

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 668**

51 Int. Cl.:

C12P 7/22 (2006.01)

C12N 1/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2009 E 09833605 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2377942**

54 Título: **Composición de tampón para catalizar la preparación de calcitriol o calcifediol y método para preparar calcitriol o calcifediol usando esta**

30 Prioridad:

19.12.2008 KR 20080130707

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.03.2014

73 Titular/es:

**ILDONG PHARMACEUTICAL CO., LTD. (100.0%)
60, Yangjae-dong, Seocho-gu
Seoul 137-733 , KR**

72 Inventor/es:

**KANG, DAE-JUNG;
IM, JONG-HYUK;
JUNG, HYUN-JUNG y
KANG, JAE-HOON**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 446 668 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de tampón para catalizar la preparación de calcitriol o calcifediol y método para preparar calcitriol o calcifediol usando esta

5

Campo técnico

[0001] Esta solicitud reivindica una prioridad para una solicitud presentada con la Korean Intellectual Property Office el 19 de diciembre de 2008 y n.º de serie asignado 10-2008-0130707, los contenidos de la cual se incorporan aquí por referencia.

10

[0002] La presente invención se refiere a una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol, y un método para producir calcitriol o calcifediol utilizando la misma. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol que incluye un compuesto metálico, un solvente orgánico, ciclodextrina, tris(hidroximetil)aminometano, succinato de sodio, cloruro sódico, cloruro de magnesio, y agua, y un método para producir calcitriol o calcifediol que utiliza la misma.

15

Estado de la técnica

[0003] El calcitriol es muy usado para tratar osteoporosis que es una enfermedad representativa que afecta a las personas mayores, y el calcifediol que es vitamina D3 activada, se usa para tratar la osteomalacia, etc. El calcitriol, que se genera por dos hidroxilaciones respectivas de la vitamina D3 en el hígado y riñón, es un material biogénico, y puede ser administrado simplemente por vía oral. También, es conocido que el calcitriol promueve fisiológicamente la absorción del calcio y fósforo en órganos gastrointestinales y el riñón, y así muestra un efecto terapéutico alto en la osteoporosis.

20

25

[0004] También, el calcitriol se usa para tratar raquitis, osteomalacia, hipoparatiroidismo, insuficiencia renal crónica, osteodistrofia renal del paciente de hemodiálisis y psoriasis, y su efecto terapéutico en el cáncer de próstata o leucemia mielógena ha sido recientemente bien reportado.

30

[0005] Como método para preparar calcitriol o calcifediol, un método de preparación por síntesis química orgánica y fermentación en microorganismo se ha conocido de forma convencional. La síntesis química orgánica tiene una desventaja en cuanto a que esta requiere una tecnología altamente complicada y un proceso de reacción costoso porque un grupo hidroxilo tiene que ser selectivamente introducido en una posición 1- o 25- de una cadena de carbono teniendo en cuenta la estereoespecificidad y regioespecificidad en una estructura química. Entonces, para resolver esta desventaja, un método de producción por bioconversión por fermentación en microorganismo fue desarrollado. Se ha comprobado ya que una reacción de bioconversión por un microorganismo es estereoespecífica y regioespecífica. Por consiguiente, para la producción de una vitamina activada D3, un método de síntesis orgánica convencional se puede sustituir por un método económico por bioconversión que utiliza una función de hidroxilación del microorganismo.

35

40

[0006] No obstante, en un método de bioconversión convencional por fermentación en microorganismo, se encontraron diferentes desventajas como se describe a continuación.

[0007] Primero, ya que el método de producción se realiza por cultivo de microorganismo, existe una posibilidad de contaminación. También, conforme aumenta una escala de producción, la posibilidad aumenta. Especialmente, ya que un periodo de cultivo es prolongado, una exposición a contaminación se vuelve seria. Dado que tal contaminación ocurre después de la administración de vitamina D3 en concurrencia con una propagación principal, un coste para un precursor se consume durante la contaminación. Segundo, una bioconversión por fermentación puede causar un rango grande de cambio en el rendimiento de producción. Esto está provocado por una sensibilidad de cultivo específico del microorganismo y así es inevitable. Por esta razón, se requiere mantener la constancia del interior de una cámara de cultivo hasta cierto punto bajo una condición predeterminada. Por consiguiente, tercero, el coste total para el mantenimiento de las instalaciones de producción es aumentado. Cuarto, la productividad del método ha alcanzado ya el valor máximo, y está en un estado estancado sin otra mejora. Así, no se puede determinar que el método tiene la máxima potencia competitiva. Quinto, debido a la dificultad en la separación y purificación de impurezas, un coste excesivo de separación puede ser calculado. Ya que sólo un material específico tiene que ser separado y purificado de toda la solución de cultivo, una separación/purificación a gran escala es requerida. Así, el coste puede aumentar proporcionalmente.

