immunszuppresszáns felfedezésével, mely szervátültetéseknél az új szerv befogadását teszi lehetővé a szervezet immunreakcióinak csökkentésével.

Mikrobiológiai screening tevékenységünkre alapozva a 80-as évek közepén kutatási fejlesztési programot indítottunk mikrobiológiai eredetű immunszuppresszánsok előállítására. 1988-ban kifejlesztettünk egy új, gazdaságos eljárást a ciklosporin A ipari termelésére [38, 39], melyet azóta a Biogal Gyógyszergyárban hasznosítanak.

1995-ben a mikofenolsav morfolinoetilészterszármazékát a Syntex-Roche cég forgalomba hozta immunszuppresszánsként, melyet a ciklosporin A-val kombinálva veseátültetéseknél alkalmaznak. A mikofenolsav a guanin bioszintézis inhibitora és ennek folytán baktérium és gomba elleni hatású is. Antibiotikum screening programunkban izoláltunk egy mikofenolsavat termelő fonalas gomba törzset, mely taxonómiailag, faji szinten különbözik az ismert mikofenolsavat bioszintetizáló gombáktól. Az elmúlt három évben kidolgoztunk egy gazdaságos mikofenolsav gyártási eljárást az általunk izolált és termelőképességében genetikailag fejlesztett törzzsel [40].



5. ábra A mevinolin mikrobiológiai átalakítása

Jelenleg a mikofenolsav biokonverziós módszerrel történő módosításával foglalkozunk, azzal a céllal, hogy új, megnövelt hatású mikofenolsav metabolitokat állítsunk elő. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az aromás gyűrűn lévő metilcsoporton, a laktongyűrűn és az oldalláncon is megfigyelhető hidroxilezés a mikofenolsav molekuláján, továbbá a karboxilcsoport amidálása és glükozid képződés is észlelhető *Streptomyces* törzsekkel végzett átalakítások során, amint az a *4 ábrán* látható [41].

A 80-as évek végén a mikrobiológiai eredetű koleszterin bioszintézis inhibitorok váltak a terápiásan legértékesebb csoportjává az atherosclero-

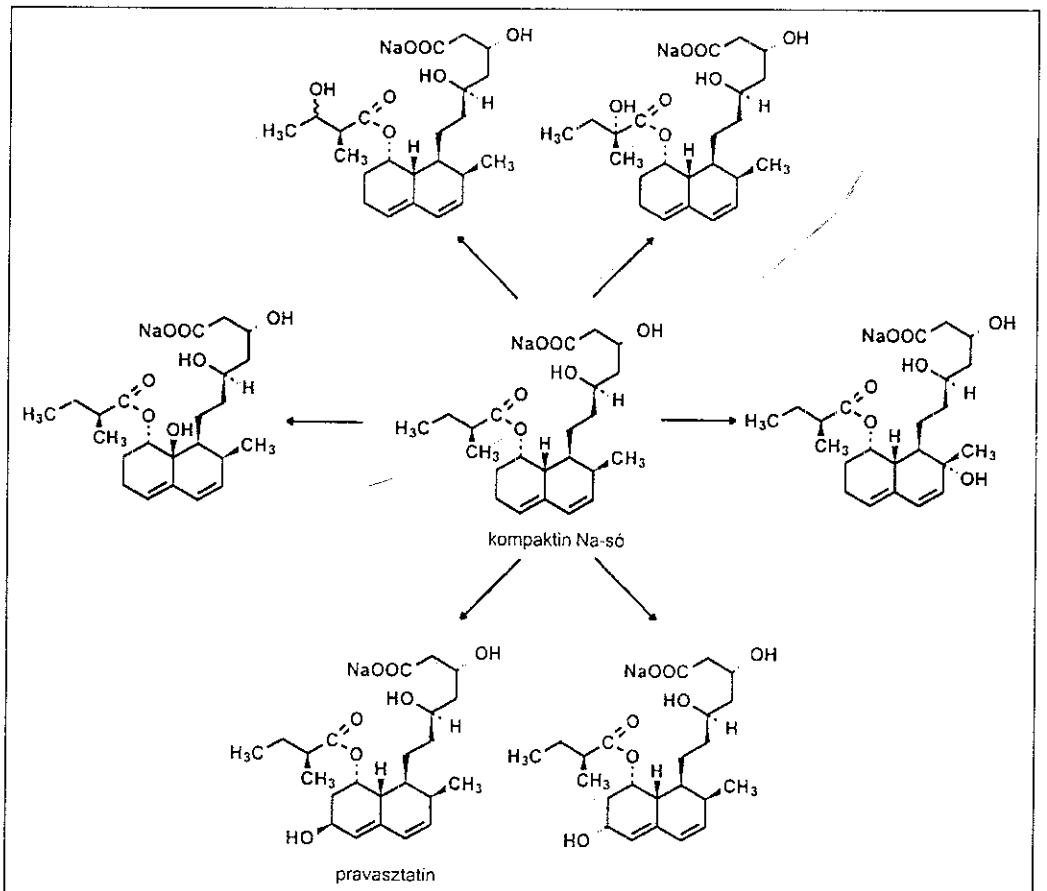
sis kezelésére alkalmazott gyógyszereknek Az elmúlt évtizedben kutatócsoportunk nagyon intenzíven foglalkozott olyan új eljárások kidolgozásával, melyekkel gyógyászatilag fontos, ismert koleszterin bioszintézis-inhibitorok állíthatók elő Először kifejlesztettünk egy gazdaságos, új fermentációs eljárást a mevinolin előállítására [42]. Eljárásunkat a Biogal Gyógyszergyár hasznosítja

Új mevinolin-származékok mikrobiológiai előállításával is foglalkozott kutatócsoportunk E munkának egy részét, a mevinolin mikrobiológiai átalakítását *Absidia coerulea* gombatörzzsel az 5. *ábra* mutatja [43]. Ez a fonalas gombatörzs két terméket állít elő mevinolinból, az egyik biológiailag aktív termék képződésénél a mevinolin 2-es helyzetű metilcsoportját hidroxilezi a gombatörzs, eliminálja a 2-metil-butilészter-csoportot és egyúttal a mevinolin egyik gyűrűjét aromatizálja A másik metabolit, az ugyancsak hatásos 3,5-dihidroxi-származék, a 4a,5-epoxi-származék képződését követően víz felvétellel jön létre.

A koleszterin bioszintézis inhibitorok kutatási programját folytatva, új eljárást fejlesztettünk ki a mevinolinnál szelektívebb hatású és kevésbé toxikus pravasztatin, 2. generációs koleszterin-szint csökkentő gyógyszer előállítására.

