

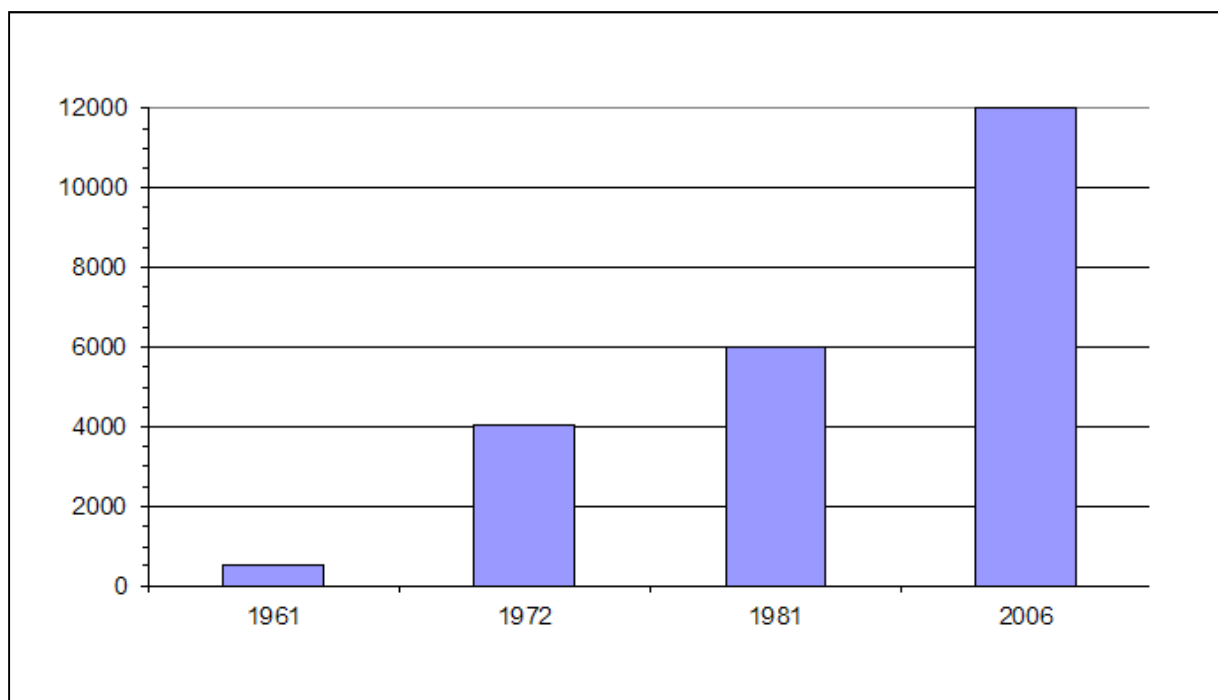
# 1. Antibiotikumok

## 1.1. Általános bevezető

Az **antibiózis** fogalmát a szimbiózissal együtt elsőként Viullemín használta az élőlények kölcsönhatásainak leírására 1889-ben. Ő még a *Lactobacillus*-ok tejsav termelését tekintette antibiózisnak, a mai értelemben vett antibiotikumok felfedezése fél évszázaddal később történt.

Az **antibiotikumok** olyan mikroorganizmusok által termelt, más mikrobák életfolyamatait gátló vegyületek (szekunder metabolitok), amelyeket a hatásos koncentrációban az emberi szervezet károsodás nélkül elvisel. Régebben az antibiotikumok körébe számították a szintetikusan előállított mikrobaellenes gyógyszereket is. Egyesek az antibiotikumok körébe sorolják a mikrobiális eredetű citosztatikumokat is. Ezek szintén szekunder metabolitok, a humán terápiában alkalmazzák, de nem a fertőző betegségek kezelésére, hanem a tumorterápiában, a gyorsan szaporodó emberi sejtek elpusztítására.

A **másodlagos anyagcseretermékek** termelése nem kapcsolódik közvetlenül a sejt energia és anyagtermeléséhez, a tenyésztés későbbi szakaszában fordul elő. Sokszor kedvezőtlen környezetváltozás hatására indul be a termelés (többszörös tápanyag limit, eltolt pH, kellemetlen anyagcseretermék felhalmozódása, stb.), ha a szokványos anyagcsereutak nem működnek megfelelően. Termelésük sokszor értelmetlennek tűnik (lehet pl. nyálkaanyag, toxin, alkaloid, pigment, tokanyag, antibiotikum), a sejtnak nincs közvetlen haszna a termelt molekulából. A szekunder metabolizmus beindulását segíti a tápanyag limit, ha a *szénforrás* kis koncentrá-



1. ábra Ismert antibiotikumok számának alakulása az elmúlt évtizedekben

ciójú vagy nehezen hozzáférhető a mikroorganizmus számára (a bőséges szénforrás az elsődleges anyagcserét pörgeti fel), és ha a *nitrogénforrás* komplex, szerves eredetű (szójaliszt, kukoricalekvár), és adagolással folyamatosan alacsony szinten tartják a koncentrációját (a sok N a növekedésnek kedvez, az ammónium-sók pedig inkább gátolják a termékképződést). *Szervetlen foszfát* jelenlétében a szekunder metabolizmus rendszerint nem kezdődik el, ezért csak annyit

adnak a tenyészethez, amennyi a mikrobák szaporodásához szükséges, és elfogy, mire eléri a kívánt sejtszámot és a másodlagos anyagcseretermékek bioszintézise beindulhat.

Eddig körülbelül 12–13 000 antibiotikumot írtak le, ezek közül néhány százat gyártanak ipari léptékben fermentációs és/vagy félszintetikus úton. Az ismert vegyületek közül nagyjából 300-at alkalmaznak humán a gyógyászati gyakorlatban (ezek 30-40 féle alapstruktúrából származtathatók).

Az ismert antibiotikumok száma az elmúlt évtizedekben ugrásszerűen megnőtt, azonban egyre nehezebb új antibiotikumokat találni a folyamatos törzsfeljesztések, izolálások, *screeningek* dacára. Az új antibiotikum típusok, antibiotikum osztályok felfedezése gyakorlatilag megállt, 1987 óta nem fedeztek fel új kategóriát. Míg 1960-ban a megtalált antibiotikumok 5%-a klinikai alkalmazásra került, addig 2006-ra ez az arány lényegesen, 1% alá csökkent. Az antibiotikum kutatás klasszikus módszere vad törzsek izolálása a természetből kioltási zónák alapján. Kiindulási anyagként legtöbbször egzotikus talajmintákat alkalmaznak, ezekben várható ismeretlen törzsek, változatok előfordulása.

Az antibiotikumok nagy többsége a klinikai gyakorlatba vétel után egy-két évtizeddel elavul, kikerül az alkalmazási körből. Ennek oka lehet az elterjedő rezisztencia, a mellékhatások, allergia fellépése vagy hatékonyabb, olcsóbb, könnyebben alkalmazható szerek megjelenése.

Új antibiotikumok felfedezésének kényszere a fejlett országokban a legnagyobb, ahol a fizetőképes kereslet is megvan az új gyógyszerkészítményekre. Egy klinikai alkalmazásban álló antibiotikum egészen addig nem nevezhető elavultnak, amíg a fejlődő országok – a másutt már nem használt gyógyszert – sikerrel alkalmazhatják.

Az utóbbi években a génmérnökség (*genetic engineering*), valamint a számítógépes molekulamodellzés elterjedésével lehetőség nyílt a már ismert antibiotikumok új származékainak vagy hasonló szerkezetű (analóg) vegyületeinek termelékenyebb előállítására is.

A felfedezett antibiotikumok mintegy háromnegyed része sugárgomba (*Actinomycetes*) metabolit, melyen belül is különösen jelentős a *Streptomyces* nemzetségbe tartozó fajok antibiotikum-termelése – ezek adják az eddig leírt antibiotikumok mintegy kétharmadát.

A *Penicillium* és *Acremonium* (*Cephalosporium*) fajok által termelt,  $\beta$ -laktám-típusú antibiotikumok (penicillinek, cefalosporinok) viszont az antibiotikumok összes kereskedelmi forgalmából közel 70%-ot képviselnek.

### 1.1.1. Osztályozás:

Ezt a sok vegyületet többféle szempontból is lehet csoportosítani. Minden szakember a saját szempontjai szerint kezeli az antibiotikumokat.

*Kémiai szerkezet* szerinti osztályozást követ a Handbook of Antibiotic Compounds (szerkesztője a Bérdy János magyar akadémikus), amely 1974-től évente összesen 13 vastag kötetben jelent meg. Eszerint megkülönböztethetők:

Aminosavszármazékok, peptidek: Cikloszerin, Bacitracin,  $\beta$ -laktám antibiotikumok

Szénhidrát származékok: Sztreptomycin, Vankomicin

Makrociklusos laktonok: Eritromicin,

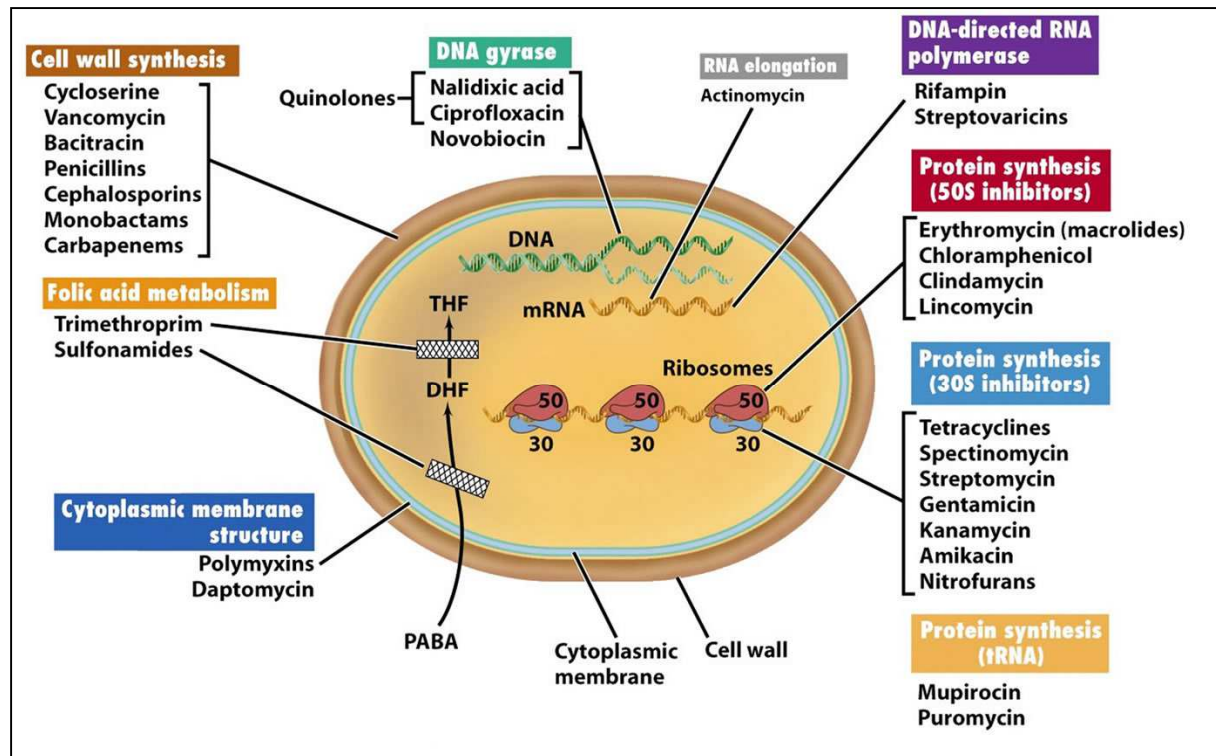
Kinonok: tetraciklinek, Mitomicin

Aromások: Kloramfenikol

Szteránvázások, terpénvázások

Ehhez valamennyire kapcsolódik a *bioszintézis utak* szerinti csoportosítás, hiszen a hasonló szerkezetű molekulák hasonló anyagcserefolyamatok termékeként jönnek létre.

*Hatásmechanizmus, támadáspont* szerint is lehet csoportosítani e vegyületeket. A sejtek életműködését többféle módon is akadályozhatják az antibiotikumok. Gyakori támadáspont a sejtfaleszintézis ( $\beta$ -laktámok, bacitracin), a fehérjeszintézis (tetraciklinek, aminoglikozidok, makrolidek), a sejtmembránok működése (ciklopeptidek, poliének), ritkábban a nukleinsavak (rifamicin, citosztatikumok).



2. ábra Az antibiotikumok támadáspontjai

A felhasználók, azaz az orvosok szempontjai mások. Őket egyrészt az egyes szerek *hatásspektruma* érdekli, azaz hogy mely mikrobák ellen hatékonyak és mikor hatástalanok. A hatásosság nem egyes törzsekre, hanem nagyobb mikrobiológiai rendszertani egységekre vonatkoztatható, így például más gyógyszerek alkalmazhatók Gram-pozitív és Gram-negatív törzsekre. A *szűk spektrumú* antibiotikumok csak a mikroorganizmusok egy szűk csoportjára hatnak, míg a *széles spektrumúak* a mikrobák széles körét pusztítják el.

