SZENT ISTVÁN EGYETEM

MIKOFENOLSAV MIKROBIOLÓGIAI ELŐÁLLÍTÁSA, A TERMELŐ MIKROORGANIZMUS JELLEMZÉSE

Doktori értekezés tézisei

Kónya Attila

Gödöllő

2001

SZENT ISTVÁN EGYETEM

MIKOFENOLSAV MIKROBIOLÓGIAI ELŐÁLLÍTÁSA, A TERMELŐ MIKROORGANIZMUS JELLEMZÉSE

Doktori értekezés tézisei

Kónya Attila

Gödöllő

2001

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

tudományága: biológiatudomány

vezetője: Dr. Tuba Zoltán
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Növénytani és Növényélettani Tanszék

témavezető: Jekkel Antalné dr.
tudományos osztályvezető
Gyógyszerkutató Intézet Kft., Mikrobiológiai Osztály
Dr. Hornok László
tanszékvezető egyetemi tanár
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Mikrobiológiai Tanszék

....

Dr. Tuba Zoltán
a Doktori Iskola vezetője

Jekkel Antalné dr.
Dr. Hornok László
témavezető

ELŐZMÉNYEK, KITŰZÖTT CÉLOK

A penicillin felfedezését követően az 1940-es években a mikrobiológiai eredetű antibiotikumok intenzív kutatása kezdődött. Az azóta eltelt időben bizonyítást nyert, hogy a mikroorganizmusok, és közöttük is a fonalas gombák gazdag tárháza a különböző biológiai aktivitással rendelkező hatóanyagoknak. Az antibiotikumok kutatásának egy korai eredménye volt a mikofenolsav izolálása *Penicillium brevicompactum* gombafaj egyik törzsének fermentlevéből. A mikofenolsavnak számos biológiai aktivitását bizonyították. Leírták antibakteriális, antifungális, vírus ellenes, tumor növekedés gátló és immunszuppresszív hatását. A különböző biológiai aktivitások a mikofenolsav inozin monofoszfát dehidrogenáz enzim gátló hatására vezethetők vissza, amellyel a guanozin bioszintézist és ezzel a sejtosztódást gátolja. Gyógyászati alkalmazást, mint immunszuppresszív hatóanyag, a morfolinoetil-észter származéka nyert a szervátültetéseket követő kezelésekben.

A 20. század közepére az addig elvégzett kísérletek eredményeként lehetővé vált sikeres szervátültetések végrehajtása. Az első sikeres veseátültetést 1954-ben végezték az Egyesült Államokban. Napjainkra a vese, máj, szív, hasnyálmirigy és tüdőátültetések az orvosi beavatkozások elfogadott részévé váltak. A nagyobb számú szervátültetés elvégzését és a hosszabb túlélési időt az immunszuppresszív hatású anyagok felfedezése tette lehetővé, amelyeket a szervátültetésen átesett betegeknek életük végéig szedniük kell a beültetett szerv kilökődésének megakadályozására. Mivel a szervátültetések száma évről évre növekszik, ezért fontos a különböző immunszuppresszív hatású anyagok kutatása, hatékonyabb illetve kevesebb mellékhatással járó kezelések kifejlesztéséhez.

Intézetünkben screening programot folytattunk értékes hatóanyagokat bioszintetizáló mikroorganizmusok izolálása céljából. Ezen screening program keretében egy indiai talajmintából izoláltunk egy fonalas gomba törzset, amelynek tenyészete mikofenolsavat tartalmazott. Célul tűztük ki az általunk izolált fonalas gomba törzs felhasználásával a mikofenolsav ipari előállítására alkalmas eljárás kidolgozását. A kutatómunka célkitűzései részletesebben az alábbiak voltak:

1. Mikofenolsav ipari előállítására alkalmas mikrobiológiai eljárás kidolgozása

- A talajmintából izolált fonalas gomba törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességének fejlesztése mutációs-szelekciós módszerekkel
- A fermentációs táptalaj összetételének optimalizálása
- A fermentációs körülmények optimalizálása rázatott lombikos körülmények között
- A fermentációs körülmények optimalizálása laboratóriumi fermentorban

2. Mikofenolsav származékok előállítása mikrobiológiai úton

- Screening program végzése mikofenolsav biokonverziójára alkalmas mikroorganizmusok izolálása céljából
- A mikofenolsav biokonverziójával előállított termékek fermentléből történő elkülönítése, szerkezetük meghatározása
- A mikofenolsav biokonverziójával előállított termékek biológiai aktivitásának vizsgálata

3. Kariotipus vizsgálatok

- A mikofenolsav bioszintézisére képes gomba törzs kariotipusának meghatározása pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával
- Az eredeti törzs izolátum és a genetikai fejlesztés eredményeként izolált mutáns törzsek elektroforetikus kariotipusának összehasonlítása
- Az általunk izolált illetve a szakirodalomban leírt mikofenolsav bioszintetizáló törzsek elektroforetikus kariotipusának összehasonlítása

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mikrobiológiai módszerek

Munkánk során a fonalas gomba törzseket a mikrobiológiában alkalmazott alaptechnikákkal tartottuk fenn, oltottuk át, inokuláltuk és szaporítottuk.