45

50

55

[0008] Por consiguiente, para resolver estas desventajas, se requiere urgentemente el desarrollo de un método nuevo para producir un calcitriol o calcifediol de alta pureza con un rendimiento elevado.

60

Divulgación

Problema técnico

5 [0009] Para resolver las desventajas del método de producción a través de fermentación, los inventores de la presente invención han investigado una reacción biocatalítica de célula entera, en vez de un método fermentativo, como método de bioconversión. Como resultado, se descubrió que Pseudonocardia autotrofica ID9302, es decir, un microorganismo según la presente invención, tiene una función biocatalítica para producir calcitriol y calcifediol. Luego, ellos han completado la presente invención desarrollando una composición de tampón para aumentar altamente la productividad de calcitriol y calcifediol.

10 [0010] Por consiguiente, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de tampón para promover la producción de calcitriol o calcifediol que consiste en 0,01 a 0,3 % (p/v) de al menos un compuesto metálico seleccionado del grupo que consiste en FeCl₂, FeCl₃, FeSO₄, MnCl₂, y ZnSO₄, 1 a 10 % (p/v) de al menos un solvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en etanol, metanol, acetona, y dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1 a 5 % (p/v) de ciclodextrina, 0,01 a 1 % (p/v) de tris(hidroximetil)aminometano, 0,01 a 1 % (p/v) de succinato de sodio, 0,01 a 1 % (p/v) de cloruro sódico, 0,001 a 0,5 % (p/v) de cloruro de magnesio, y una cantidad residual de agua.

15 [0011] Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir calcitriol o calcifediol, el método que incluye las etapas de: cultivo de Pseudonocardia autotrophica, recogida de las células microbianas de la solución de cultivo, mezcla de las células microbianas recogidas, vitamina D3, y la composición de tampón para promover la producción de calcitriol o calcifediol.

Solución técnica

20 [0012] Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol que consiste en 0,01 a 0,3 % (p/v) de al menos un compuesto metálico seleccionado del grupo que consiste en FeCl₂, FeCl₃, FeSO₄, MnCl₂, y ZnSO₄, 1 a 10 % (p/v) de al menos un solvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en etanol, metanol, acetona, y dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1 a 5 % (p/v) de ciclodextrina, 0,01 a 1 % (p/v) de tris(hidroximetil)aminometano, 0,01 a 1 % (p/v) de succinato de sodio, 0,01 a 1 % (p/v) de cloruro sódico, 0,001 a 0,5 % (p/v) de cloruro de magnesio, y una cantidad residual de agua.

25 [0013] Para conseguir el otro objetivo, la presente invención proporciona un método para producir calcitriol o calcifediol, el método que incluye las etapas de: cultivo Pseudonocardia autotrofica, recogida de células microbianas de la solución de cultivo, y mezcla de las células microbianas recogidas, vitamina D3, y la composición de tampón para promover la producción de calcitriol o calcifediol.

30 [0014] De ahora en adelante, la presente invención se describirá con más detalle.

35 [0015] Es característico que la composición según la presente invención incluya un compuesto metálico, un solvente orgánico, ciclodextrina, tris(hidroximetil)aminometano, succinato de sodio, cloruro sódico, cloruro de magnesio, y agua.