Kutatócsoportunk először egy új fermentációs eljárást dolgozott ki a pravasztatin kulcsintermedierjének, a kompaktinnak előállítására [44, 45], melyből mikrobiológiai konverzióval nyerhető a pravasztatin. Több ezer, természetes forrásokból izolált gomba és aktinomiceta törzzsel kíséreltük meg a kompaktin hidroxilezését A 6. *ábrán* látható, hogy a kompaktin több pozícióban, mind a biciklusos részen, mind a 2-metilbutiril-oldalláncon hidroxilezhetőnek bizonyult E program során sikerült kiválasztanunk olyan fonalas gomba, illetve actinomiceta fajokhoz tartozó törzseket, melyekről korábban nem volt ismert, hogy a kompaktint pravasztatinná tudják átalakítani [46, 47]

A 80-as évek végén kutatócsoportunk, kooperációban az MTA Biológiai Központ Genetikai Intézetével, új eljárást fejlesztett ki a trombin inhibitor, rekombináns hirudin előállítására [48] Új expressziós és szekréciós rendszert dolgoztunk ki a rekombináns hirudin bioszintézisére *Saccharomyces cerevisiae* és *Saccharomyces bayanus* gazdaorganizmusokban A pióca véralvadást gátló hirudin-komplexéből a legaktívabb HV-1 jelű, 65 aminosavból álló peptid-komponens deszulfatált-származékának szintetikus úton előállított génjét expresszáltuk Az eljárás során a rekombináns hirudin a fermentlébe szekretálódik és onnan nagy tisztaságban izoláltuk a gazdaorganizmus karboxipeptidáz enzimjeinek hatására kis mennyiségben keletkező melléktermékektől való elválasztás után [49] A deszulfáto-hirudin expresszióját megvalósítot-



6. ábra A kompaktin mikrobiológiai hidroxilezése

tuk *Escherichia coli*-ban és *Streptomyces lividans*-ban is [48].

Az 50-es évek közepén *Wix György* kezdeményezésére indult mikrobiológiai kutatás intézetünkben az ipari szteroid-gyógyszer szintézisek támogatására. Az intézetünkben kidolgozott szteroid biokonverziós eljárások közül először az 1,4-androsztadién-3,17-dion ösztron-szintézis intermedier progeszteronból való előállítása valósult meg *Fusarium caucasicum* gombatörzs alkalmazásával a Richter Gedeon Vegyészeti Gyárban 1959-ben. Ismeretes volt korábban, hogy különböző fonalas gombatörzsek képesek a progesztront 1,4-androsztadién-3,17-dionná és 17a-oxa-D-homo-1,4-androsztadién-3,17-dionná lebontani. Az intézeti kutatóknak a nem kívánt 17a-oxa-D-homo-1,4-androsztadién-3,17-dion képződését előidéző oxidációt β-naftolnak a fermentléhez való adagolásával sikerült meggátolniuk és az 1,4-androsztadién-3,17-diont jó hozammal előállítaniuk [50, 51]. Az 1,4-androsztadién-3,17-dion fermentléből történő izolálása során megfigyelték, hogy az 1,4-androsztadién-3,17-dion és a β-naftol különböző oldószerekben 1:1 arányú molekulavegyületet képez. Ez a megfigyelés jól hasznosítható volt az 1,4-androsztadién-3,17-dion tisztításában [52]. A molekuláris komplex szerkezetét röntgen-krisztallográfiával vizsgáltuk és azt találtuk, hogy a β-naftol hidroxilcsoportja erős hidrogén kötéssel lineárisan kapcsolódik a szomszédos szteroid molekula 3-as helyzetű konjugált karbonil-csoportjához [53].

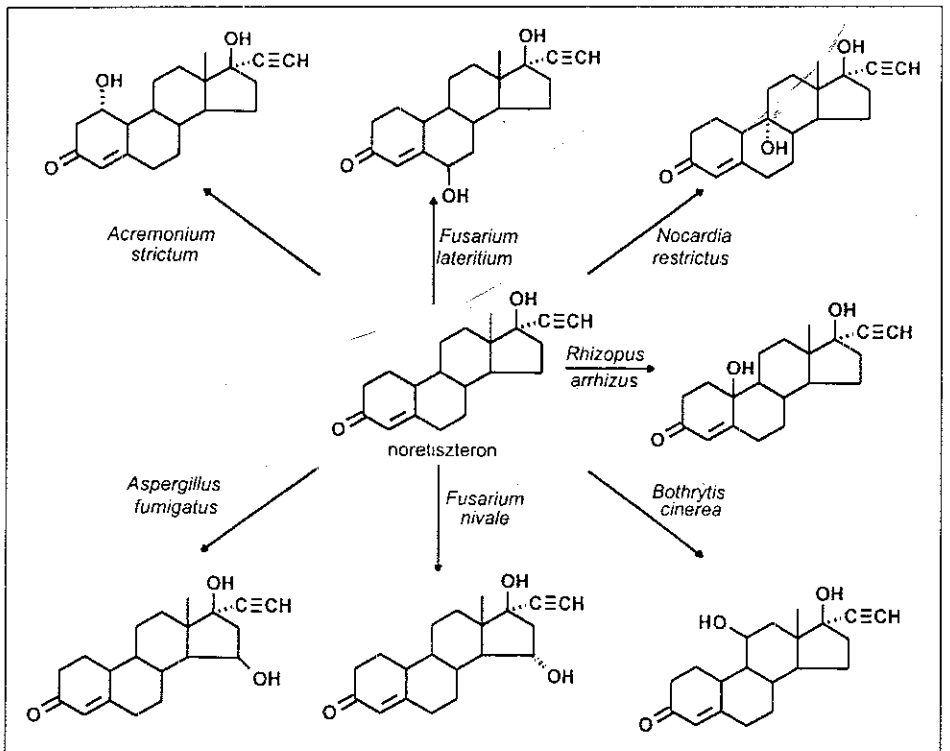
Az 50-es évek végén a hidrokortizon, a 9α-fluor-16α-hidroxi-hidrokortizon és a metiltesztoszteron Δ^1-dehidrogénezése iparilag nagyon értékes fermentációs eljárásokká váltak a gyulladásgátló és az anabolikus hatású gyógyszerek előállításában. Nem sokkal ezt követően kutatócsoportunk gazdaságos Δ^1-dehidrogénezési eljárásokat fejlesztett ki a prednizolon és a metandrosztenolon gyártására a 3-oxo-szteroid-Δ^1-dehidrogenáz indukciójával és a termék-gátlás felfüggesztésével [54, 55]. Gyors analitikai módszereket is kidolgoztak, melyek elősegítették a Δ^1-dehidrogénezési eljárások fejlesztését a termékek fermentlében való felhalmozódásának folyamatos követésével [56, 57, 58].

Mind a három eljárás a Richter Gedeon Gyárban került alkalmazásra. A prednizolon és a metandrosztenolon, Nerobol® néven a gyár tradicionális termékeivé váltak.