A fermentációs körülmények optimalizálása

A fermentációs kísérleteket rázatott lombikos körülmények között 100 ml térfogatban és 5 liter hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorokban végeztük. A táptalajkomponensek optimalizálásához regressziószámításon alapuló módszert alkalmaztunk.

Kariotipus vizsgálatok

A törzsek fiatal micéliumából protoplasztokat képeztünk, amelyeket a kromoszóma preparátum minták készítéséhez használtunk. A kromoszómák elválasztását pulzáló gélelektroforézis technikával végeztük.

EREDMÉNYEK

Mikofenolsav bioszintézisére képes fonalas gomba törzs izolálása

Több mint 8000 mikroorganizmusra kiterjedő screening programot folytattunk különböző biológiai aktivitással rendelkező hatóanyagok izolálása céljából. Egy széles spektrumú antifungális aktivitással rendelkező fermentléből izoláltuk a mikofenolsavat, amelyet egy indiai talajmintából izolált fonalas gomba törzs bioszintetizált. Az új törzs izolátum a taxonómiai vizsgálatok alapján a *Penicillium waksmani* fajba sorolható be. A szakirodalomban több, a *Penicillium* genuszba tartozó faj mikofenolsav bioszintetizáló képességét leírták, azonban *Penicillium waksmani* fajba tartozó törzsről még nem közölték a mikofenolsav bioszintetizáló képességet. A *Penicillium waksmani* faj a *Penicillium* genuszon belül a *Monoverticillata* szekcióba sorolható be, míg a

szakirodalomban leírt összes mikofenolsav termelő mikroorganizmus a *Penicillium* genusz *Asymmetrica* szekciójába tartozik. Az általunk izolált törzs az első mikofenolsav bioszintetizáló képességgel rendelkező, faji szintű képviselője a *Penicillium* genusz *Monoverticillata* szekciójának.

A mikofenolsav ipari előállítására alkalmas eljárás kidolgozása

Az izolált *Penicillium waksmani* törzs felhasználásával kezdtük el a mikofenolsav ipari előállítására alkalmas fermentációs eljárás kidolgozását. A mikofenolsav bioszintetizáló képességet a törzs genetikai fejlesztésével, mutációs-szelekciós kísérletekben, illetve a fermentációs paraméterek optimalizálásával fokoztuk. A mutagén kezeléseket követően a mutáns törzsek mikofenolsav bioszintetizáló képességét rázatott lombikos körülmények között vizsgáltuk meg. A hatékonyság fokozása érdekében kifejlesztettünk egy gyors előszűrési módszert mikrotiter lemezeken, amellyel a gyenge mikofenolsav termelő mutáns törzseket még a rázatott lombikos kísérletek előtt ki tudtuk szűrni. A törzsfejlesztés során mintegy 7000 mutáns törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességét vizsgáltuk meg. A mikofenolsavat magasabb koncentrációban bioszintetizáló törzsek mellett izoláltunk a mikofenolsav bioszintézisében gátolt mutáns törzseket is. A 9/14 jelű törzs a mikofenolsav bioszintézisének az elején, az aromás gyűrű záródása előtti lépések egyikében szenvedett mutációt. E törzs egyben auxotróf is, piridoxint igényel a növekedéséhez. Az SP1 jelű törzs a mikofenolsav bioszintézisének a végén, a farnezil-oldallánc beépülését követő lépésekben szenvedett mutációt. Ennek következtében a farnezil-oldallánc rövidülésének feltételezett köztitermékei izolálhatók a fermentléből.

Az eredeti törzs izolátum genetikai fejlesztése mellett a fermentációs paramétereket is optimalizáltuk a termelőképesség növelése céljából. A mikofenolsav bioszintézise szempontjából legkedvezőbb szén- és nitrogén források kiválasztása után a táptalajkomponensek koncentrációját regressziószámítással és a Box és Wilson által leírt módszerrel optimalizáltuk. A számítások elvégzéséhez Pascal illetve Delphi nyelven számítógépes programot írtunk, amelyet más eljárások kidolgozása során is sikerrel alkalmaztunk.