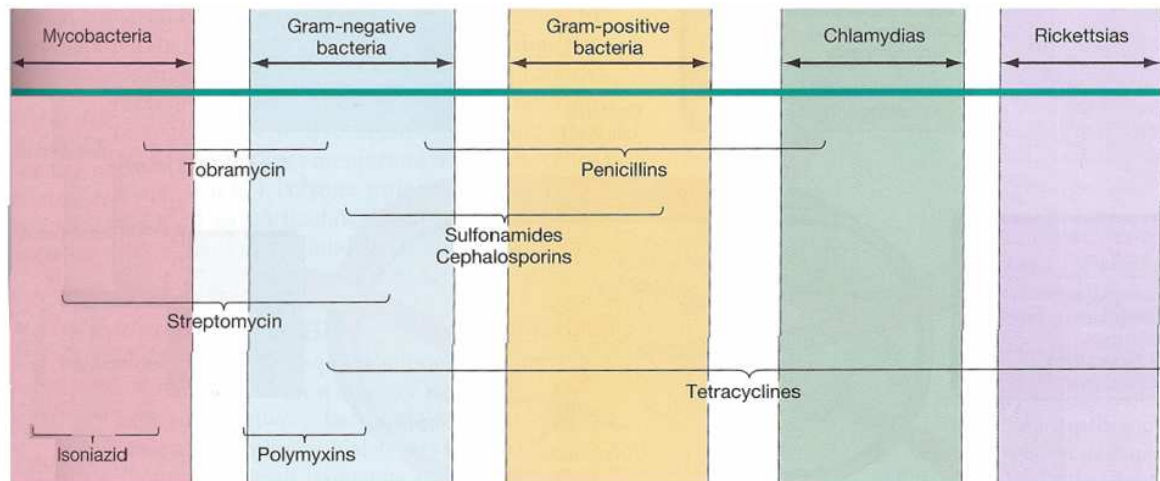
A gyakorlati orvoslás szempontjából a *terápiás alkalmazhatóság* a fő szempont. Más antibiotikumok célszerűek pl. egy tüdőgyulladás kezelésénél, mint a húgy-ivari fertőzéseknél, megint mások egy középfül-gyulladásnál.

Rendező elv lehet még a *termelő törzsek* rendszertani helye, így a baktériumok, sugárgombák és a fonalgombák által termelt anyagok csoportja.

A következőkben elsődlegesen a támadáspont szerinti osztályozást használjuk, ezen belül a kémiai szerkezet szerint haladunk.

### 1.1.1.1. Antibiotikum érzékenység és rezisztencia

A hatásspektrum tárgyalása kapcsán megemlítettük, hogy az egyes antibiotikumok csak bizonyos mikrobák ellen hatékonyak, másokra nézve az adott vegyület hatástalan. Ez utóbbiak rezisztenciája természetes, állandó, örökletes tulajdonság, nagyobb rendszertani egységekre jellemző.



3. ábra Az egyes antibiotikum csoportok hatásspektruma

Élesen elkülönül a szerzett rezisztencia. A baktériumok nagy részénél a kezelés/érintkezés során rezisztencia alakul ki az adott antibiotikummal szemben. Az ellenálló képesség megnövekedésének többféle mechanizmusa ismert.

Előfordul, hogy a kérdéses antibiotikum egy változás következtében nem jut be a sejtbe (*permeabilitási mutánsok*), így nem éri el célpontját. Ez csak a sejten belül ható gyógyszereknél működik, a sejtfa szintézis gátlása például a sejtmembránon kívül történik.

Másik lehetőség, hogy a *célpont*, általában egy fehérje *szerkezete változik meg*. Biokémiai funkcióját továbbra is betölti, de az antibiotikum nem tud kötődni és ezáltal elveszti hatékonyságát. Jó példa erre a sztreptomycin, amely a fehérje szintézist gátolja oly módon, hogy a riboszóma 30S alegységének S12 fehérjéjéhez kötődik. Az itt bekövetkező mutáció (Phe–Ile aminosav csere) rezisztenssé teszi a törzset.

Gyakori eset, hogy a bekerülő antibiotikum molekulát enzimek hatástalanítják. Ez történhet a molekula bontásával, illetve ellenkezőleg, csoportok rákapcsolásával, származékképzéssel. Az előbbire példa a penicillin, illetve a  $\beta$ -laktám vázas antibiotikumok inaktiválása. Számos törzs termel  $\beta$ -laktamáz enzimet (>40 különböző enzim), de hatásuk azonos. A  $\beta$ -laktám váz négytagú gyűrűjét nyitják fel, ennek következtében az antibiotikus hatás megszűnik. A származékképzés jól tanulmányozott esetei az aminoglikozid antibiotikumok (sztreptomycin csoport). A cukorszármazékok –OH csoportjaira foszfát, acetil- illetve adenil-csoportokat kötnék a hatástalanító enzimek.

A rezisztencia kialakulásának folyamatát kétféle típusba sorolják. A penicillin típusú rezisztencia fokozatosan, sok generáción keresztül, lépésről lépésre alakul ki, valószínűleg halmozódó mutációk következtében. A sztreptomycin típusú viszont egy lépésben, ugrásszerűen jelenik meg, törzs antibiotikum tűrő képessége hirtelen nagyságrendekkel növekszik. Ennek oka lehet egy lépéses mutáció (mint a sztreptomyciné az S12 fehérje mutációja), vagy génátadással (plazmid fertőzés, konjugáció, transzformáció, transzdukció, rekombináció)

#### Felhasználás:

Antibiotikumokat nem csak az orvosok használják, érdemes felsorolni az összes alkalmazási területet. Termelési volumen és piaci érték szempontjából legnagyobb az igény a

- *Humán gyógyászatban*: mikrobiális fertőzések gyógyítására, ide sorolhatók a citosztaticumok is.
- *Állatgyógyászatban*: analóg a humán alkalmazással.

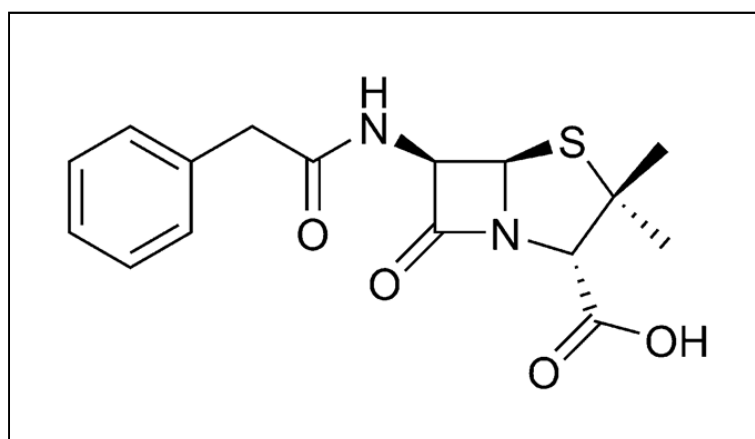
- *Kutatásban* (biokémia, mikrobiológia): szelektív inhibitorok (fehérje-, DNS-, RNS-, sejtfalszintézis gátlása)
- *Élelmiszerkonzerválás*: régebben alkalmazták tartósításra, de ma már nem engedélyezik.
- *Növényvédelem*: régebben alkalmazták a növényi kártevők ellen, de ma már nem engedélyezik.
- *Takarmányadalékként*: kis dózisban (nem terápiás mennyiségben, 1–10 mg/kg). Csökkenti a haszonállatok emésztőszervi megbetegedéseit, javítja a takarmányhasznosítást, jobban gyarapodik az állomány. Az elhullási százalék – különösen a fiatal állatoknál - csökken. Ezt a gyakorlatot a kialakuló antibiotikum rezisztencia miatt több lépcsőben korlátozták. Előbb a SWAN konvenció mondta ki, hogy csak olyan antibiotikumot szabad adni, amely nem jelenik meg a végtermékekben (hús, tej, tojás). Ennek a feltételnek azok az antibiotikumok feleltek meg, melyek nem szívódnak fel, a bélcsatornában maradnak és ott fejtik ki hatásukat (pl. bacitracin). Később az Európai Unióban gyakorlatilag teljesen betiltották ezt az alkalmazást. Jó higiéniai viszonyok között, ahol kisebb fertőzésveszély, nincs is nagy jelentősége, de trópusi területeken ahol nagy a bélfertőzések gyakorisága, számottevő profitot hozhat a takarmányok adalékolása.

## 1.2. Sejtfal szintézist gátló antibiotikumok

A támadáspont szerinti csoportosításban elsőként vesszük a sejtfalszintézist gátló antibiotikumokat. Ezen belül is mind történetileg, mind piaci súlyuk miatt az első helyre kerülnek a  $\beta$ -laktám-vázás antibiotikumok.

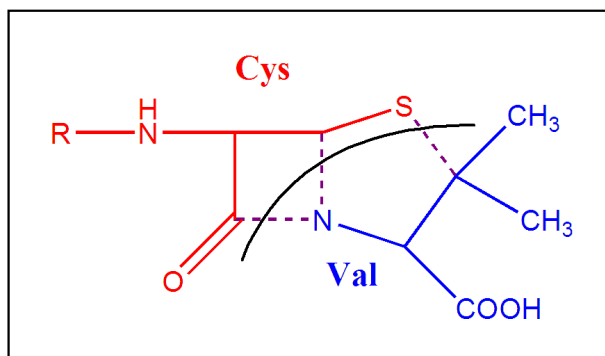
### 1.2.1. Penicillin

A penicillint Fleming 1929-ben írta le, mint a *Penicillium notatum* fonalgomba által termelt baktériumellenes antibiotikumot (2-3  $\mu\text{g/ml}$ ). Csak jóval később, 1940-ben sikerült izolálni és tiszta formában előállítani a penicillint egy oxfordi kutatócsoportnak.



4. ábra A G-penicillin szerkezete

A  $\beta$ -laktám (négytagú) gyűrűt tartalmazó alapváz a 6-amino-penicillánsav (angol rövidítése: 6-APA) amino csoportját egy aromás karbonsav acilezi. Az alapvázat alaposabban megfigyelve felismerhetjük, hogy az voltaképpen két aminosavból (Cys és Val) áll, amelyet a szokásos peptidkötésen kívül még két kovalens kötés kapcsol össze.



5. ábra A 6-APA alapváz két aminosavból tevődik össze

Az **R** savmaradék szerkezete sokféle lehet, ennek kialakításával változtatni lehet a molekula kémiai és gyógyszeres tulajdonságait.

Fizikai tulajdonságait tekintve a penicillin vízben jól oldódó, színtelen anyag, amelynek az UV tartományban sincs elnyelése. Optikailag aktív, 3 aszimmetria-centruma van.

Kémiai szempontból gyenge sav, kationokkal sót képez, alkáli sók formájában hozzák forgalomba.

**BOMLÉKONY** anyag! Savak, lúgok és oxigén hatására többféle reakcióúton is gyorsan bomlik. A G-penicillin a gyomorsavban is elbomlik, ezért ez a molekula szájon át nem adható. Érzékenysége miatt nem kerülhet olyan készítménybe, amit hővel sterilizálnak. A  $\beta$ -laktamáz enzimek gyűrűbontással inaktíválják.

Kvantitatív kémiai meghatározás szempontjából érdekes a laktámgyűrű reakciója hidroxilammal. A képződő hidroxamát színes vaskomplexe kolorimetriásan mérhető. Másik mérési lehetőség a jodometriás titrálás. Maga az ép penicillin molekula nem köti a jódot, de a lúgos hidrolízis terméke, a penicillosav viszont 7-8 atomnyi jódot is felvesz. Ezek a módszerek viszonylag nagy koncentrációk mérésére alkalmasak, így a gyártásközi ellenőrzéseknél használhatók. Az orvosi gyakorlatban előforduló kis koncentrációk méréséhez nem elég érzékenyek.

Mivel az oldallánc és az ellenion sokfélesége miatt a tömeggel megadott penicillintartalom a különböző készítményekben nem hasonlítható össze, ezért ezt inkább a hatást mérő nemzetközi egységben adják meg. 1 NE/IU = az a penicillinmennyiség, amely 50 ml-nyi standard összetételű tápoldatban éppen meggátolja egy adott *Staphylococcus aureus* törzs szaporodását. 1 IU = 0,6  $\mu$ g G-penicillin Na sónak felel meg.

### 1.2.1.1. A penicillin felfedezése – a penicillin story

A penicillint felfedező orvos - Alexander Fleming – munkája a kórházban kezelt fertőzések esetek, elsősorban a gennyes gyulladások mikrobiológiai vizsgálata volt. A felfedezést, mint annyi más esetben is a véletlen hozta. A kórokozók telepeit tartalmazó Petri csészébe véletlenül (mondhatjuk úgy is, hogy a nem elég steril laboratóriumi munka következtében) bekerült egy, pontosabban két penészspóra.

A másik véletlen (erre is mondhatjuk, hogy gondatlanság) az, hogy a használt Petri csészéket sokáig, legalább egy, de inkább két hétig tárolták a visszasterilizálás előtt. Ezalatt a spóra kicsírázott, telepet növesztett és előregedett, volt ideje eljutni az antibiotikum termelő fázisba. Fleming megfigyelte a telep körül kialakult kioltási gyűrűt, és arra következtetett, hogy a penész valamilyen gátlóanyagot termel, ami a baktériumok szaporodását akadályozza, de a termelő gombát magát nem károsítja.

Remélte, hogy ez az anyag a mikrobák ellen hatékony gyógyszer lehet. Mivel korábban a lizozim enzimmel foglalkozott, amely a baktériumok sejtfalának elbontása révén hasonlóan elpusztítja a mikroorganizmusok egy részét, ezt a még ismeretlen anyagot is fehérjének, enzimnek vélte. A penészt leoltotta, majd a jelenséget reprodukálta. A törzs azonosításáért Thom-hoz, egy profi mikológushoz fordult, aki azt rendszertanilag a *Penicillium notatum*-mal, egy ritkán előforduló fajjal azonosította.