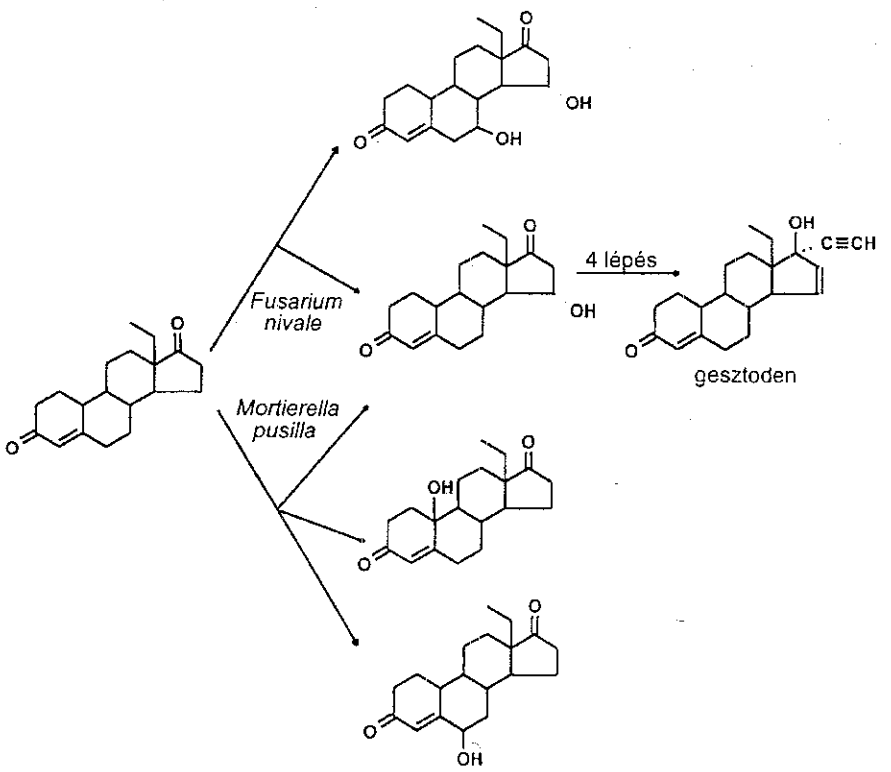
Több mikrobiológiai szteroid-hidroxilezési eljárást kidolgoztak intézetünkben, néhányat ezek közül röviden ismertetek.

A progeszteron 11α-hidroxilezése *Rhyzopus nigricans* gombatörzzsel, melyet *Peterson* és *Murray* 1952-ben közölt, volt az első iparban használt mikrobiológiai hidroxilezési eljárás. Laboratóriumunkban ennek a mikroorganizmusnak az immobilizált sejtjeit alkalmazták a fenti hidroxilezésre 1959-ben [59]. Ez a módszer egy korai példája az immobilizált enzimekkel végzett reakcióknak.

A 70-es évek elején kutatócsoportunk különböző fogamzásgátlók mikrobiológiai hidroxilezésével foglalkozott abból a célból, hogy ezekből új bioaktív metabolitokat állítson elő. A 7 *ábrán* a noretiszteron mikrobiológiai hidroxilezését mutatom be. A noretiszteron molekulájának különböző po-



7. ábra. A noretiszteron mikrobiológiai átalakítása



8 ábra A 13β-etil-4-gonén-3,17-dion hidroxilezése Fusarium nivale és Mortierella pusilla fonalas gomba törzsekkel

zícióiba sikerült hidroxilcsoportot beépíteni nagyszámú gomba és baktérium törzzsel kísérelve meg a biokonverziót [60, 61, 62] Az új biokonverziós termékek közül az 1α-hidroxi-noretiszteront vizsgálva azt találtuk, hogy erős fogamzásgátló hatású, gátolja a megtermékenyített pete beágyazódását a méhbe [60/a].

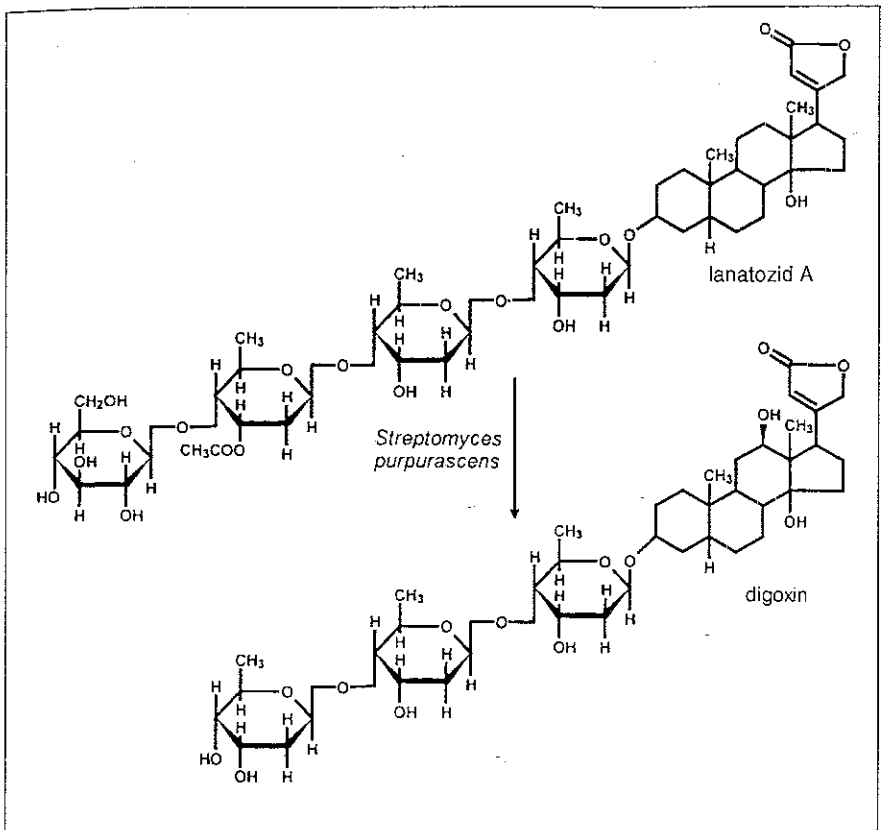
E munka során nyert kísérleti tapasztalatainkat alkalmazva később egy hidroxilezési eljárást dolgoztunk ki *Fusarium nivale* gombatörzzsel a 15α-hidroxi-13β-etil-4-gonén-3,17-dion előállítására, amely a gestoden fogamzásgátló gyógyszer szintézisének kulcsintermedierje [63] Az eljárás kidolgozására végzett kísérleteket a *8. ábrán* foglaltuk össze.

A *9. ábra* mutatja a gyógyászatilag értékes szívglükozidnak, a digoxinnak az Intézetünkben kidolgozott előállítását lanatozil A-ból *Streptomyces purpurascens* alkalmazásával [64] Ez az eljárás 12β-helyzetű hidroxilezést, valamint az acetil-csoport és a glükóz szerkezeti elemek lanatozid A-ról való lehasítását foglalja magába.