A rázatott lombikos körülmények között elvégzett kísérleteket követően az eljárás kidolgozását 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorokban folytattuk, amelyekben meghatároztuk a mikofenolsav bioszintéziséhez legkedvezőbb fermentációs paramétereket.

A törzsfejlesztéssel és a fermentációs paraméterek optimalizálásával kidolgozott eljárás eredményeként laboratóriumi fermentorban 2000 mg/l koncentrációban tudtunk mikofenolsavat előállítani.

Mikofenolsav származékok előállítása

Széles körben alkalmazott módszer, hogy hatóanyagokból a hatás fokozása és a mellékhatások csökkentése érdekében különböző származékokat képeznek. Származékok mind mikrobiológiai, mind szintetikus úton előállíthatók. A mikofenolsavból mikrobiológiai úton állítottunk elő származékokat. A mikofenolsavból, mint szubsztrátból a *Streptomyces* genuszba tartozó törzsekkel mikofenolsav-amidot, hidroximetil-mikofenolsavat, hidroximetil-mikofenolsav-amidot és a mikofenolsav-amid ramnozil-származékát állítottuk elő. A származékok biológiai aktivitását patkány fül ödéma tesztekben vizsgáltuk meg. Az amid-származék és a ramnozil-származék aktivitása a mikofenolsavéhoz hasonló volt, míg a metil-csoport hidroxilezésével előállított származékok elvesztették aktivitásukat.

Kariotipus vizsgálatok

Vizsgálatokat végeztünk a talajmintából izolált mikofenolsavat bioszintetizáló *Penicillium waksmani* törzs kariotipusának megállapítására pulzáló gélelektroforézis technikával. Több független mintaelőkészítési és gélelektroforézis kísérlet eredménye alapján a törzs 4 kromoszómáját sikerült elválasztani. A kromoszómák mérete 3, 4,7, 5,8, és 10,5 Mb-nak adódott. A genom mérete az elválasztott kromoszómák méretéből számolva 24 Mb. A 3 Mb méretű kromoszóma sokkal erősebb jelet adott a többinél a gélben, ezért elképzelhető, hogy két 3 Mb méretű kromoszómával rendelkezik a törzs és így a genom mérete 27 Mb. Összehasonlítottuk az eredeti, talajmintából izolált törzs kariotipusát a törzsfejlesztés során előállított, mikofenolsavat magasabb koncentrációban előállító illetve a mikofenolsav bioszintézisben sérült mutánsok kariotipusával.

Különböző paraméterekkel végzett pulzáló gélelektroforézis futtatásokkal sem tudtunk különbséget kimutatni az eredeti és a mutáns törzsek elektroforetikus kariotipusa között, azaz a vizsgált törzsekben történt mutációk nem kimutathatók a kromoszómák szintjén.

Az általunk izolált törzs kariotipusát összehasonlítottuk a szakirodalomban legtöbbet vizsgált mikofenolsav termelő *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs kariotipusával. A *Penicillium brevicompactum* törzs két kromoszómáját sikerült elválasztani a 3-10 Mb mérettartományban, amelyek mérete 4,1 és 5,7 Mb. A két vizsgált törzs kariotipusa mind a kromoszómák számában mind azok méretében különbözött, ami megerősítette a taxonómiai vizsgálatokat, miszerint az általunk izolált, mikofenolsav termelő törzs különbözik a szakirodalomban elterjedten alkalmazott *Penicillium brevicompactum* törzstől.

Új tudományos eredmények

1. Egy screening program keretében izoláltunk egy, a *Penicillium waksmani* fajba sorolható gomba törzset, amely 100 mg/l mikofenolsavat termelt. A *Monoverticillata* szekcióba tartozó fajok közül az általunk izolált *Penicillium waksmani* törzs az első, amelyről leírták a mikofenolsav bioszintetizáló képességet.
2. A törzs genetikai fejlesztésével és a fermentációs körülmények optimalizálásával eljárást dolgoztunk ki a mikofenolsav laboratóriumi fermentorban történő előállítására, amellyel 2000 mg/l koncentrációban tudtunk mikofenolsavat előállítani.
3. Számítógépes programot írtunk különböző fermentációs paraméterek regressziószámításon alapuló optimalizálásához.
4. A törzs genetikai fejlesztése során izoláltunk a mikofenolsav bioszintézisében sérült mutáns törzseket is.
5. Mikrobiológiai úton, *Streptomyces* törzsekkel a mikofenolsav négy származékát állítottuk elő. A farmakológiai vizsgálatok alapján a mikofenolsav-amid és a ramnozil-amid-származék a mikofenolsavéhoz hasonló aktivitást mutatott. A hatástani vizsgálatok megerősítették, hogy a mikofenolsav aromás magján

található metil-csoport esszenciális a vegyület aktivitásához, hidroxilezése pedig az aktivitás elvesztésével jár.