A hatékony komponens izolálásával és szerkezetének felderítésével többen próbálkoztak, de a durva kémiai módszerek hatására az anyag rendszeresen elbomlott a kezük között. 1932-ben Clutterbuck csak annyit közölhetett, hogy a penicillinnek elnevezett hatásos anyag labilis, pH- és hőérzékeny gyenge sav. Orvosi alkalmazásban csak odáig jutottak, hogy a tenyészet szűrletét javasolhatták külsődleges fertőzések kezelésére. Az Oxfordban dolgozó Chain és Florey (későbbi Nobel díjasok) végül liofilizálással tudtak stabil készítményt előállítani, amivel megkezdhették az orvosi kísérleteket.

Az áttörést, mint annyiszor, egy háborús konfliktus hozta el. A második világháború kitörésével megnőtt az igény minden, a sebesült katonák gyógykezelésére alkalmas anyag és eljárás iránt. (Az I. világháborúban a megsebesült katonák nagy százaléka vérmérgezésben halt meg.) Katonai titoktartás mellett több kutató intézetet és gyógyszergyárat is bevontak. A szellemi és anyagi befektetés eredményeket hozott, felderítették a molekula szerkezetét és egyre hatékonyabb fermentációs és tisztítási eljárásokat dolgoztak ki.

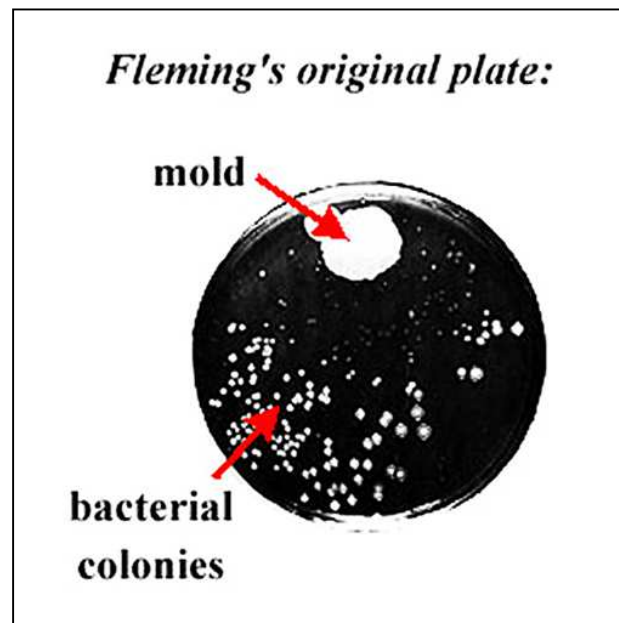
*Adalék: a titoktartás dacára hazafias kampányt hirdettek az amerikai háziasszonyok között, hogy romlott élelmiszereikről küldjenek penészmintákat a szövetségi törzsgyűjteménybe. A beküldött törzsek antibiotikum termelő képességét megvizsgálták. Végül egy háziasszony penészes grapefruit-járól (mások szerint dinnyéjéről) származó *Penicillium chrysogenum* tenyészet bizonyult a legjobbnak, egy nagyságrenddel több penicillint termelt, mint a Fleming által izolált törzs. Máiig ennek a törzsnek a sokszorosan mutált utódaival termelik a penicillint világszerte.*

1943 májusában az új gyógyszert már több száz sebesült esetben alkalmazhatták teljes sikerrel a szepszis kialakulásának akadályozására, illetve gyógyítására. 1944 nyarán, a normandiai partraszállásnál már minden hadikórházban ott volt a penicillin injekció.

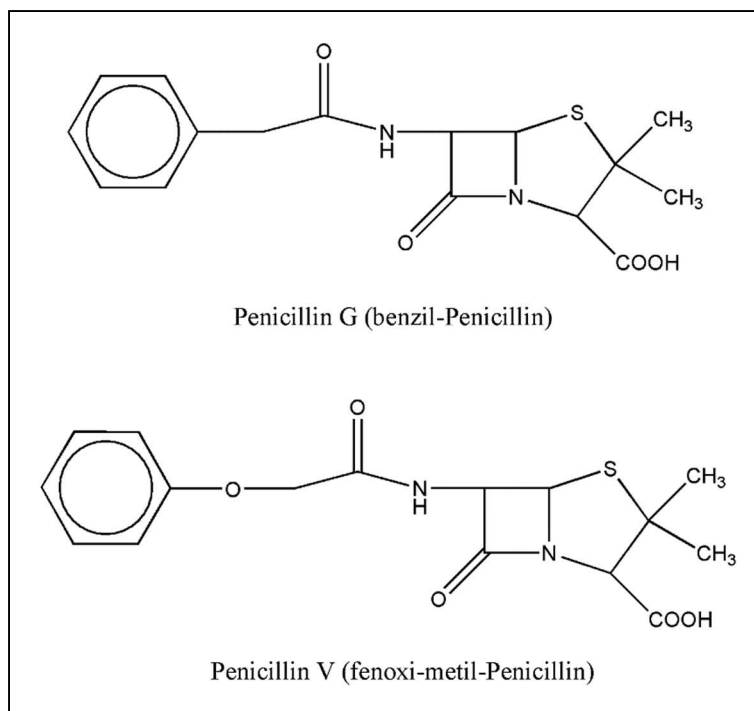
*Adalék: (Lehet, hogy urban legend.) A klinikai vizsgálatok idején történt, hogy F.D. Roosevelt elnök, aki ebben az időben már sokat betegeskedett, tüdőgyulladást kapott. Felmerült az orvosetikai kérdés, hogy szabad-e egy szépreményű, de még klinikai kipróbálás alatt álló gyógyszerrel kezelni egy olyan fontos személyt, mint az Egyesült Államok elnöke. Végül úgy döntöttek, hogy lehet, és eredményesen kezelték a fertőzést.*

*Adalék: A tesztelés során még nagyon rossz hatásfokú volt a gyártás, nagy ráfordítással kevés hatóanyagot tudtak előállítani, a penicillin unciánkénti ára magasabb volt, mint az aranyé. 100 ezer NE, azaz 60 mg penicillin akkor 20 dollárba került. A kezelése során felismerték, hogy a beadott penicillin 48 órán belül gyakorlatilag teljesen (97%-ban) kiürül a vizelettel. Ezért összegyűjtötték a kezelt betegek vizeletét, és visszanyerték belőle a penicillint. Még egyszerűbb is volt kinyerni, mint a sokkal több idegen anyagot tartalmazó fermentléből.*

A legelső felhasználásra került preparátum mindössze 1% hatóanyagot tartalmazott. A tisztításban való előrehaladás a kémiai szerkezet felderítésének lehetőségét is jelentette. A szerkezetkutatásban 1944-ben már 59 kutatóhely vett részt teljes katonai titoktartás mellett. Abban reménykedtek, hogy a kémiai szerkezet ismeretében a hatóanyag kémiai szintézisére



6. ábra Fleming eredeti felvétele



7. ábra A G és V penicillin szerkezete

lehetőséget találnak. Ma már köztudott, hogy kutató munkát az zavarta, hogy a különböző laboratóriumokban előállított gombatenyészetek szűrletei több mint 20 különféle penicillin keverékét tartalmazták, amelyek elsősorban az acilező savcsoport szerkezetében különböztek.

Az USA laboratóriumaiban előállított penicillin készítmények mért fizikai-kémiai adatai jelentős mértékben eltértek az Angliában előállított készítmények vizsgálatánál kapott értékektől. Az egyik esetben G-penicillin (benzil-penicillin), a másik esetben F-penicillin (pentenil-penicillin) volt a főtermék. A különbséget az okozta, hogy Angliában a szeszmoslékot (distillers solubles) használták táptalajként, az US kutatói viszont a fenilecetsavat is tartalmazó kukorica áztató lé (Magyarországon: kukoricalekvár) tejsavas erjesztéssel dúsított koncentrátumát alkalmazták a táptalaj nitrogén forrásaként. A tenyésztő táptalaj kémiai összetételének meghatározó jelentőségét felismerve javasolták a prekursorok alkalmazását. A tápközeghez adott fenilecetsav jelenlétében a kutató laboratóriumokban főleg benzil-penicillin képződött a fermentáció során. A szerkezetet végül 1945-ben, röntgen-kristallográfiai módszerekkel sikerült egyértelműen felderíteni.

### 1.2.1.2. A fermentált alapvegyületek

A G-penicillin nagy tételben gazdaságosan fermentálható, de nagyon érzékeny vegyület. Emiatt kerestek párhuzamosan egy saválló származékot, amit a V-penicillinben (fenoxi-metil-penicillin) találtak meg. Az iparban az adagolt prekursor vegyületek (G - fenilecetsav, V – fenoxiecetsav) megválasztásával benzilpenicillin vagy fenoximetil-penicillin állítható elő.

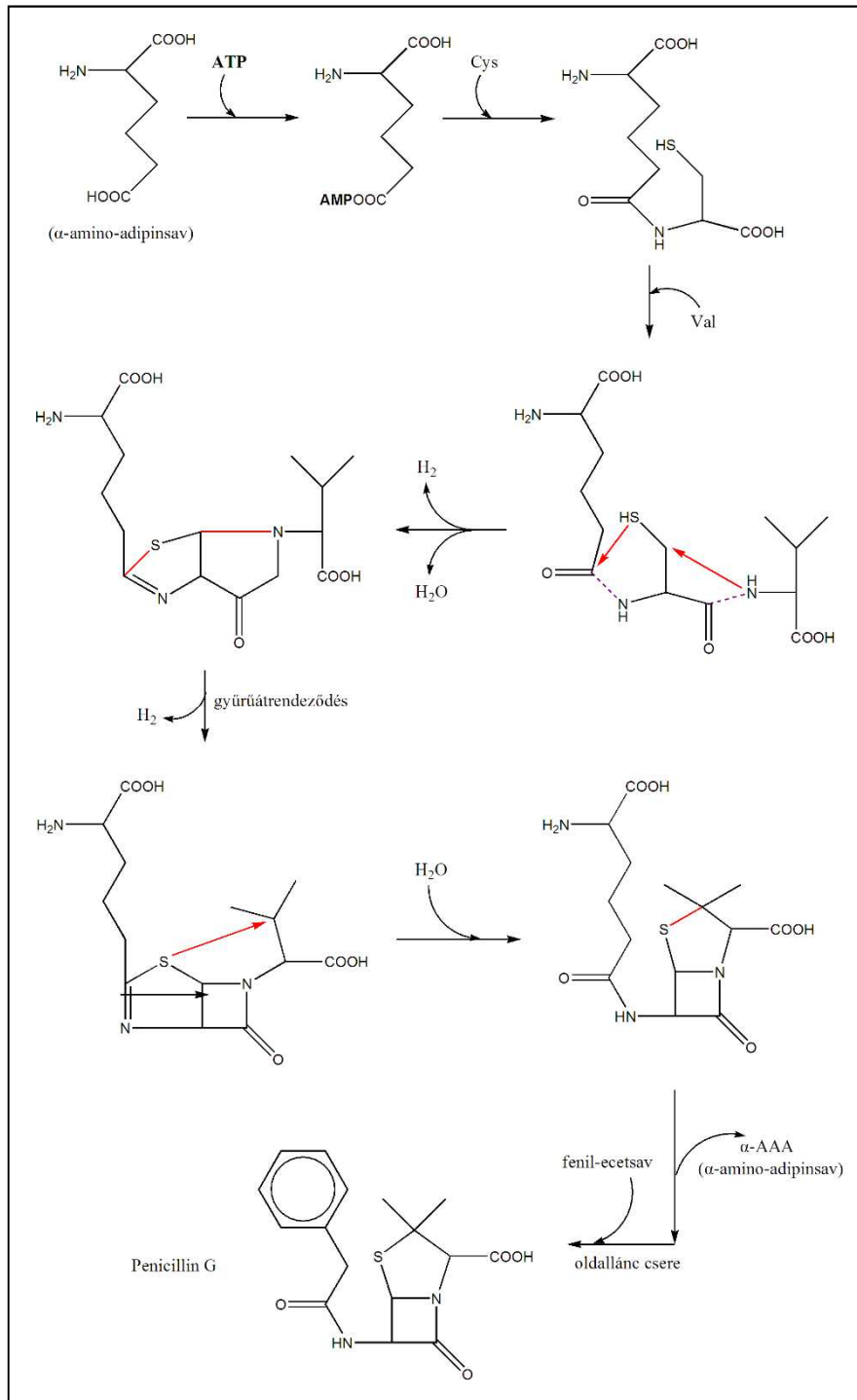
E két „klasszikus” penicillint viszonylag olcsón, tömegtermékként fermentálják. De gyógyszerként nem ezeket, hanem a belőlük előállított felszintetikus hatóanyagokat használják. A bioszintetikus penicillinekből enzimes hidrolízissel szabadítják fel a 6-APA-t, majd erre egy másik karbonsav származékot kapcsolva állítják elő a kívánt gyógyszer molekulát. Létezik olyan fermentációs eljárás is, amelyben az alapvázat (6-APA) állítatják elő, azonban ez az eljárás nem tudta kiszorítani a G-penicillin gyártását.



Ez a legnagyobb mennyiségben gyártott anyag, a V-penicillin és 6-APA piaca jóval kisebb. A további szintetikus lépésekkel a G-penicillinből penicillinszármazékokat, a V-penicillinből pedig cefalosporinokat állítanak elő.

### 1.2.1.3. A penicillin bioszintézise

A fehérje szintézishez felhasználásra kerülő L-cisztein és L-valin a nitrogén anyagcsere természetes terméke. A harmadikként szükséges az  $\alpha$ -amino-adipinsav a lizin szintézis köztes



8. ábra A penicillin G bioszintézisének fő lépései

termékeként van jelen, mégpedig adenilát formájában, vegyes anhidridként. A három aminosavból lépésről lépésre alakul ki a tripeptid.