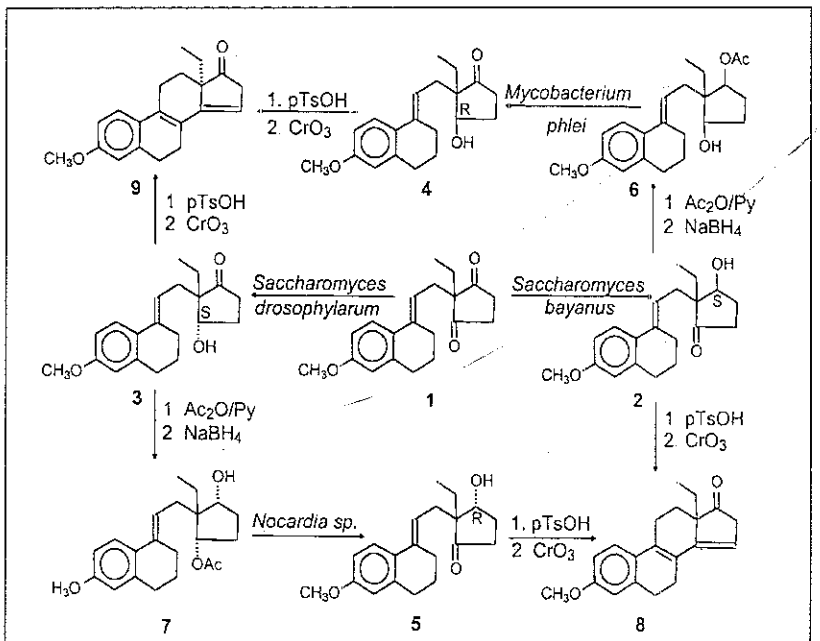
A 70-es években *Toldy Lajos* vezetésével az intézeti szteroid kutatócsoport új gazdaságos totálszintetikus eljárást dolgozott ki a norgesztrel fogamzásgátló előállítására a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár számára, a Smith-Torgov szintézis módosításával [65]. Ez utóbbi szintézis racém 19-norszteroidokhoz vezet *Gibian és mtsai* e szintézisnek a természetes szteroidokhoz vezető változatát dolgozták ki, a szintézis prokirális, ún. szekodion kulcsintermedierjét sztereoszelektív mikrobiológiai redukcióval egy új, optikailag aktív intermedierré alakítva. Mikrobiológiai kutatócsoportunk is részletesen tanulmányozta e kulcs-intermedier mikrobiológiai redukciójának lehetőségeit, e munka eredményeit a *10 ábrán* foglaltuk össze Elméletileg négy optikailag aktív alkohol-izomer keletkezik, ha a szekodion ciklopentán gyűrűjén lévő ketoncsoportjaiból monohidroxi-származékokat állítunk elő redukcióval *Gibian és mtsai* mikrobiológiai redukcióval a **2** és **3** jelű alkohol származékokat állították elő, amelyekben az újonnan keletkezett királis centrumok S-konfigurációjúak Kutatócsoportunk azt találta, hogy e két alkohol-izomeren kívül a **4** és **5** jelű alkohol származékok is előállíthatók kémiai és enzimatikus reakciók kombinációjával A **2** és **5** alkohol-izomerek savas gyűrűzárása természetes szteroidokhoz, míg a **3** és **4** jelű alkohol származékok savas kezelése *ent-szteroidokhoz* vezet [66]

A 80-as évek óta a szteroid gyógyszerek többségének ipari szintézise szitoszterinből mikrobiológiai oldallánc eltávolítással képződő biokonverziós termékekből, mint kulcsintermedierekből indul ki A szterinek szelektív oldalláncának eltávolítására irányuló kutatások a 60-as években kezdődtek, amikor már előre látható volt, hogy az általánosan használt szintézis kiindulási anyag, a dioszgenin hamarosan már csak korlátozottan fog rendelkezésre állni a növekvő szteroid ipar számára.

1965-ben kutatócsoportunk úttörő munkát vé-



9. ábra Szívglükozidok mikrobiológiai átalakítása

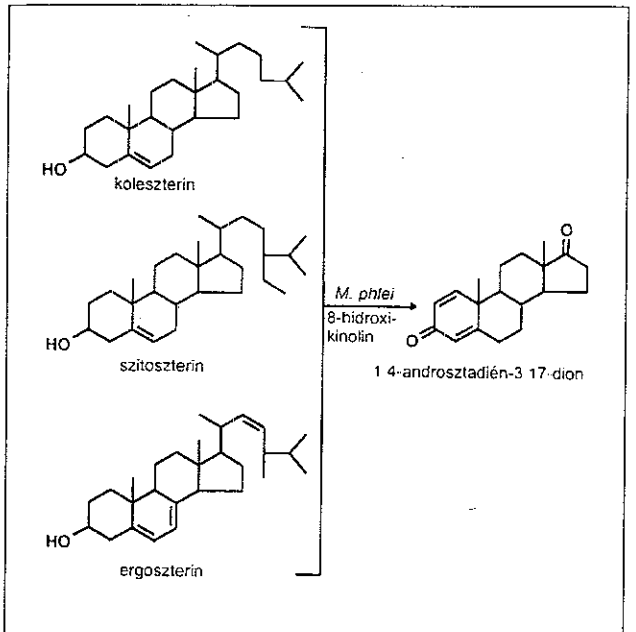


10 ábra Nat- és ent-13β-etil-gonán-származékok előállítása 13-etil-3-metoxi-8,14-szeko-1,3,5(10),9(11)-gonatetraén-14,17-dionból

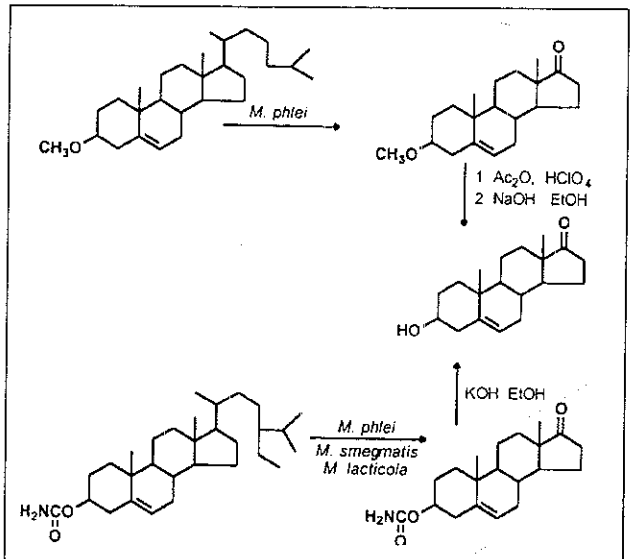
gezve ezen a kutatási területen kifejlesztette egyikét az első mikrobiológiai eljárásoknak a természetes szterinek oldalláncának szelektív lebontására *Mycobacterium phlei*-vel végzett biokonverzióval. Ebben a mikrobiológiai átalakításban a szteránváz felhasítását kiváltó 9α-hidroxiláz enzim gátlásával sikerült elejét venni a váz lebomlásának E kulcsenzim működésének meggátlását 8-hidroxikinolinnak a fermentléhez való hozzáadásával sikerült elérni. Amint az a *11 ábrán* látható, eljárásunkkal a koleszterin, a szitoszterin és az ergoszterin készségesen átalakítható volt 1,4-androsztadién-3,17-dionná, az ösztron szintézisének intermedierjévé [67, 68, 69]