6. Meghatároztuk a mikofenolsav termelő *Penicillium waksmani* törzs elektroforetikus kariotipusát pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával. A törzs kromoszómáinak mérete: 3,0, 4,7, 5,8 és 10,5 Mb. A törzs genomjának mérete az elválasztott kromoszómák alapján 24-27 Mb.
7. Összehasonlítottuk az általunk izolált törzs és az irodalomban vizsgált mikofenolsav termelő *Penicillium brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs elektroforetikus kariotipusát. A *P. brevicompactum ATCC 9056* törzs esetében a 10 Mb alatti tartományban két kromoszómát sikerült elválasztanunk, melyek mérete: 4,1 és 5,7 Mb. Az elektroforetikus kariotipusok vizsgálata megerősítette a taxonómiai vizsgálatok eredményeként kapott faji szintű különbséget a vizsgált két törzs között.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A különböző biológiai aktivitással rendelkező, mikrobiológiai eredetű gyógyszerek előállítása több évtizedes múltra tekint vissza. Az újonnan izolált, mikroorganizmusok által bioszintetizált hatóanyagokról folyamatosan megjelenő közlemények azt mutatják, hogy a mikrobiológiai eredetű hatóanyagok a jövőben is nagy szerepet fognak játszani a gyógyászatban. A legtöbb mikrobiológiai eredetű hatóanyagot az antibiotikumok között találjuk, azonban más betegségek kezelésében is elterjedten alkalmazzák azokat. Az egyik ilyen alkalmazási terület az immunszuppresszív terápia, amelyet a szervátültetéseket követően alkalmaznak a beültetett szerv kilökődésének megakadályozására. Mivel a szervátültetések száma évről-évre növekszik, fontos a különböző mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok kutatása. Az egyik újabban a terápiába bevezetett gyógyszer hatóanyag a mikrobiológiai eredetű mikofenolsavnak a morfolinoetil-észter származéka.

Az Intézetünkben folytatott screening program keretében talajmintából izoláltunk egy mikofenolsav bioszintézisére képes gomba törzset. A munkánk egyik

célja a gomba törzs felhasználásával mikofenolsav ipari előállítására alkalmas eljárás kidolgozása volt. A talajmintából izolált gomba törzs a taxonómiai vizsgálatok alapján a *Penicillium* genusz *Monoverticillata* szekciójába a *Penicillium waksmani* fajba sorolható be. A szakirodalomban eddig csak a Penicillium genusz *Asymmetrica* szekciójába tartozó fajokról volt ismert a mikofenolsav bioszintetizáló képesség. Ezért az általunk izolált gomba törzs bizonyítja, hogy a mikofenolsav bioszintetizáló képesség nem korlátozódik az *Asymmetrica* szekcióba tartozó fajokra.

Az ipari eljárás kidolgozása során a törzs mikofenolsav bioszintetizáló képességet fokoztuk mutációs szelekciós eljárással illetve a fermentációs táptalajt és körülményeket optimalizáltuk. A kidolgozott eljárás alapján 5 literes hasznos térfogatú laboratóriumi fermentorban 2000 mg/l koncentrációban tudunk mikofenolsavat előállítani. Az eljárás alkalmas arra, hogy alapját képezze a léptéknövelésnek, a mikofenolsav ipari, nagyobb térfogatú fermentorokban történő előállításához. A mutációs-szelekciós kísérletekben a mikofenolsavat magasabb koncentrációban bioszintetizáló mutáns törzseken kívül a bioszintézisben sérült mutánsokat is izoláltunk. Az egyik mutáns a mikofenolsav bioszintézisének elején, az aromás mag kialakulását megelőző lépések egyikében, a másik mutáns a mikofenolsav oldalláncának kialakulásában sérült.

Egyes mikrobiológiai eredetű hatóanyagok biokonverziójával előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező származékokhoz lehet jutni. Ezért kísérleteket végeztünk a mikofenolsav mikrobiológiai módosításával. Ennek eredményeként különböző *Streptomyces* fajok felhasználásával mikofenolsav-amidot, hidroximetil-mikofenolsavat, hidroximetil-mikofenolsav-amidot és a mikofenolsav-amid ramnozil-származékát állítottuk elő. A származékok farmakológiai vizsgálata során megállapítottuk, hogy az amid-származék és a ramnozil-származék aktivitása a mikofenolsavéhoz hasonló volt, míg a metil-csoport hidroxilezésével előállított származékok elvesztették aktivitásukat. Ez megerősíti a szakirodalomban leírtakat, miszerint a mikofenolsav aromás magján található metil-csoport esszenciális az aktivitáshoz. A továbbiakban érdemes az előállított származékokat más tesztekben is megvizsgálni illetve érdemes a screening programot folytatni újabb mikofenolsav származékok izolálása céljából.