Gyűrűzáródás és többszöri gyűrűátrendeződések után alakul ki a  $\beta$ -laktám váz. Az  $\alpha$ -amino-adipinsav csak templát, a folyamat végén lecserélődik egy másik savra, felszabadul, és visszakerül a folyamat elejére.

#### 1.2.1.4. Gyártásfejlesztés

A penicillin gyártás története alatt óriási utat tett meg.

Az első klinikai kísérlet 1941-ben történt. Ezt követően a kutatás átkerült az Egyesült Államokba, ahol 3 év alatt áttörést értek el a penicillin tanulmányozása és a gyártás ipari realizálása vonalán is.

Fleming idejében mindössze 2-3 IU/cm<sup>3</sup> termék koncentrációt sikerült elérni (1–2  $\mu$ g/ml), melynek már kimutatható antimikrobiális hatása volt. Ezt két év alatt 540  $\mu$ g/ml-re fokozták. Jelenleg a legjobb penicillint előállító törzsek termelőképessége 30.000  $\mu$ g/ml körüli.

A termelés mennyiségileg is növekedett, 1943 végére elérte a heti 100 grammot (100 ezer NE = 60 mg penicillin akkor 20 dollárba került, ez ma 1 milliárd NE ára). A fejlődés ütemét jól mutatja, hogy 1944 végére a havi termelés meghaladta a 200 kg-ot, amely 1946-ban évi 32 tonnára emelkedett.

A második világháború után az ún. UNRRA-segély (*United Nations Relief and Rehabilitation Association*) részeként a szabadalmi védeletről lemondva tucatnyi komplett penicillinyártó üzemet telepítettek Nyugat-Európába.

Manapság az összes penicillin származékot figyelembe véve az éves termelés százezer tonna körül mozog.

A gyártás fejlesztése iskolapéldája a fermentációs iparban követett komplex stratégiának. A gyártás két fő eleme a törzs és a technológia. A törzs termelőképességének növelésével biológusok (genetikusok, mikrobiológusok) foglalkoznak. A technológia tökéletesítése műszaki, mérnöki feladat. Ezekben belül még az alábbi fő területek/módszerek különíthetők el:

Törzsmunka (genetika, mikrobiológia):

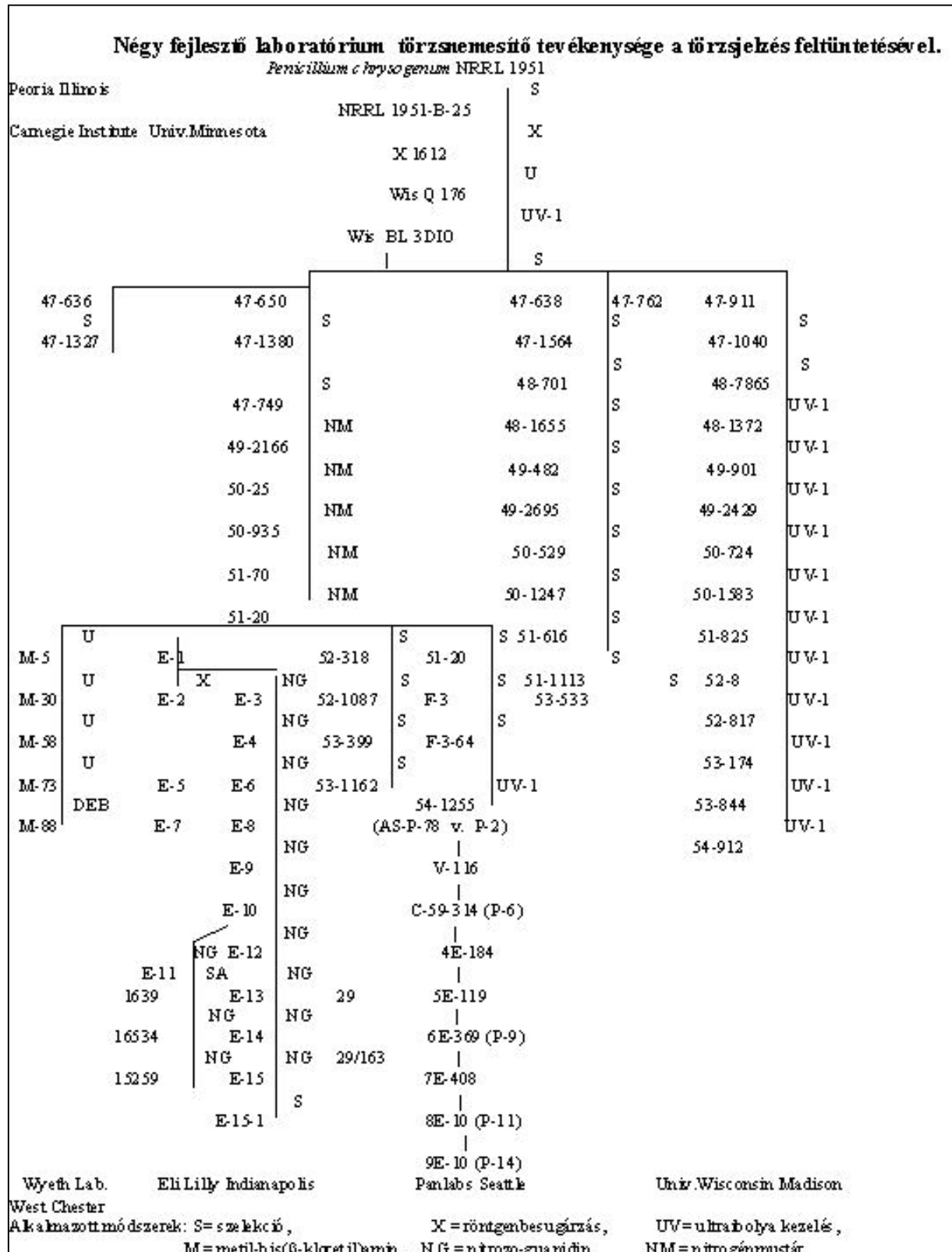
- törzsizolálás
- indukált mutáció
- szelekció
- törzsfenntartás

Technológia (mérnöki):

- felületi/szubmerz tenyésztés
- prekursorok alkalmazása
- tápoldatoptimálás
- anyagcserezabályozás (koncentrációk)
- levegőztetés, reaktor
- szabályozások (pH, t)

## 1.2.1.4.1. Törzsmunka

A penicillintermelő vad törzsek gyűjtése és vizsgálata (szakmai szlengben = screening, szkrínelés) az 1940-es évek elején lezajlott. A törzsnevesítés a kiválasztott *Penicillium chrysogenum* törzs termelőképességének fokozását jelentette.



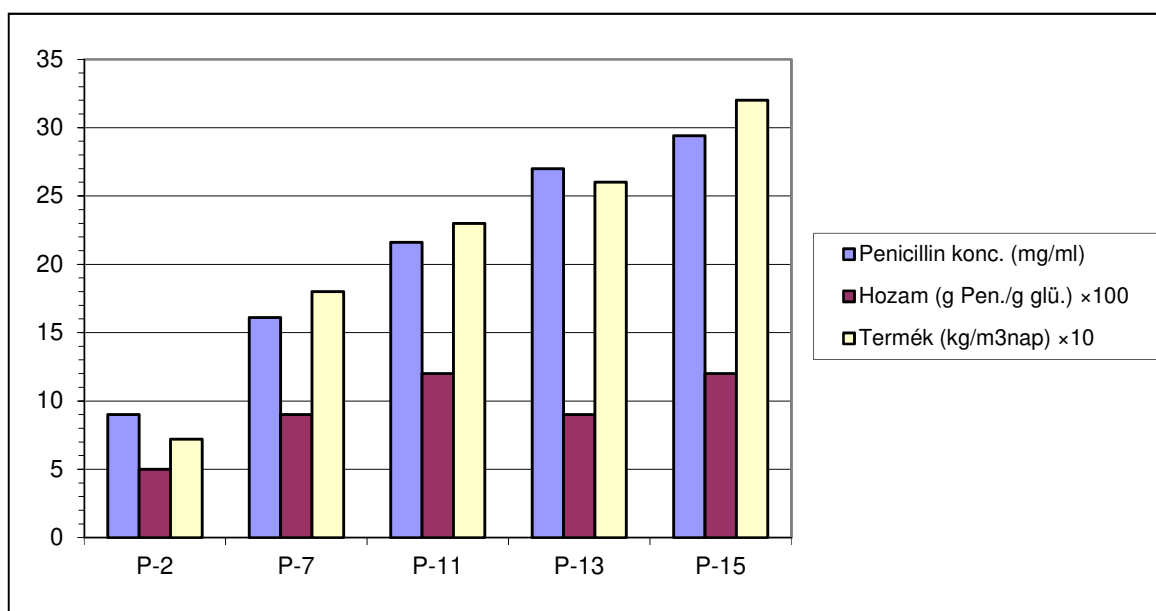
9. ábra A *Penicillium chrysogenum* mutációs törzsfája az 1950-es évekből

A törzs tulajdonságainak javítására évtizedeken keresztül itt is az indukált mutáció+szelekció módszerét alkalmazták. De mivel az egyes antibiotikum bioszintézisek biokémiája és különösen a regulációja (genetikai és enzimszintű szabályozása) igen bonyolult (esetleg 100 géntől is függhet a bioszintézis), a szekunder metabolitoknál nem lehet a máshol bevált, az anyagcsereutak pontos ismeretén alapuló hiánymutáns és rezisztens mutáns-izolálási technikákat használni. Ehelyett a „black-box” screeninget alkalmazták. A sejt belső működését ismeretlennek (fekete doboz) tekintik, és csak egyetlen célfüggvénnyel, a termelt penicillin titerrel foglalkoznak. Ehhez viszont nagyon sok mutánst kell megvizsgálni. Túlnyomó részük gyengébb termelőképeségű, mint a kiindulási tenyészet, de van köztük néhány, amelyik többet képes termelni. Ezeket tenyésztik tovább, és vetik alá újabb és újabb mutációknak. A jelenleg használt törzsek mindegyike több évtized alatt több száz ilyen mutációs cikluson esett át.

A törzsnemesítés folyamatát mutációs törzsfával lehet bemutatni, melyből az egyes variánsok „szülő-gyermek” viszonya mellett az is látható, hogy egy-egy lépéssel mennyit lehetett javítani a törzseken. A 9. ábra a *Penicillium chrysogenum* törzsfáját mutatja az 1950-es évekből. Magyarországra a 51-20 jelzésű mutáns került, feljavítása évtizedeken keresztül folyt (GYOKI, BIOGAL).

A törzsnemesítések célja alapvetően a hozamnövelés, de emellett más célokat is figyelembe vehetnek: - fermentációs (habzás, viszkozitás csökkentése), illetve - feldolgozási (pigmentmentes termék) kritériumok szerinti hatékonyságnövelés. A *P. chrysogenum* törzs eredetileg sárgás pigmentet is termelt (chrysogenin), mely azonban terhelte a törzs anyagcserejét a fermentáció alatt, ezért mutációs eljárásokkal működésképtelenné tették a pigment termelés egyik génjét.

A másodlagos anyagcsere bonyolultsága miatt a modern rekombináns technikák célzott beavatkozása sokkal nehezebb, mint a primer metabolizmusnál. Törekednek a bioszintézis kritikus pontjainak (szűk keresztmetszet, „bottle neck”) felderítésére és „kitágítására”, de ez sokkal összetettebb feladat, mint a prokariótáknál.



10. ábra Penicillin-termelő törzsek fejlesztése, hozamok alakulása

A termelésben használatos „agyonmutált” törzsek már jelentősen különböznek a vad típusától. Szaporodásuk során érvényesül a „visszatérés az átlaghoz” törvényszerűség, azaz hajlamosak a visszamutálódásra, ami a termelő képesség csökkenésével jár. A jól termelő egyedek

eltorzított anyagcseréjük miatt kevésbé életképesek, lassabban szaporodnak, mint a visszamutálódottak, így a szaporodásban lemaradnak, kihígulnak a tenyészetből. Emiatt meg kell oldani a törzsek eltartását, konzerválását olyan módszerekkel, amelyekkel éveken, évtizedeken keresztül megőrizhető a kialakított genetikai állomány. Erre a cseppfolyós nitrogénben tárolt vagy fagyasztva szárított szubkultúrák (master strain bank) alkalmasak. Másrészt az átolttással fenntartott állománynál is folyamatos szelekciót kell végezni, hogy le ne romoljon a termelőképesség.

#### 1.2.1.4.2. Fermentációs fejlesztések

Kezdetben felületi, tálcsás fermentációt alkalmaztak, mivel ez a technika citromsav előállításra már kidolgozott volt. Több négyzetméteres saválló tálcákon 10-20 cm vastag steril tápfolyadék rétegen nevelték az *Aspergillus niger* tenyészetet. A tálcák között steril levegő átfúvatásával vitték be az oxigént és vittél el termelt hőt. Ez a technológia viszont a penicillin gyártás esetén sokkal rosszabbul működött. Probléma volt a sterilitás fenntartása, mivel a citromsav oldat 2-3 pH-ja távol tartotta az idegen mikroorganizmusokat, a penicillin fermentlé viszont közel semleges, érzékeny a befertőződésre. Másrészt a sokkal kisebb volt a hozatal, a citromsav 8-10%-os koncentrációja helyett a penicillinét csak század százalékokban lehetett kifejezni.

1945-re a felületi fermentációs technikát felváltotta a szubmerz fermentációs eljárás, ennek következtében az elérhető penicillin koncentráció a többszörösére nőtt.