A 70-es években új eljárásokat fejlesztettünk ki az androgén és anabolikus gyógyszerek és a spironolakton szintézisében hasznosítható kulcsintermedier, a dehidroepiandroszteron előállítására. Azt találtuk, hogy a természetes szterinek 3-alkiléter származékainak [70] és 3-karbamoil-származékainak oldallánca [71] szelektíven lehasítható szterinlebontó mikobaktériumokkal Ennek az az oka, hogy a 3-oxo-1,4-dién-szerkezetű A-gyűrűhöz vezető bakteriális metabolizmus, mely előfeltétele a szteránváz lebomlásának, a védőcsoportok jelenléte miatt nem alakulhat ki. A biokonverzió után a védőcsoportok kémiai eltávolításával képződik a dehidroepiandroszteron Eljárásainkat a *12 ábrán* mutatjuk be.

A 70-es évek első felében a Searle és az Upjohn gyógyszervállalatok kutatócsoportjai egy másik módszert fedeztek fel a szteránváz lebomlásának kivédésére. Ezek a kutatócsoportok mutagén kezeléssel olyan mutánsokat szelektáltak szterinlebontó baktériumokból, amelyek elvesztették 9α-hidroxiláz és/vagy Δ^1-dehidrogenáz aktivitásukat. Ezen enzimek hiányában a mutánsok nem bontották le a szterán-



11. ábra. Természetes szterinek biokonverziója 1,4-androsztadién-3,17-dionná Mycobacterium phlei-vel



12. ábra. Dehidroepiandroszteron előállítása természetes szterinekből

vázat. Ennek az elvnek az alkalmazásával Intézetünk kutatócsoportja új szitoszterin biokonverziós eljárásokat fejlesztett ki a 4-androsztén-3,17-dion és a 9α-hidroxi-4-androsztén-3,17-dion előállítására, melyek az androsztánvázas vegyületek, ill. kortikoszteroidok szintézisében használhatók kulcsintermedierekként. Ezeket az eljárásokat a Richter Gedeon Vegyészeti Gyárban ipari méretben megvalósították és hasznosítják [72, 73, 74].

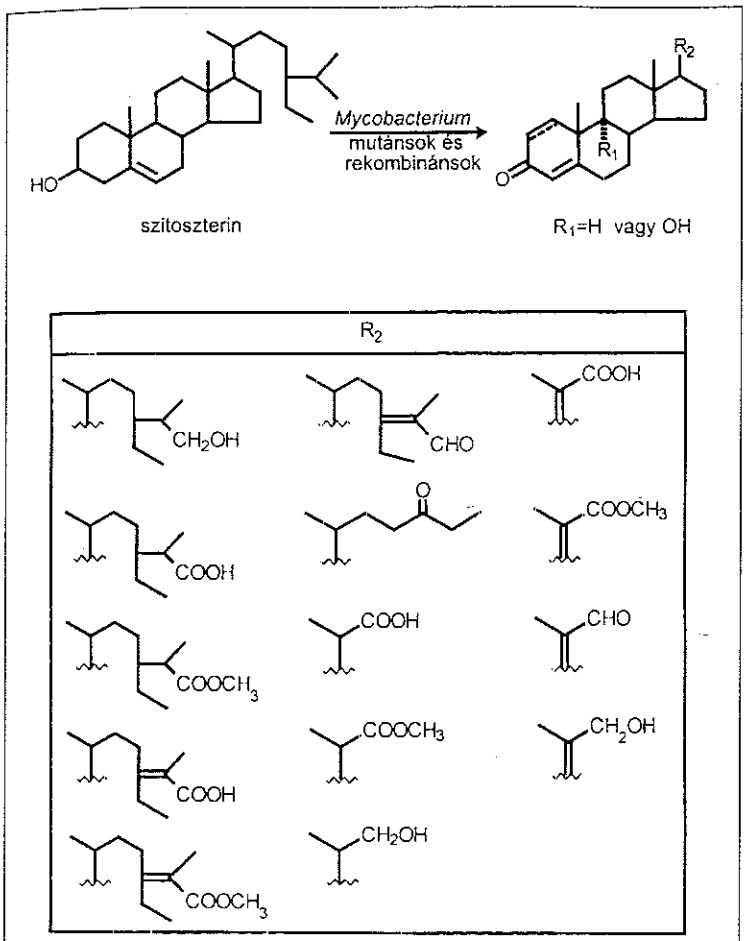
Kutatócsoportunk bekapcsolódott különböző természetes szterinek oldallánc-lebomlási mechanizmusának kutatásába, főként az oldallánc lebomlás kezdeti lépéseinek a vizsgálatába [75, 76, 77, 78] Tanulmányoztuk a lánc végén, a 26-os szénatomon bekövetkező mikrobiológiai hidroxilezés sztereokémai lefolyását Röntgen krisztallográfiás vizsgálatokkal kimutattuk, hogy a sztigmasztán vázas szterinekben (szitoszterin, sztigmaszterin) a 26-os szénatomon végbemenő hidroxilezés eredményeként R-konfigurációjú királis centrum keletkezik a prokirális 25-ös helyzetű szénatomon. Ezzel szemben az ergosztánvázas szteroidok (ergoszterin) esetében a láncvégi hidroxiláció S-konfigurációjú királis centrumot hoz létre a 25-ös helyzetű szénatomon Ez a megfigyelés azzal a ténnyel magyarázható, hogy a sztigmasztán-, illetve az ergosztánvázas szteroidok esetében az oldalláncban, a 25-ös szénatom szomszédságában elhelyezkedő 24-es helyzetű királis szénatom konfigurációja különböző.

A szitoszterin biokonverziójával a *13. ábrán* látható, nagyszámú, részlegesen lebontott oldalláncú mikrobiológiai átalakítási terméket állítottunk elő olyan genetikailag módosított mikobaktérium törzsekkel, melyeket szterinlebontó mikobaktériumok auxotróf és antibiotikum rezisztens mutánsaiból protoplasztok képzésével és fúziójával állítottunk elő [79] A lebontási termékek oldalláncai a lánchosszban és a láncon lévő funkcionális csoportokban különböznek egymástól.