Pulzáló gélelektroforézis technika alkalmazásával meghatároztuk az általunk izolált mikofenolsav bioszintetizáló *Penicillium waksmani* törzs kariotipusát. A vizsgálatokban a törzs négy kromoszómáját sikerült elválasztani, amelyek méretét 3, 4,7, 5,8, és 10,5 Mb-nak számoltuk. A 3 Mb méretű kromoszóma sokkal erősebb foltot adott a gélben, ezért elképzelhető, hogy a törzs két 3 Mb méretű kromoszómát tartalmaz. Az eddig elválasztott kromoszómák mérete alapján a törzs genomjának mérete 24-27 Mb. A szakirodalomban vizsgált, a *Penicillium* genuszba tartozó fajok genomjának mérete alapján elképzelhető, hogy a törzs tartalmaz még egy, eddig el nem választott kromoszómát. Összehasonlítottuk az általunk izolált *P. waksmani* és a szakirodalomban elterjedten használt mikofenolsav bioszintetizáló *P. brevicompactum ATCC 9056* jelű törzs kariotipusát. A *P. waksmani* négy kromoszómájával szemben ugyanabban a mérettartományban a *P. brevicompactum ATCC 9056* törzs két kromoszómáját tudtuk kimutatni, melyek mérete 4,1 és 5,7 Mb-nak adódott. Ez az eredmény megerősíti a taxonómiai vizsgálatokat, miszerint a két törzs különbözik egymástól.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN MEGJELENT SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Tudományos dolgozatok

Kónya, A., Jekkel, A., Sütő, J. and Salát, J. (1998) Optimization of Compactin Fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **20**: 150-152.

Jekkel, A., Barta, I., **Kónya, A.**, Sütő, J., Boros, S., Horváth, Gy. and Ambrus, G. (2001) Microbiological transformation of mycophenolic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **11**:423-426.

Szabadalmi bejelentések

Kónya A., Jekkel A., Barta I., Somogyi Gy., Ambrus G., Horváth Gy., Mózesné Sütő J., Szabó I.M., Szabó A., Salát J. and Boros S. (1999) Eljárás mikofenolsav és származékai előállítására. P9903226 számú magyar szabadalmi bejelentés.

Kónya, A., Jekkel, A., Barta, I., Somogyi, Gy., Ambrus, G., Horváth, Gy., Mózesné Sütő, J., Szabó, I.M., Szabó, A., Salát, J. and Boros, S. (2000) Process for the preparation of mycophenolic acid and derivatives thereof. WO 01/21607 számú szabadalmi bejelentés

A doktori képzés ideje alatt más témában megjelent tudományos dolgozatok

Jekkel, A., **Kónya, A.**, Ilkőy, É., Boros, S., Horváth, Gy and Sütő, J. (1997) Microbial conversion of mevinolin. *The Journal of Antibiotics* **50**: 750-754.

Konferencia-előadások, poszterek

Kónya A., Szabó A., Salát J., Jekkel A., Ambrus G.: Mikofenolsav immunszuppresszív hatóanyag mikrobiológiai előállítása. A Magyar Kemoterápiai Társaság XII. Konferenciája, Debrecen, 1997.

Szabó, A., Barta, I., **Kónya, A.**, Jekkel, A., Ambrus, G.: Densitometric determination of mycophenolic acid and related compounds. 10th International Symposium on Instrumental Planar Chromatography, Visegrád, 1998

Kónya A., Jekkel A., Rada B., Ilkőy É., Sütő J., Salát J.: Compactin mikrobiológiai előállítása. A Magyar Kemoterápiai Társaság XIV. Konferenciája, Debrecen, 1999.

Jekkel, A., Barta, I., **Kónya, A.**, Sütő, J., Boros, S., Horváth, Gy. and Ambrus, G. Microbiological transformation of mycophenolic acid. 4th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformation, Naxos, 1999.

Kónya A., Jekkel A., Barta I., Somogyi Gy., Ambrus G.: Mikrobiológiai eredetű immunszuppresszív hatóanyagok kutatása és üzemi előállításukhoz ipari eljárások kifejlesztése. Az MTA Általános Mikrobiológiai Bizottsága és Tanácsadó Testülete ülése. 2000. Február.