A már említett prekursorok alkalmazása egyrészt egységessé tette a terméket, másrészt egyből 4-8 szorosára növelte a penicillin termelést.

A fermentáció kisméretű reaktorokban kivitelezve bizonyosan nem lesz gazdaságos, ezért nagyobb (több száz m<sup>3</sup>) reaktorok használata célszerű.

#### 1.2.1.5. Az anyagcsere-folyamatok irányítása a fermentáció során

A tápoldatok optimálásához az első lépcső volt a kukoricalekvár pozitív hatásának felismerése a szeszmoslékhoz (DS, distillers solubles) képest.

A későbbiekben felismerték, hogy a folyamat során a közeg összetételét változtatni kell a mikroorganizmus igényeinek megfelelően. A penicillin termelés jellegzetes szekunder metabolit fermentáció, két szakasza van: a sejtek elszaporítása körülbelül 40 órát vesz igénybe, míg a termelő fázis további 4-7 nap.

A tenyészet oxigén igénye mindvégig nagy, a levegő bevitel mértéke 0,5-1 vvm. A pH optimum közel semleges, pH= 6-7 között vezetik a fermentációt. Az ipari fermentációk általában rátáplálásosak, más, félfolytonos és kétlépcsős folytonos technológiákról csak kisebb mértékben olvashatunk.

Első, sejtszaporítási szakaszban (kb. 40 h) jó tápanyagellátás, intenzív levegőztetés, keverés mellett az elsődleges anyagcsere jellemző. A tápanyag ellátás bőséges, minden rendelkezésre áll a növekedéshez. Könnyen hasznosítható tápanyagforrások a kritikus feletti koncentrációban. Szénforrásként néhány százalék cukrot (glükózt = keményítő hidrolizátum, szacharózt = melasz) adnak, célszerűen olyan mennyiségben, hogy az a szaporítási szakasz végére elfogyjon, illetve koncentrációja a kritikus alá csökkenjen. Hasonló a nitrogén és a foszfor bevitele is. Az ammónium és foszfátsók könnyen és gyorsan hasznosulnak, de mennyiségüket úgy célszerű megválasztani, hogy koncentrációjuk a növekedési fázis végére a limitáló tartományba csökkenjen.

A termelési szakaszban a törzs anyagcseréjét át kell állítani a szekunder metabolizmusra. Ennek kikényszerítésére többszörös tápanyag limitben tartjuk a sejteket.

*szénforrás:* a cukorellátás visszafogására a klasszikus megoldás a nehezen metabolizálható szénforrások alkalmazása. A *Penicillium* törzsek az *Aspergillus*-okkal ellentétben viszonylag kevés extracelluláris enzimet termelnek, ezért csak lassan képesek hidrolizálni a laktózt vagy a keményítőt. Ezek adagolásánál kicsi a metabolizálható szabad cukor koncentrációja, a tenyészet szén-limitbe kerül. Korszerűbb megoldás kis mennyiségű glükóz oldat folyamatos, vagy gyakori adagolása. Így állandóan jelen van a cukor, de koncentrációja a limitáló szint alatt marad. A glükóz adagolását megoldhatjuk vezérléssel vagy szabályozással. Az első esetben a tapasztalatok alapján kialakíthatunk a betápláló szivattyú számára egy állandó vagy többlépcsős adagolási sebességet tartalmazó programot, ami alacsony cukorszintet biztosít. Az adagolás szabályozható az oldott oxigén koncentrációjának mérésével: ha magasabb a glükóz koncentráció, akkor gyorsabb a fogyasztás – ehhez több oxigén kell – az oxigén koncentráció kicsi lesz. Amikor a glükóz elfogy, nincs mit oxidálni, ettől az oxigén koncentráció emelkedik – ekkor egy kevés steril glükóz oldatot adagolnak a fermentorba. Ettől az oldott oxigén koncentráció lemegy, és előlről indul a ciklus. Ipari méretű fermentoroknál nem elegendő egy ponton betáplálni, az egyenletesebb glükóz szint elérésére több szinten, több ponton adagolnak.

*nitrogénforrás:* a nitrogénforrások közül a *Penicillium*ok a szerves és szervetlen anyagokat egyaránt hasznosítják. Az ammónium-szulfát jól hasznosul, mind a nitrogén, mind a kén tartalma beépül, de túl nagy koncentrációja az elsődleges anyagcserének kedvez.

A komplex források (pl. szójadara, kukoricalekvár) nitrogénjéhez sokkal nehezebben férnek hozzá a sejtek, mivel ezeket előbb az extracelluláris enzimeknek el kell hidrolizálni. Ez lassú folyamat, a felhasználható nitrogéntartalmú vegyületek fokozatosan szabadulnak fel, koncentrációjuk kicsi, a tenyészet tartós nitrogén limitben marad.

Ezeknek megfelelően itt is kétféle adagolási stratégia lehetséges. Lehet az ammónium-szulfát oldatot kis térfogatárammal folyamatosan adagolni, illetve lehet a szerves nitrogénforrást nagyobb mennyiségben, ritkábban (pl. naponta) beadni.

*foszfor:* jelenléte az elsődleges anyagcserének kedvez, ezért ebben a fázisban már nem adagolnak többet

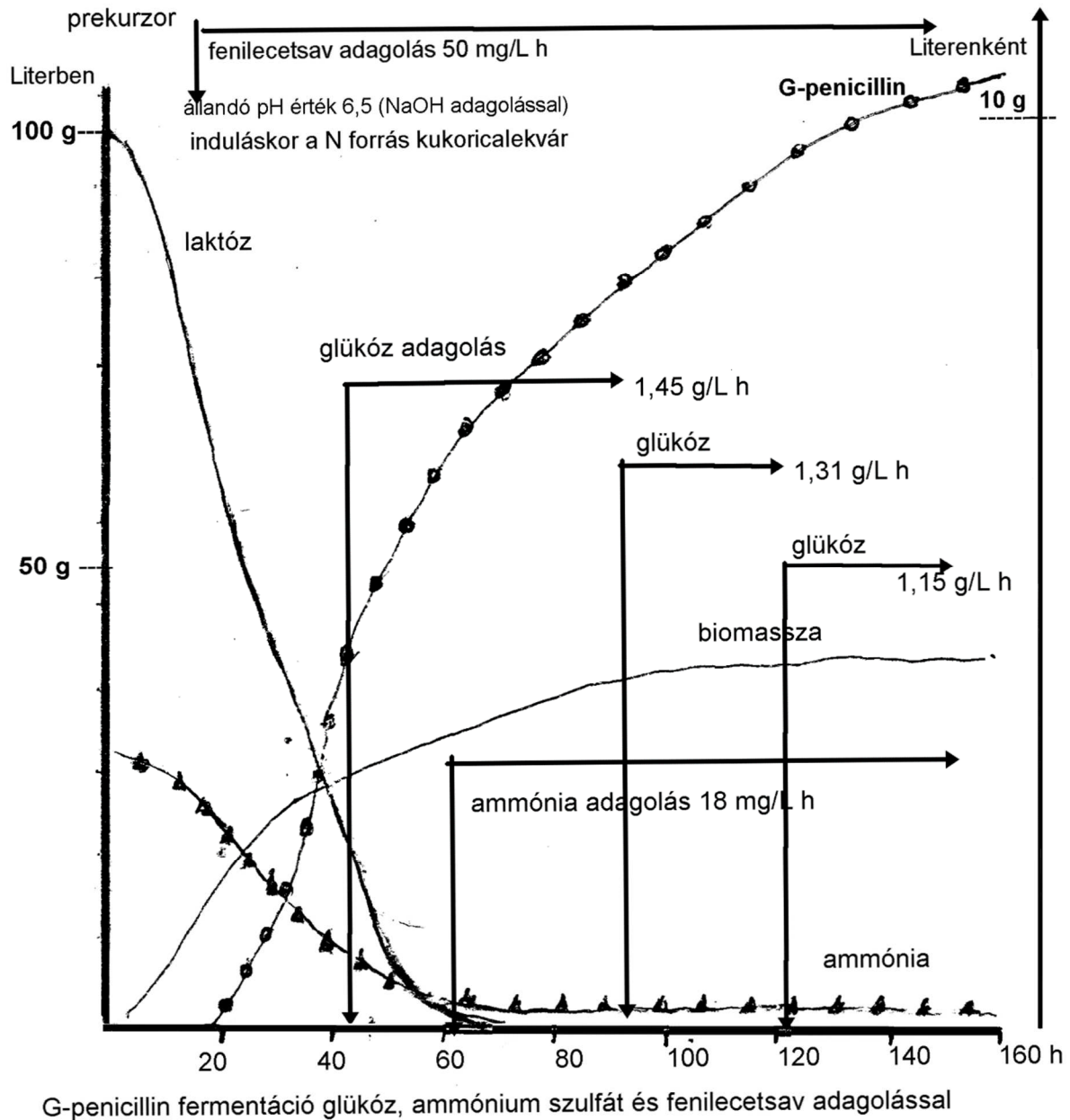
*prekurzor:* a G-penicillin esetében fenil-ecetsavat adagolnak a termelési szakaszban. Koncentrációját a 2-4 g/l közötti sávban tartják. 2 g/l alatt lelassul a penicillin termelés, 4 g/l fölött viszont már károsítja a tenyészetet. Szerkezetük analóg a benzoáttal, illetve a p-hidroxibenzoésav-észterekkel (parabének), amelyeket fungisztikumként alkalmaznak élelmiszerek és kozmetikumok konzerválására.

*Adalék:* a másodlagos anyagcsere kikényszerítésében fontos szerepe van a vas-ionoknak. Jelenlétiük a primer folyamatoknak kedvez, elnyomja az antibiotikum termelést. Ehhez olyan kevés vas is elegendő, ami a készülékek falából oldódik ki. A BIOGAL Gyógyszergyárat az ötvenes években építették, és az első nyolc darab 30 m<sup>3</sup>-es fermentort nem rozsdamentes, hanem közönséges acélból készítették. Amikor penicillint fermentáltak benne, a folyamat nagyon rossz termeléssel ment, kimutathatóan a beoldódó vas miatt. A rozsdamentes acél készülékekben ez jelenség nem fordul elő.

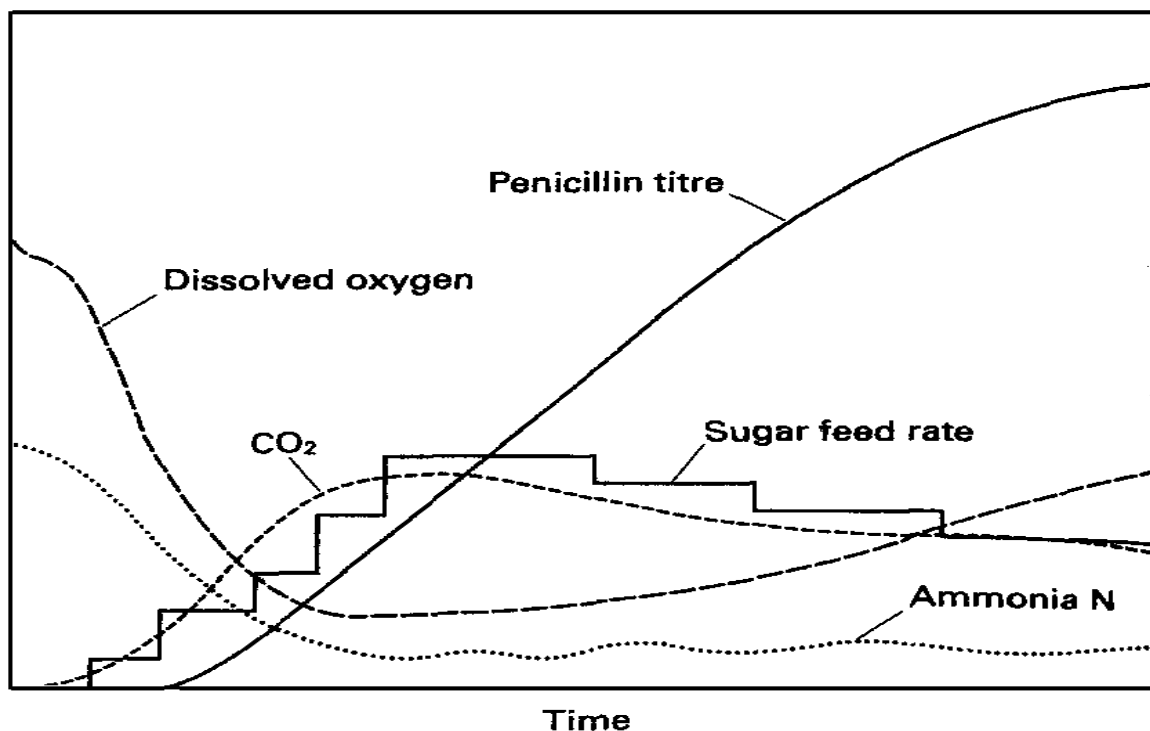
A fermentáció során arra törekednek, hogy a termékképzési szakaszt minél hosszabbra nyújtsák. Ezzel megnövelik a termékkoncentrációt és a termék mennyiségét is.