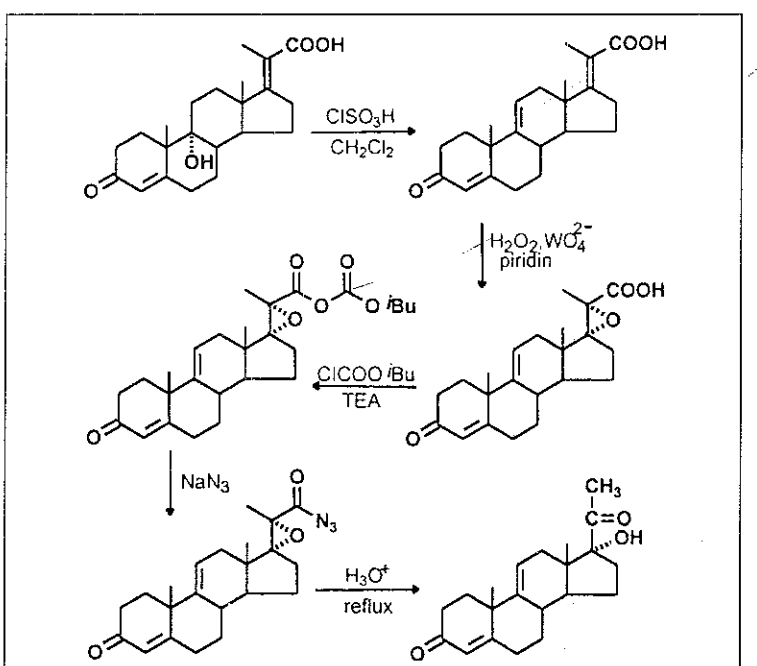
Tanulmányoztuk pregnánszármazékok új szintetikus előállításának lehetőségeit a szitoszterinből részleges oldallánc lebontással nyert 17(20)-dehidro-23,24-dinorkolánsavakból. Kifejlesztettünk egy új eljárást a 17(20)-dehidro-23,24-dinorkolánsavak katalitikus oxidatív dekarboxilezésére 16-dehidro-20-oxo-pregnán-származékokká hidrogén-peroxiddal, molibdát, ill. wolframát ionok jelenlétében lúgos-vizes közegben végzett reakcióval [80]

A 40-es évektől a dioszgeninből iparilag előállított 16-dehidro-20-oxo-pregnán-származékokat széles körben különböző ipari szteroidszintézisek kulcsintermedierjeiként alkalmazzák Új eljárásunk így hasznos eszközt szolgáltatott az iparilag értékes pregnán-származékok szitoszterinből kiinduló szintézisére.

Ugyancsak kidolgoztunk egy új szintézist a 17α-hidroxi-20-oxo-pregnán-származékok 17(20)-dehidro-23,24-dinorkolánsavakból való előállítására Ezt a szintézist, amelyben a 9α-hidroxi-3-oxo-23,24-dinorkola-4,17(20)-dién-22-savat használtuk kiindulási anyagként, a *14. ábrán* mutatjuk be



13. ábra. A szitoszterin mikrobiológiai átalakítása részlegesen lebontott oldalláncú biokonverziós termékekké



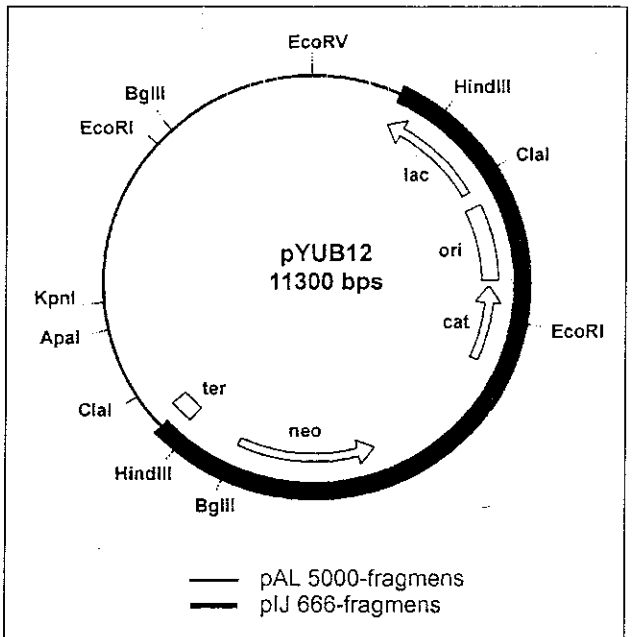
14. ábra. 17α-hidroxi-20-oxo-pregnán-származékok szintézise 17(20)-dehidro-23,24-dinorkolán-22-savakból

A szintézis első lépésében kettőskötést képeztünk a 9(11)-helyzetben a 9α-hidroxil-csoport eliminációjával. Ezután 17α,20-epoxid-származékot állítottunk elő egy régió és sztereoszelektív oxidációt alkalmazva hidrogénperoxiddal, piridinben, WO_4^{2-} ionok jelenlétében. Majd a karboxil-csoportot epoxiacil-azid származékká alakítottuk át egy vegyes anhidrid intermedieren keresztül. Ennek az epoxiacil-azid származéknak Curtius átrendeződése epoxiizocianát intermedieren át 17α-hidroxi-4,9(11)-pregnadién-3,20-dionhoz vezetett, mely a hidrokortizon szintézis előnyös intermedierje [81].

Más gyulladásgátlók és progesztatív hatású gyógyszerek előállításához való alkalmazáshoz további intermediereket pl. 17α-hidroxi-4-pregnén-3,20-diont, és 17α-hidroxi-1,4,9(11)-pregnatrién-3,20-diont is előállítottunk a fenti szintézisünkkel a megfelelő 23,24-dinorkolánvázas származékokból [82].

Az elmúlt években a molekuláris biológiai eszköztár nagymérvű bővülése megalapozta a mikobaktériumok genetikai manipulációját, mely több alkalmazott céllal történhet. Az első ilyen cél orvosi volt, amelyet az a tény magyaráz, hogy mikobaktériumok az okozói a világ két legfontosabb bakteriális betegségének, a tuberkulózisnak és a leprának. A mikobaktériumok genetikai manipulálásának másik gyakorlatban hasznosítható céljaként felvetődött bennünk, hogy a különböző nem patogén mikobaktériumokkal végzett ipari szteroid biokonverziós eljárásokat tovább fejlesszük e módszerrel.

Abból a célból, hogy tanulmányozzuk a mikobakteriális szterin-oldallánc lebontás molekuláris genetikai hátterét, kapcsolatba léptünk a Norwich-i (Anglia) John Innes Kutatási Centrum *David A. Hopwood* professzor által vezetett Genetikai Intézetével. *Jekkel Antónia* és *Tobias Kieser* közös kutatómunkával a pAL5000 *Mycobacterium fortuitum* plazmidból és a pIJ666 *Escherichia coli* plazmidból előállították a pYUB12 ingázó plazmidvektort *(15. ábra)*. Ez volt az első klónozó plazmidvektor,



15 ábra. A pYUB12 ingázó plazmid vektor restrikciós térképe

amelyet mikobaktériumokban alkalmaztak [83, 84].