Az anyagcsere paraméterek lefutását a penicillin fermentáció során mutatja be a 11. és 12. ábra. A növekedési szakaszban az oldott oxigén és a nitrogén-forrás koncentráció meredeken lecsökken. Az oxigén szint hosszú ideig alacsonyan marad, majd a tenyészet öregedésével lassan emelkedik. Az amino-nitrogén szintet alacsonyan tartják, a görbe enyhe hullámozása szerves nitrogén-forrás beadagolását jelzi. A penicillin a két szakasz határán jelenik meg, a titer növekedése hosszan lineáris, majd az öregedéssel enyhén lehajlik. Az egyetlen nem-koncentráció paraméter a cukor betáplálási sebesség. Az adagolás lépcsős profil szerint előbb növekszik, majd közel állandó, kissé csökkenő. A termelt szén-dioxid görbéje szinte pontosan követi

a cukoradagolást. Összevetve a penicillin termelés sebességével látható, hogy ez a három paraméter együtt mozog. A bevitt cukorból majdnem sztöchiometriai pontossággal állandó arányban képződik penicillin és szén-dioxid.



11. ábra Penicillin fermentáció lefutása



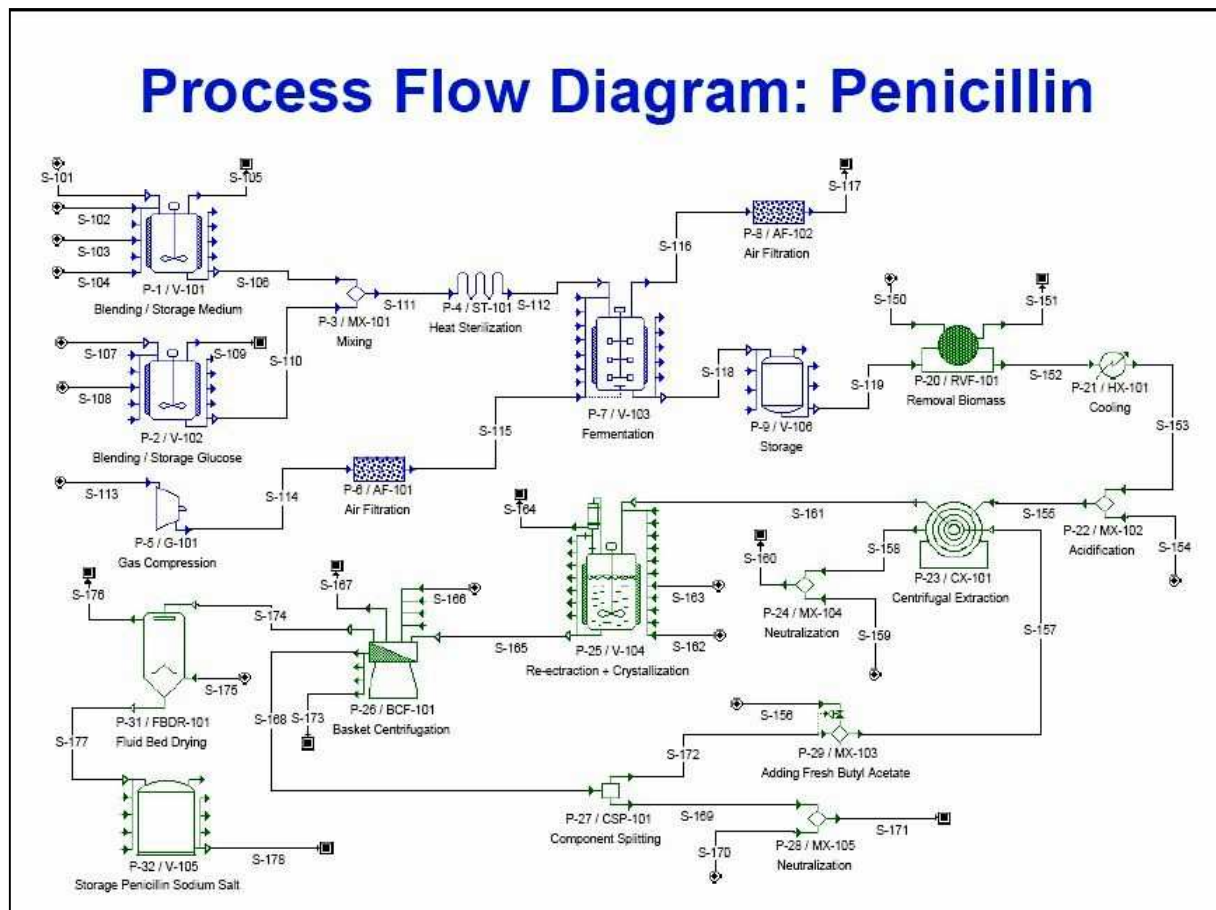
12. ábra: Koncentrációk alakulása a penicillin fermentáció során

### 1.2.1.6. Feldolgozás

Ipari léptékben a fermentáció vágásánál körülbelül 30 g/l a penicillin koncentráció (kb. 50.000 IU/ml). A termék extracelluláris, csak körülbelül 1% található a micéliumban. A sejtömeget vákuum dobszűrővel választják el és a szűrőn vízzel mossák. A micélium állati takarmányozásra alkalmas, ha nem marad benne prekursor (a fenil-ecetsav kellemetlen, szúrós szagú anyag). Léteznek olyan technológiák is, amelyben nem választják el a sejtömeget, hanem a teljes fermentlevet viszik extrakcióra. A szűrlet további feldolgozásának kulcslépése az extrakció szerves oldószerrel. A penicillin gyenge sav, disszociálatlan formában nem ionos, kicsi a hidratburka, így a szerves fázisban jobban oldódik. A disszociáció visszاسzorítható erős savval, pl. kénsavval. Ebben a savas közegben (pH~2) viszont a savérzékeny penicillin gyorsan elbomlik. A bomlási reakció visszاسzorítására két mérnöki trükköt alkalmaznak. Az egyik a fermentlé lehűtése – alacsonyabb hőmérsékleten a bomlási reakció sebessége jelentősen csökken, míg a megoszlási hányados alig változik. A másik a rövid kontaktidő, minimálisra csökkentik azt az időt, amit a penicillin a savas közegben tölt. A savanyítást egy kis térfogatú keverő egységben végzik, amelyet közvetlenül a szeparátor centrifuga elé kötnek be. A szűrt fermentlevet, az oldószert és a kénsavat egyszerre táplálják be, összekeverik és azonnal a szeparátorra engedik. Ez felfogható egy folytonos működésű kevert reaktornak, ebben a tartózkodási idő a térfogat és a térfogatáram hányadosa. Megfelelő beállítással ez akár másodperces nagyságrendre is leszorítható, így a penicillin csak nagyon rövid ideig érintkezik a savval.

Az extrakcióhoz sokféle szerves oldószer használható, de általában oxigéntartalmúakat (pl. észterek: amil-acetát, butil-acetát) alkalmaznak. A feldolgozás következő lépése a reextrakció közel semleges vizes pufferrel. Ha maradtak gyenge sav típusú prekursorok a fermentlében, akkor azok ugyanúgy viselkednek, mint a penicillin: azok is átoldódnak a szerves fázisba, majd





13. ábra A penicillin gyártás folyamatábrája

vissza vizes közegbe. Az apoláris, nem-ionos habgátlók viszont elválaszthatóak: átoldódnak ugyan a szerves oldószerbe, de a vizes fázisba nem térnek vissza. Ha a reextrakciónál a vizes fázis sok alkálisót (pl. kálium acetátot, nátrium-hidrogén karbonátot) tartalmaz, akkor a penicillin alkáli só formájában egyből kikristályosítható. Egyes technológiákban a finomfeldolgozás során az extrakció-reextrakció-kristályosítás műveletsort megismétlik más oldószerrel. A termék mellől a színyanyagokat aktív szénnel távolítják el.

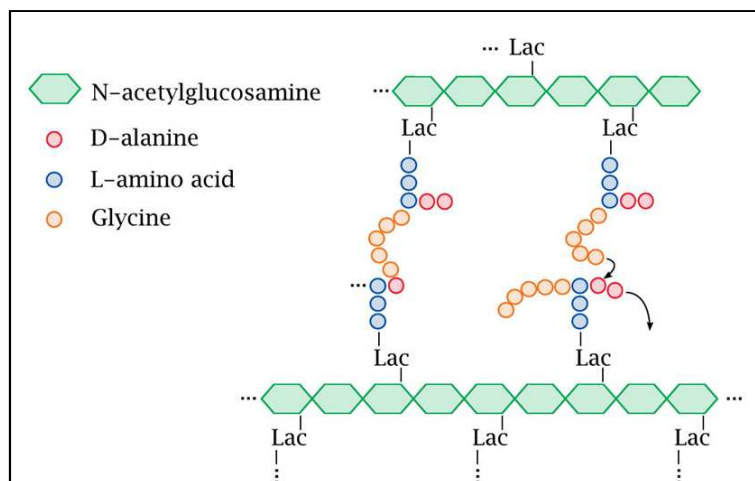
Magyarországon (Debrecen, Biogal) megszűnt a penicillinyártás, annak ellenére, hogy saját fejlesztésű törzsekkel dolgoztak.

### 1.2.1.7. Hatásmechanizmus

A  $\beta$ -laktám antibiotikumok a Gram-pozitív sejtek sejtfaleszintézisét gátolják, így hatásuk következményeként abnormális sejtalkakok, protoplasztok képződnek.

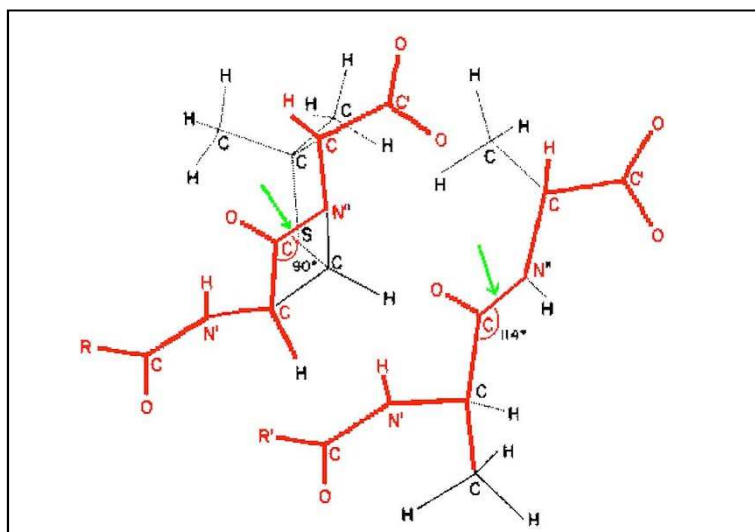
Csak a szaporodó sejteket pusztítják el, a nyugvó sejteket nem, ez a mikrobiológiában törzsszelekcióra használható.

A baktériumok sejtfaleszintézise során egy transzpeptidáz enzim az egyik NAG-NAM (N-acetilglükózamin és N-acetilmuraminsav) alaplánchoz kapcsolódó oligopeptid oldallánc végén lévő D-Ala-D-Ala dipeptid végső alaninját lehasítja és a helyére a másik oldallánc penta-glicinjének terminális aminosavát köti. Így keresztkötések alakulnak ki, a lineáris láncok térhálósá alakulnak. Ennek a lépésnek a gátlásával fejtik ki hatásukat a penicillin típusú antibiotikumok.



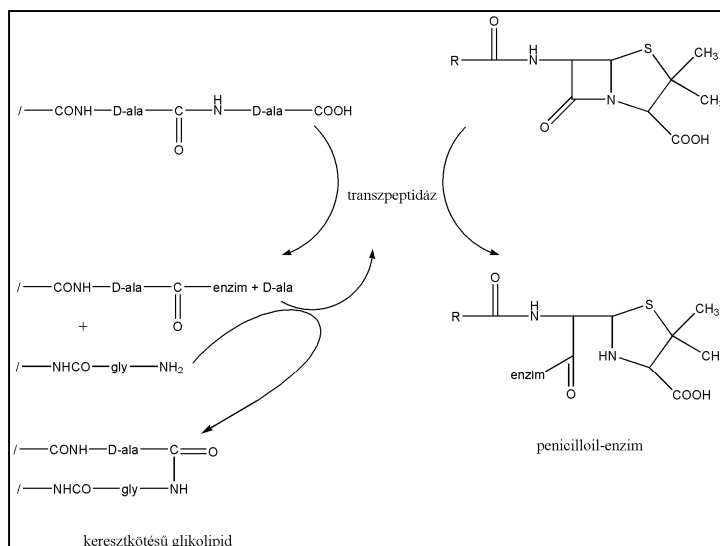
14. ábra A bakteriális sejtfa szerkezete és kialakulása

A penicillinszármazékok hatása azon alapul, hogy  $\beta$ -laktám gyűrűjük a bakteriális sejtfa pentapeptidjében található terminális D-alanin-D-alanin strukturális analógja. A penicillin-kötő fehérjék penicillin jelenlétében a pentapeptid terminális D-alaninjának lehasítása helyett a penicillinek  $\beta$ -laktám gyűrűjét hasítják, melynek következtében egy stabil penicillin-enzim komplex alakul ki, mely a transzpeptidáz irreverzibilis inaktiválódásához vezet. A penicillin az enzim kompetitív, „suicid” inhibitora.



15. ábra A penicillin és a D-Ala-D-Ala dipeptid szerkezete

A penicillinszármazékok baktériumokra gyakorolt lítikus hatása a sejtfa szintézis egyensúlyának felborulásával magyarázható. A sejt növekedése, a sejtfa tágulása csak úgy lehetséges, hogy a burkot az enzimek folyamatosan lebontják és újraszintetizálják. A penicillinek hatásának köszönhetően a transzpeptidáció gátolt, azonban a bontó enzimek, az ún. autolizinek megtartják aktivitásukat és folyamatosan hasítják a peptidoglikán hálózatot. Ennek következtében a sejtfa meggyengül és ettől a sejtek elpusztulnak. A nyugvó, nem növekvő, nem szaporodó sejtek túlélhetik a penicillines kezelést, mert növekedés hiányában nem történik transzpeptidáció, amit gátolna a penicillin jelenléte és ekkor az autolizinek sem működnek. A túlélő sejtek az antibiotikus kezelést követően újabb fertőzést okozhatnak.