1994-ben a Pasteur Intézetben előállították a Tn611 transzpozont hordozó, pCG79 jelű, hőmérséklet szenzitív plazmidot és nagyszámú inszerciós mutációt hoztak létre *Mycobacterium smegmatis*-ban ezzel a plazmiddal. Kutatócsoportunk megkísérelte a pCG79 jelű plazmidot szterint átalakító mikobaktérium törzsek mutagenezisére használni. Inszerciós mutáns könyvtárat hozott létre szitoszterint hasznosító *Mycobacterium smegmatis* és *Mycobacterium phlei* törzsekben. Azt tapasztaltuk, hogy a transzpozon a mikobaktérium kromoszóma különböző helyeire integrálódik és stabil kointegrátumot hoz létre, mely három példányát tartalmazza az inszerciós elemeknek. A pCG79 plazmid által mediált Tn611 transzpozon inszerció alkalmazásával befolyásolni lehetett a szterin lebontási anyagcsere út szabályozásában szerepet játszó gének aktivitását, oly módon, hogy a géneket egyidejűleg a transzpozonnal megjelöltük. A *Mycobacterium smegmatis-nak* egy olyan inszerciós mutánsát használva, amelyben a 9α-hidroxiláz enzim aktivitás blokkolódott, klónozni tudtuk, majd szekvenáltuk a 9α-hidroxiláz enzim génjét [85]. A *Mycobacterium phlei*-ből ugyancsak sikerült inszerciós mutánsokat nyerni, ezek részlegesen bontották le a szitoszterin oldalláncát 23,24-dinorkolán-származékokat halmozva fel a tenyészetben, mivel a további lánclebontás enzimatikus lépései a mutánsokban gátolva voltak. Feltételezzük, hogy a szitoszterin lebontási anyagcsereút molekuláris genetikai hátterének jobb megértése hozzá fog járulni a szitoszterin oldallánc lebontás ipari használatban lévő eljárásainak további fejlesztéséhez.

Intézetünk biotechnológiai kutatócsoportja fő céljának tekintette, hogy a magyar gyógyszeripar fejlődéséhez és sikeres tevékenységéhez, lehetőségeihez mérten hozzájáruljon. E törekvést intézetünk mindenkori vezetése, különösen *Vargha László* és *Láng Tibor* igazgatók hathatósan támogatták. Kutatócsoportunk eredményei a gyógyszergyárakban dolgozó kollégákkal való szoros együttműködésben valósultak meg. Az antibiotikumok és a mikrobiológiai úton szintetizált más gyógyszerhatóanyagok (koleszterin-szintet csökkentő enziminhibitorok, immunszuppresszánsok) előállítására kifejlesztett eljárásaink nagyobb részét a Biogal Gyárban alkalmazták, ipari hasznosításukban *Pólya Kálmán* szerepét szeretném kiemelni. A szteroid-biokonverziós eljárásaink ipari hasznosítása elsősorban *Pillich Lajos* főmérnöknek volt köszönhető, aki az 50-es években fermentációs üzemet létesített a Richter Gyárban, hogy szintetikus szteroid gyógyszergyártásuk mikrobiológiai eljárásokkal kiegészülhessen.

IRODALOMJEGYZÉK

1 *Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A.*: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. *5*, 317 (1958)
2 *Horváth, I., Szentirmai, A.*: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. *9*, 105 (1962)
3 *Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A.*: J. Bacteriol. *78*, 293 (1959)
4 *Horváth, I., Gadó, I., Szentirmai, A.*: Nature *192*, 641 (1961)
5 *Horváth, I., Szentirmai, A., Zsadányi, J.*: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. *13*, 349 (1967)
6 *Horváth, I., Varga, J.M., Szentirmai, A.*: J. Gen. Microbiol. *34*, 241 (1964)
7 *Szentirmai, A., Umbarger, H.E.*: J. Bacteriol. *95*, 1666 (1968)
8 *Szabó, I.M., Marton, M.*: Nature *209*, 221 (1966)
9 *Szabó, I.M., Nasser, E.A., Striganova, B., Rakhmo, Y.R., Jager, K., Heydrich, M.*: Ber. nat. med. Verein Innsbruck, Suppl. *10*, 289 (1992)
10 *Radwan, S. S., Barabás, Gy., Sorkhoh, N. A., Damjanovich, S., Szabó, I., Szöllösi, J., Matho, J., Penyige, A., Hirano, T., Szabó, I. M.*: FEMS Microbiol. Lett. *169*, 87 (1998)
11 *Gláz, E.T., Scheiber, E., Gyimesi, J., Horváth, I., Steczek, K., Szentirmai, A., Bohus, G.*: Nature *184*, 908 (1959)
12 *Gyimesi, J., Melera, A.*: Tetrahedron Lett. 1967, 1665
13 *Gyimesi, J., Ott, I., Horváth, I., Koczka, I., Magyar, K.*: J. Antibiot. *24*, 277 (1971)

14 *Horváth, Gy, Gyimesi, J, Méhesfalvi-Vajna Zs*: Tetrahedron Lett. 1973, 3643
15 *Gyimesi, J, Méhesfalvi-Vajna, Zs, Horváth, Gy*: J. Antibiot 31, 626 (1978)
16. *Tóth, P., Horváth, Gy, Koczka, I., Ambrus, G*: Recent Advances in Chemotherapy Rubinstein, E and Adam, D. (eds.). E. Levin-Epstein Ltd, Jerusalem, 1990 p 341
17 *Bérdy, J*: Doktori értekezés Kossuth Lajos Tudományegyetem, Debrecen, 1961.
18 *Bérdy, J, Magyar, K*: Process Biochem. 3, 45 (1968)
19 *Bostian, M, McNitt, K., Aszalos, A, Bérdy, J.*: J Antibiot., 30, 633 (1977)
20. *Bérdy, J (Editor), Aszalos, A., Bostian, M, McNitt, K (contributors)*: Handbook of Antibiotic Compounds Volumes I – XIV, CRC Press Inc, Boca Raton, USA, 1980-1987.
21 *Makk N. és mtsai*: P9902628 sz. magyar szabadalmi bejelentés, 1999.
22 *Gadó I. és mtsai*: 168778 sz. magyar szabadalom, 1973.
23 *Bérdy J és mtsai*: 167121 sz magyar szabadalom, 1972.
24 *Gadó I. és mtsai*: 179146 sz. magyar szabadalom, 1979
25. *Barta I. és mtsai*: 179147 sz magyar szabadalom, 1979
26 *Ott I és mtsai*: 363180 sz oszträk szabadalom, 1981.
27 *Ott I és mtsai*: 2114978 sz. brit szabadalom, 1981.
28 *Bérdy, J., Kádár-Pauncz, J, Méhesfalvi Vajna, Zs., Horváth, Gy., Gyimesi, J., Koczka, I.*: J Antibiot. 30, 945 (1977)
29. *Kádár-Pauncz, J.*: J. Antibiot. 25, 677 (1972)
30. *Kiss, Gy B, Széll, V., Ambrus, G., Ott, I*: Acta Microbiol Hung. 35, 89 (1988)
31 *Barta I. és mtsai*: 00/46388 sz. PCT szabadalmi bejelentés, 1999.
32 *Széll V. és mtsai*: 00/46389 sz. PCT szabadalmi bejelentés, 1999.
33. *Ambrus, G és mtsai*: 191743 sz magyar szabadalom, 1983.
34 *Alföldi L. és mtsai*: 4294927 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom, 1978.
35 *Szvoboda, Gy., Láng, T., Gadó, I, Ambrus, G., Kari, Cs, Fodor, K, Alföldi, L*: Advances in Protoplast Research. Ferenczy, L., Farkas, G L (eds.) Akadémiai Kiadó, Budapest, 1980, p. 235.
36 *Ferenczy L. és mtsai*: 4729951 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom (1984)
37 *Kiss, G.B, Ott, I., Kiss, P., Láng, T., Ambrus, G*: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Szabó, G, Biró, S, Goodfellow, M (eds.), (FEMS Symposium No 34.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1986. p. 107
38 *Jekkel A. és mtsi*: 5156960 sz Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom, 1988.
39. *Tóth-Sarudy É. és mtsai*: 205370 sz. magyar szabadalom, 1989
40. *Kónya A és mtsai*: P9903226 sz. magyar szabadalmi bejelentés, 1999
41 *Jekkel, A., Barta, I., Kónya, A, Sütő, J., Boros, S, Horváth, Gy., Ambrus, G.*: J. Mol. Catal. B. Enzym. (in press.)
42. *Jekkel A. és mtsai*: 5403728 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom, 1992.
43. *Jekkel, A, Kónya, A., Ilkőy, É., Boros, S, Horváth, Gy, Sütő, J*: J. Antibiot. 50, 750 (1997)
44 *Jekkel A és mtsai*: P9603350 sz magyar szabadalmi bejelentés, 1996.
45 *Kónya, A., Jekkel, A, Sütő, J., Salát, J*: J. Ind. Microbiol. Biotech 20, 150 (1998)
46 *Jekkel A. és mtsai*: 00/46175 sz. PCT szabadalmi bejelentés, 1999
47. *Jekkel A. és mtsai*: P9902352 sz. magyar szabadalmi bejelentés (1999)
48. *Ott I. és mtsai*: 5552299 sz Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom, 1992
49 *Langó, J, Salát, J., Barta, I, Ott, I, Ambrus, G, Simay, A, Roboz, J, Yu, Q, Ma, L*: Eur. Mass Spectrom. 2, 355 (1996)
50 *Wix Gy, Albrecht, K*: 918960 sz brit szabadalom(1959)
51 *Wix Gy, Albrecht, K*: J. Biochem Microbiol Techn Eng 3, 325 (1961)
52. *Kádár-Pauncz J és mtsi*: 148094 sz. magyar szabadalom, 1959.
53 *Böcskei, Zs., Simon, K., Ambrus, G, Ilkőy, É*: Acta Crystallogr, Sec C 51, 1319 (1995)
54 *Wix Gy. és mtsai*: 150099 sz. magyar szabadalom, 1961.
55. *Wix Gy. és mtsai*: 149063 sz magyar szabadalom, 1960.
56. *Mizsei, A, Szabó, A*: J Biochem. Microbiol Techn. Eng. 2, 411 (1960)
57 *Mizsei, A., Szabó, A*: J Biochem. Microbiol Techn. Eng. 3, 119 (1961)
58 *Mizsei, A., Szabó, A.*: Biotechnol Bioeng. 6, 159 (1964)
59 *Wix, Gy, Albrecht, K.*: Nature 183, 1279 (1959)
60. *Ambrus, G, Szarka, E., Barta, I., Horváth, Gy, Radics, L., Kajtár, M*: Steroids 25, 99 (1975)
60/a *Hermann, I, Borvendég, J., Ambrus, G.*: Acta Physiol. Acad Sci Hung. 51, 125 (1978)
61 *Ambrus, G, Szarka, E., Barta, I., Albrecht, K, Horváth, Gy.*: Acta Microbiol. Acad Sci. Hung. 22, 453 (1975); 9th FEBS Meeting, Budapest, 1974
62. *Horváth, Gy, Ambrus, G*: Biomed. Mass Spectrom 4, 376 (1977)
63 *Jekkel, A., Ilkőy, É, Horváth, Gy., Pallagi, I., Sütő, J, Ambrus, G*: J. Mol. Catal. B.: Enzym 5, 385 (1998)
64 *Albrecht K. és mtsai* 2034716 sz brit szabadalom, 1979
65 *Makk N. és mtsai*: 170147 sz. magyar szabadalom, 1973.
66 *Szentirmai, A., Tömörkény, E., Makk, N, Natonek, M.*: Acta Microbiol. Acad. Sci Hung. 22, 471 (1975)
67. *Wix Gy és mtsai*: 1158866 sz. brit szabadalom, 1965
68 *Wix, Gy., Büki, K G, Tömörkény, E, Ambrus, G*: Steroids 11, 401 (1968)
69 *Ambrus, G., Tömörkény, E., Büki, K.G*: Experientia 24, 432 (1968)
70 *Büki, K.G, Ambrus, G, Horváth, Gy.* Acta Microbiol Acad. Sci Hung 22, 447 (1975); 9th FEBS Meeting, Budapest, 1974
71. *Ambrus G. és mtsai*: 190665 sz magyar szabadalom, 1980.
72 *Szentirmai A és mtsai*: 188754 sz magyar szabadalom, 1980.
73 *Jekkel, A és mtsai*: 3739017 A1 sz német szabadalmi közrebocsátási irat, 1986.
74. *Jekkel A és mtsai*: 210486 sz. magyar szabadalom, 1991
75. *Ambrus, G, Ilkőy, É., Horváth, Gy., Podányi, B., Böcskei, Zs., Gyürky, S., Jekkel, A.*: Tetrahedron Lett 33, 5267 (1992)
76 *Ambrus G és mtsai*: 5112815 sz. Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalom, 1989.
77 *Ambrus, G., Ilkőy, É, Jekkel, A., Horváth, Gy, Böcskei, Zs*: Steroids 60, 621 (1995)

78 *Ambrus, G., Jekkel, A., Ilkőy, É., Horváth, Gy., Böcskei, Zs.*: Steroids *60*, 626 (1995)
79. *Jekkel, A., Csajági, É., Ilkőy, É., Ambrus, G.*: J. Gen. Microbiol. *135*, 1727 (1989)
80 *Toró, A., Ambrus, G.*: Tetrahedron Lett. *31*, 3475 (1990)
81 *Toró, A., Ambrus, G.*: Tetrahedron Lett. 33, 5265 (1992)
82 *Toró A. és mtsai*: 0469275 A2 sz. európai szabadalmi közrebocsátási irat, 1990
83 *Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R. E., Kieser, T., Bloom, B. R., Jacobs, W. R.*: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 6987 (1988)
84 *Jacobs, W. R., Snapper, S. B., Lugosi, L., Jekkel, A., Melton, R. E., Kieser, T., Bloom, B. R.*: Acta Leprologica 7, 203 (1989)
85. *Andor, A., Jeanplong, F., Ilkőy, É., Müller, J., Láng, I., Jekkel, A.*: 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, 1997.

[Érkezett: 2001. február 9.]