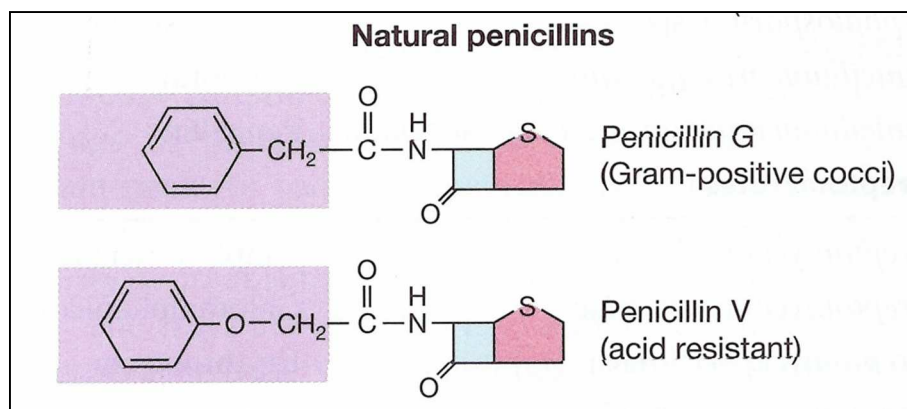


16. ábra A penicillin bekötődése a transzpeptidáz kötőhelyére

### 1.2.1.8. Félszintetikus penicillinek

A természetes penicillinek forradalmasították a fertőző betegségek és sebfertőzések kezelését, de az orvosi alkalmazás során akadt néhány hátrányos tulajdonságuk. A G-penicillin szájon át nem adható, csak injekcióban, mert a gyomorsavban elbomlik. A hatásspektrum a patogén mikrobák széles köréhez képest szűk, csak a Gram-pozitív kórokozókra terjed ki. A penicillin terjedésével együtt megkezdődött a rezisztencia terjedése is. Egyre több törzsben jelent meg a béta-laktamáz enzim. Emellett emelkedő számban jelent meg a penicillin érzékenység, az allergia. Az első években ennek oka a preparátumok nem megfelelő tisztasága volt, de ma már a tiszta penicillinre is kialakulhat immunreakció (haptén hatás).

A felsorolt nehézségek leküzdésére a penicillin molekula szerkezetét sokféleképpen módosították. A 6-APA alapvázat általában változatlanul hagyták, viszont az oldalláncot sokféle szerves savval helyettesítették. Az alapváz szintetikus előállítására nem gazdaságos, azt mindenképpen fermentációs úton állítják elő. A penicillin származékok előállítása a fermentált G-penicillin oldalláncának lecserélésével történik. Ipari méretekben túlnyomórészt G-penicillint fermentálnak, kisebb mennyiségben termelnek V-penicillint és 6-APA-t is.

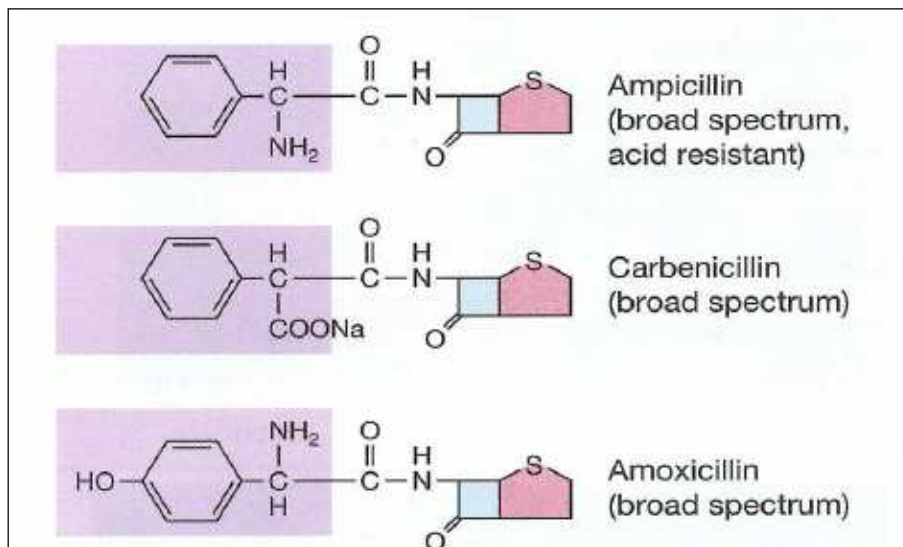


17. ábra Fermentációval előállított penicillinek

Az oldallánc lecserélése szerves kémiai módszerekkel is lehetséges, azonban az átalakításhoz igen alacsony hőmérséklet ( $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) szükséges, illetve szigorúan vízmentes körülményeket kell fenntartani (absz. butanol), így ez a szintetikus kémiai eljárás nem lehetett versenyképes az enzimes technológiával.

Az oldallánc a félszintetikus penicillin tulajdonságait erősen befolyásolja. Elektronszívó csoportokkal a savamid kötést védeni lehet, ezáltal a molekula savállóbb, mint az eredeti G-penicillin. Sztérikus védőcsoportokkal a penicillináz rezisztencia növelhető. A hatásspektrum változtatható (kiszélesíthető) szubsztituált fenilecetsav ( $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COOH}$ , észter csoportok) beépítésével.

Félszintetikus penicillinek: ampicillin (széles spektrumú, savtűrő), amoxicillin (szélesebb spektrumú), carbenicillin (szélesebb spektrumú). A nevekben az *am*- előtag az rákötött csoporton található amino-, a *carben*- a karbonsav csoportra utal.



18. ábra: Félszintetikus penicillinek

A félszintetikus penicillinek előállítása kétlépéses folyamat:

1. Hidrolízis, a molekula két részét összetartó savamid kötés szelektív bontása.



2. N-acilezés, az új oldallánc rákötése



Az acilezés karbonsav helyett legtöbbször karbonsav-származékkal (pl. észterrel) történik, mert a savcsoport disszociációja akadályozza a reakciót. Acil-donorként pl. fenil-glicin-metilésztert, illetve p-OH-fenil-glicin-észtert alkalmazva, létrejön a savamid kötés a 6-APA-val. Ez a reakció az enzim „eredeti funkciójának” technológiai megfordítása. Így a két ellentétes irányú reakció katalizálható ugyanazzal az enzimmal, célszerűen eltérő körülmények között. Ez az enzim a *penicillin-aciláz/penicillin-amido-hidroláz* – mindkét név helyes, attól függően, hogy a reakció melyik irányát tekintjük.

Mivel a hidrolízisnél gyenge sav szabadul fel, ezért a pH-t szabályozni kell. A  $\text{pH}=8$  értéken az enzim a bontás irányába katalizál, míg a  $\text{pH}=4$  értéknél a szintézis irányába tolja el az egyensúlyt ugyanaz az enzim. A termelt 6-APA oldatban még a penicillinnél is érzékenyebb

(reagál a levegő széndioxidjával is, valamint hajlamos a polimerizációra), ezért érdemes kikristályosítani, vagy gyorsan lehűteni, hogy stabil maradjon.

Számos törzs termel ilyen aktivitású enzimet, ezek két fő csoportba sorolhatók:

Az I. típus penész eredetű (pedig a penészekre nem is hat a penicillin), jellemző pH optimuma pH ~10, az optimális hőmérséklet  $t \sim 50$  °C. Inkább a stabilabb V-penicillinre alkalmazható, mint a G-re.

A II. típust baktériumok termelik, jellemzői:  $pH_{opt} \sim 8$ ,  $t_{opt} \sim 40$  °C. Számos törzs termeli, de ipari célokra főleg *E. coli* mutánsokat és manipulált törzseket használnak. Az enzim képződése fenil-ecetsav adagolással indukálható, ettől az enzim aktivitás kb. ötszörösére nő. A megtermelt enzimet kétféle formában is fel lehet használni. Alkalmazható nyugvósejtes tenyészet formájában, illetve tisztított, rögzített enzimeként.

A sejtömeg felhasználásánál a biomasszát kimossák és szakaszos üzemben pH=8;  $t = 37$  °C mellett hozzák össze a penicillinnel. A keletkező 6-APA-t a penicillinnel analóg módon savazással extrahálják (az oldószer pl. MIBUK = metil-izobutil-keton).

Immobilizált enzimpredparátum készítésénél a sejteket centrifugálással választják el a fermentálótól, egy kisebb térfogatú pufferoldatban felszuszpendálják, majd nagynyomású homogenizátorral feltárják. Ezt kétlépeses kisózás követi: először a sejtörmelékeket és a nukleinsavakat csapják ki, majd az enzimet. Az újraoldott enzimet tovább tisztítják, majd a tisztított fehérjét polimer golyókra immobilizálják (ma főleg az ún. Eupergit polimerre rögzítik). Ezeket az immobilizált enzimecskéket kereskedelmi forgalomban meg lehet vásárolni, és eléggé stabilisak az ipari felhasználáshoz, felezési idejük több hónapos.

Magára az enzimes átalakítás technológiájára több alternatíva is létezik a reakció eléggé különleges viselkedése miatt. A dezacilezési reakció kinetikai viselkedése ugyanis erős *termék- és szubsztrát-inhibíció*t mutat, azaz mind a 6-APA, mind a penicillin-G inhibitorai a reakciónak. Részletes számítások azt mutatták, hogy töltött oszlop használata lenne az optimális ebben az esetben. Amint azonban a reakció előrehalad, a pH csökken, hiszen savas karakterű karboxilsav (fenilecetsav) az egyik bomlástermék. A pH-csökkenés viszont egyrészt a 6-APA termék bomlásához vezet, másrészt ellentétes irányba fordítja a reakciót, ezért pH-szabályozást kell megvalósítani. A pH-szabályozás azonban töltött oszlopban nem lehetséges a keveredés hiánya miatt.

Ezért a Toyo Ozo (japán cég) klasszikus eljárása során recirkulációs technikát használnak. A rögzített enzimmel töltött, párhuzamosan kötött oszlopokon (18 darab) folyamatosan áramlik a penicillin oldat. Az oszlopokról lejutó egyesített térfogatáram egy kevert tartályreaktorba kerül, ahol a pH-t visszaállítják, és az oldatot visszaviszik az oszlopokra. A cirkulációt 3 órán keresztül folytatják, ezalatt 86%-os konverziót érnek el.

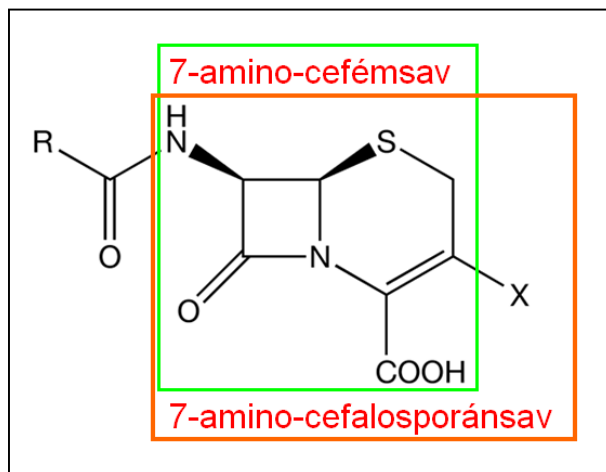
Egy másik eljárás során a tartályreaktor–oszlopreaktor közti ellentmondást úgy oldották fel, hogy négy tagból álló kaszkád reaktort építettek. Így megoldható, hogy a keveredés is jó legyen és a plug-flow üzemmódot is megközelítsék. Így több mint 95%-os Penicillin-G konverziót sikerül elérni.

Mindkét eljárás esetében a reaktorokból távozó reakcióelegyből a pH izoelektromos pont-ra (pH=4,3) állításával kicsapják a 6-APA-t, majd szűrés és mosás után szárítják.

## 1.2.2. Cefalosporinok

A cefalosporinok szerkezete hasonlít a penicillinek szerkezetéhez. A  $\beta$ -laktám gyűrűvel kondenzált másik gyűrű itt nem öttagú tiazolidin, hanem egy taggal nagyobb dihidrotiazin gyűrű. A váz alapja a 7-amino-cefémsav, angol rövidítéssel 7-ACA.

Az R oldallánc mellett egy másik, X-el jelölt szubsztitúciós lehetőség is található a hattagú gyűrűn. Ez alapesetben metilcsoport, de legtöbbször acetilezett formában van. A fermentált alapvegyület a Cefalosporin C (röviden: Cef-C), amelyben R=  $\alpha$ -amino-adipinsav, az X pedig  $-\text{CH}_2\text{-O-CO-CH}_3$ .



19. ábra A cefalosporin molekula szerkezete

A cefalosporin fermentációs gyártásával párhuzamosan felismerték, hogy a vegyület előállítható penicillin-V-ből kémiai úton is, sőt ez az eljárás ipari léptékben is rentábilis. A cefém váz a viszonylag olcsó V-penicillinből három lépésben kialakítható. A világszerte megtermelt penicillin-V túlnyomó részét erre a célra használják fel. Ha már megvan a hattagú gyűrűs váz, sor kerülhet a két szubsztituens rákapcsolására.

A biológiai úton keletkező cefalosporint Brotzu észlelte először 1945-ben egy korzikai szennyvíz csatornából izolált tenyészet szűrletében. A törzs különböző antibiotikumok keverékét állította elő, köztük a Cefalosporin C-t, penicillin N-t és Cefalosporin P<sub>1</sub>-P<sub>5</sub>-öt. Emiatt a Cef-C azonosítására csak 1953-ban került sor. A faj neve eredetileg *Cephalosporium acremonium* volt, később pontosították a rendszertani helyét és *Acremonium chrysogenum* néven sorolták be.

### Bioszintézis

A penicillin és cefalosporin bioszintézisének első lépései azonosak. A három aminosavból (L- $\alpha$ -amino-adipinsav, L-cisztein és L-valin) ugyanúgy képződik a tripeptid, és az első gyűrűzáródások is azonos módon mennek végbe. Az elágazás az izopenicillin-N után következik, a ring expandáz (REX) enzim hattagúvá alakítja a tiazolidin gyűrűt. A folyamat végén az  $\alpha$ -amino-adipinsav rajta marad a molekulán, nem cserélődik le, nem kerül vissza templátként a bioszintézis elejére.

### 1.2.2.1. Cefalosporin fermentáció

Az eredeti „Brotzu törzs” antibiotikum termelését a penicillinnel analóg módon mutációs törzsfelválogatással javították fel. A termelőképeség a bioszintézis út és a reguláció jobb megismerésével tovább növelhető.

A tápoldat összetételének kialakítása, illetve időbeli változtatása is hasonló elvek szerint történik, mint a penicillinnél, illetve a többi másodlagos anyagcsereterméknel.

A szénforrás kiválasztásánál is ugyanazok a szempontok. A C-limitáció elérésére vagy nehezen bontható vegyületeket (növényi olaj, keményítő) adnak, vagy könnyen asszimilálható cukrokat adagolnak olyan ütemben, hogy a koncentráció a limitáló tartományban maradjon.

A laktóz ebben az esetben jól hasznosuló cukornak minősül, mert a törzs indukálhatóan képes laktázt termelni.

A tápoldatban lévő foszfát és ammónia is elnyomhatja az antibiotikum termelést. Ezért a szaporodási szakaszban alkalmazott bőséges tápanyagellátás után a termelési fázisban a nitrogén- és foszforszintet alacsonyan kell tartani. Nitrogénforrásként a kukorica-lekvár mellett húslisztet, szójalisztet lehet adni.

A foszfát- és amino-nitrogén szintet célszerű sűrűn vagy on-line módon mérni, és ennek alapján adagolni. A főlegben lévő ionokat egy kémiai trükkkel is megköthetjük. MgO hozzáadásával rosszul oldódó (0,023 g/100 ml)  $Mg(NH_4)PO_4$  csapadék képződik, melyből a foszfát és ammónia csak a fogyasztás ütemében szabadul fel.

Feltűnően nagy az eljárás oxigén igénye, elsősorban az alternatív oxidáció működtetése miatt. Nem kielégítő oxigénellátottság esetén először a képződő termékek aránya eltolódik a dezacetil-cefalosporin C irányába. Tartós oxigénhiány esetén leáll az antibiotikum képződés. Az oxigén ellátás visszaállása után csak néhány órányi aktív növekedés szükséges az enzimszintézis kifejlődéséhez.

A cefalosporin fermentációs úton történő előállítását tekintve értelemszerűen eltér a benzil-penicillin gyártástól. A tripeptid kialakításához három prekursor molekula szükséges, az  $\alpha$ -amino-adipinsav a cisztein és a valin.

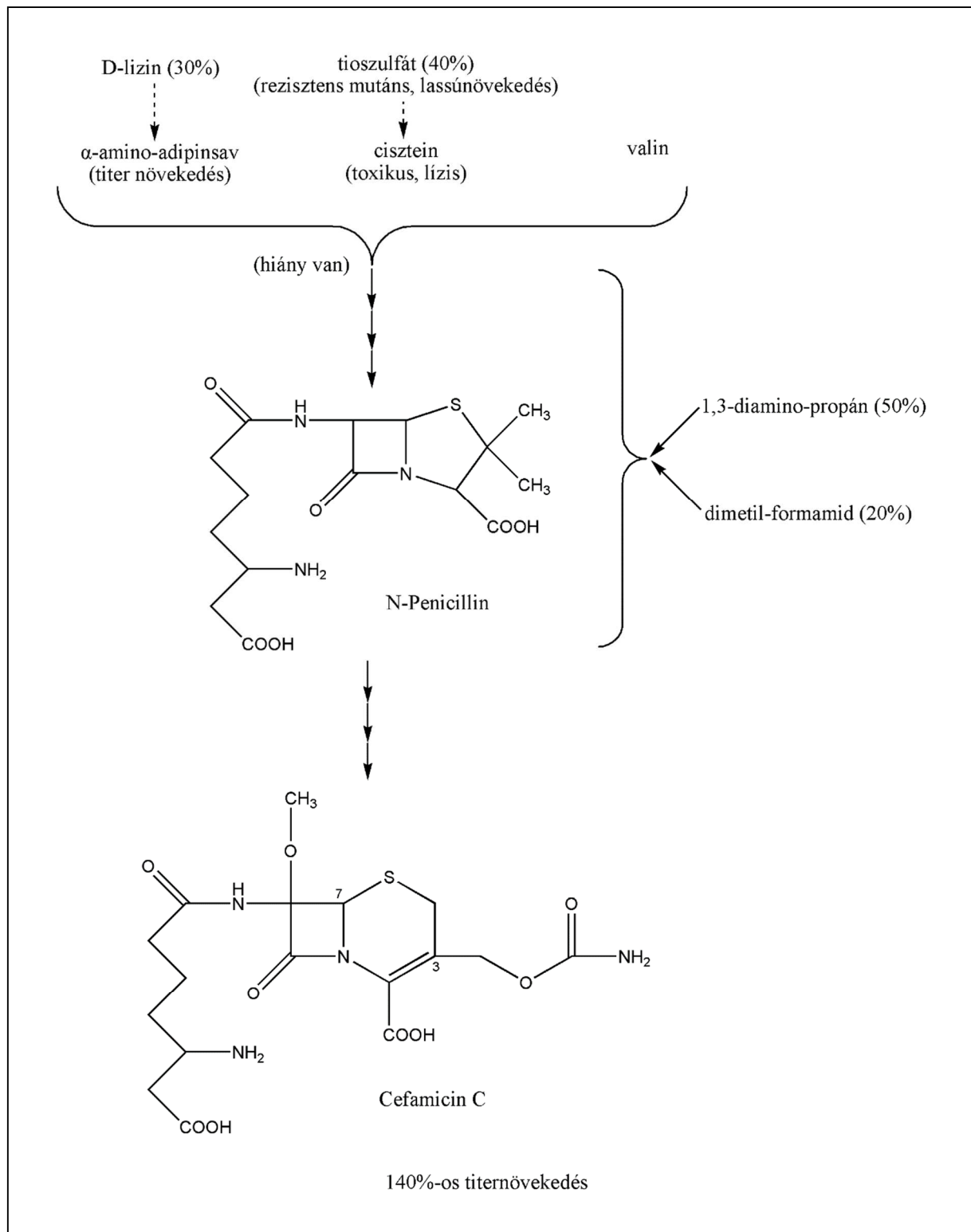
*Alfa-amino-adipátot* adva titernövekedés tapasztalható, tehát beépül a molekulába – ez azonban túl költséges, ezért inkább lizint adagolnak, melynek eredményeként 30%-os titernövekedés tapasztalható. Az  $\alpha$ -AAA helyett szerves aminokat is lehet adagolni, például kadáverint, 1,3-diamino-propánt, máshol dimetil-formamidot.

*Kénprekursorok:* úgy találták, hogy a cisztein gyorsan beépül, azonban a sejtek lízisét okozza, ezért kénforrásként inkább tioszulfátot adagoltak, amely 40%-os növekedést idézett elő. A sejtnövekedés így azonban lelassult, ezért tioszulfát rezisztens mutánsokat izoláltak. Előnyös hatású a táptalajhoz adott kis mennyiségű metionin is.

A tenyésztésben a főtermékként képződő Cef-C antibiotikumon kívül ennek dezacetil és dezacetoxi származéka is megjelenik, sőt kis mennyiségben a vegyület 7-metoxi származékának képződését is kimutatták.

*Downstream:* A cefalosporin-C kémiai szerkezetéből következően a fermentálékból való kinyerés módszere is eltér a penicillinnél megismert eljárástól. Szerves oldószeres extrakció helyett ioncserélő gyantán kötik meg. A szokásos ioncserélő gyanták helyett a környezetbarát, erre a célra kifejlesztett makropórusos adszorpciós gyanták használata terjed el.

*Félszintetikus cefalosporinok:* A cefalosporinok gyűjtőnéven összefoglalt antibiotikumok (természetes és félszintetikus származékok) mindegyike a Cefalosporin C-ből vezethető le. A *C. acremonium*-mal végzett fermentáció során Cefalosporin C-t állítanak elő, melyből oldallánc-cserével/szubsztitúcióval különböző származékokat képeznek. A cefalosporinok nagyobb stabilitása miatt az amidkötés hidrolízise és létrehozása kémiai úton is megvalósítható.



20. ábra Cefalosporin prekurzorok

A 7-amino-cefalosporánsavból a C-7-es és a C-3-as szénatomokon megvalósítható acilezések révén a félszintetikus cefalosporinok széles választéka állítható elő, melyek a gyógyászatban fontos szerepet töltenek be. Stabilitásuk jobb, mint a penicillineké, hatásspektrumuk szélesebb (az Ampicillinéhez hasonló). Számos  $\beta$ -laktamáz enzimmel szemben ellenállóak, így

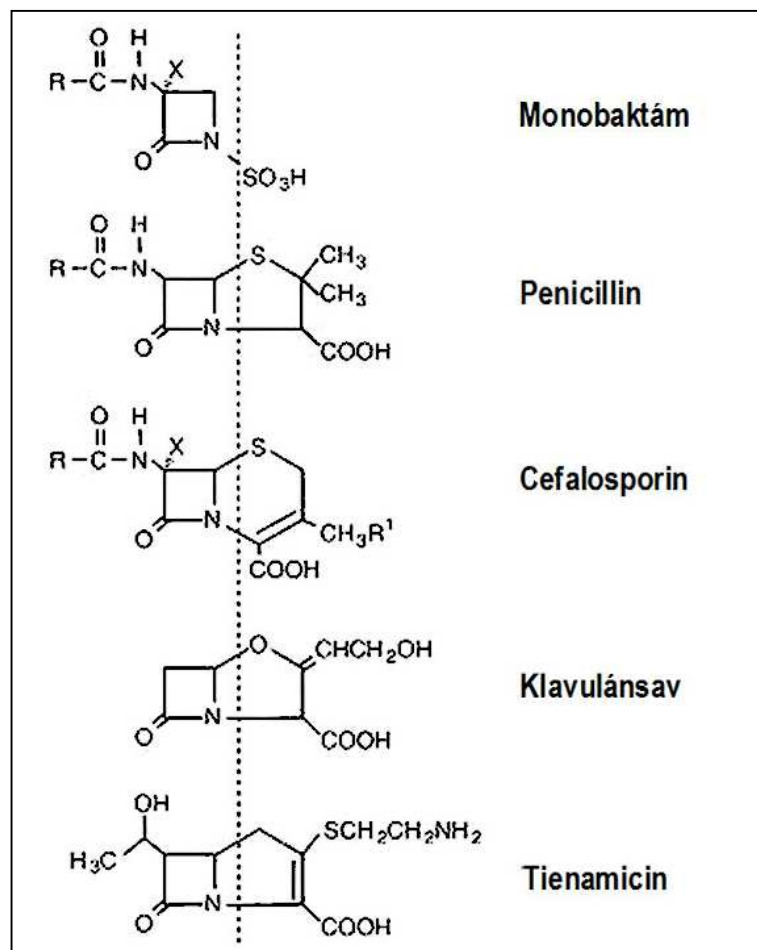


sok penicillin-rezisztens törzs ellen is hatékonyak. Előfordulnak ugyanakkor olyan cefalosporin-laktamázok, amelyek viszont a penicillineket nem tudják bontani. Penicillinre allergiás betegek esetében is alkalmazhatóak.

A különböző rezisztens kórokozók elleni hatékonyság szerint az eddig engedélyezett kb. 60 cefalosporin származékot generációkba sorolják. Jelenleg az ötödik generációnál tart a fejlesztés.

### 1.2.3. További $\beta$ -laktám vázas antibiotikumok

Az 1970-es évek óta új  $\beta$ -laktámgyűrűs antibiotikumokat fedeztek fel, elsősorban kétféle technikával: (1)  $\beta$ -laktám antibiotikumokra igen érzékenyen reagáló (hiperszenzitív) teszt mikroorganizmusokat alkalmaztak; (2)  $\beta$ -laktamáz inhibitor vegyületeket kerestek. A felfedezett  $\beta$ -laktámgyűrűs vegyületek felépítése a hatáshoz szükséges négytagú gyűrű mellett változatos heterociklikus szerkezeteket tartalmaz. A monobaktámok esetében pedig ez a szerkezeti rész teljesen hiányzik. Az új  $\beta$ -laktámok és származékaik széles spektrumú antibiotikumként és /vagy  $\beta$ -laktamáz enzim inhibitoroként használhatók fel.



21. ábra *Béta-laktám vázas metabolitok*

Különleges a klavulánsav felhasználása. Ennek a molekulának nincs antibiotikus aktivitása, viszont szubsztrátanalógnaként bekötődik a  $\beta$ -laktamázok kötőhelyére, és kompetitív inhibitoroként gátolja a penicillinbontó enzimeket. A terápiában penicillinekkel együtt adják, ezzel a rezisztens kórokozók védttségét csökkentik, amitől hatékonyabb lesz a kezelés (Augmentin = amoxicillin + klavulánsav).