40 [0016] La composición de la presente invención incluye principalmente tris(hidroximetil)aminometano, succinato de sodio, cloruro sódico, y cloruro de magnesio, formando así un entorno que permite que las células microbianas sobrevivan de forma estable. No hay limitación específica en concentraciones de tris(hidroximetil)aminometano, succinato de sodio, cloruro sódico, y cloruro de magnesio de la composición inventiva mientras que el efecto de promoción de producción de calcitriol o calcifediol de la composición inventiva no se reduzca. Preferiblemente, tris(hidroximetil)aminometano se puede adicionar en una concentración de 0,01 a 1 % (p/v), succinato de sodio se puede adicionar en una concentración de 0,01 a 1 % (p/v), cloruro sódico se puede adicionar en una concentración de 0,01 a 1 % (p/v), y cloruro de magnesio se puede adicionar en una concentración de 0,001 a 0,5 % (p/v). De la forma más preferible, tris(hidroximetil)aminometano se puede adicionar en una concentración de 0,12 a 0,61 % (p/v), succinato de sodio se puede adicionar en una concentración de 0,16 a 0,8 % (p/v), cloruro sódico se puede adicionar en una concentración de 0,06 a 0,18 % (p/v), y cloruro de magnesio se puede adicionar en una concentración de 0,006 a 0,05 % (p/v).

45 [0017] Ciclodextrina de la presente invención es un azúcar no reductor en forma de anillo con diferentes moléculas de α -1,4 glucosa enlazadas. Forma un complejo de inclusión anfitrión-huésped debido a su interior hidrófobo y exterior hidrófilo, estabilizando así la vitamina D3 como un sustrato dentro de un tampón. La ciclodextrina de la presente invención puede ser α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, o metil- β -ciclodextrina, y de la forma más preferible puede ser una β -ciclodextrina. No hay limitación específica en una concentración de ciclodextrina de la presente invención mientras que el efecto de promoción de la producción de calcitriol o de calcifediol de la composición inventiva no se reduzca. Preferiblemente, la concentración de ciclodextrina puede variar de 0,1 a 5 % (p/v), y más preferiblemente de 0,25 a 1 % (p/v).

50 [0018] Un solvente orgánico de la presente invención aumenta la solubilidad de un sustrato (un material insoluble). El solvente orgánico de la presente invención puede ser etanol, metanol, acetona o dimetilsulfóxido (DMSO), y de la forma más preferible puede ser metanol. No hay limitación específica en una concentración del solvente orgánico de la

presente invención mientras el efecto de promoción de la producción de calcitriol o de calcifediol de la composición inventiva no se reduzca. Preferiblemente, la concentración puede variar de 1 a 10 % (p/v), y más preferiblemente de 2,5 a 10 % (p/v).

5 [0019] Un compuesto metálico de la presente invención activa la transferencia electrónica, aumentando así la eficiencia de conversión de un sustrato en calcitriol o calcifediol. No hay limitación en el compuesto metálico de la presente invención mientras que este no reduzca el efecto de promoción de producción de calcitriol o de calcifediol de la composición inventiva, y es un compuesto que genera iones metálicos. Preferiblemente, el compuesto metálico puede ser FeCl_2 , FeCl_3 , FeSO_4 , MnCl_2 , o ZnSO_4 , y de la forma más preferible puede ser MnCl_2 . No hay limitación específica en una concentración del compuesto metálico de la presente invención mientras que el efecto de promoción de la producción de calcitriol o de calcifediol de la composición inventiva no se reduzca. Preferiblemente, la concentración puede variar de 0,01 a 0,3 % (p/v), y más preferiblemente de 0,01 a 0,03 % (p/v).

15 [0020] La composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol de la presente invención tiene un alto efecto de promoción de producción de calcitriol o calcifediol.

[0021] Mientras tanto, un método para producir calcitriol o calcifediol, según la presente invención, comprende los pasos de: (a) cultivo Pseudonocardia autotrofica, (b) recolección de células microbianas de la solución de cultivo, y (c) mezcla de las células microbianas recogidas, vitamina D3, y la composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol.

20 [0022] En el paso (a), la Pseudonocardia autotrofica es cultivada. En la presente invención, el cultivo de Pseudonocardia autotrofica puede emplear un método de inoculación/cultivo de microorganismo usado de forma convencional. La inoculación se realiza añadiendo Pseudonocardia autotrofica pre-cultivada en una cantidad apropiada a un medio de cultivo, donde la Pseudonocardia autotrofica ha sido pre-cultivada de modo que la Pseudonocardia autotrofica puede ser suficientemente propagada bajo una condición de cultivo. En la inoculación de Pseudonocardia autotrofica, la solución de cultivo de Pseudonocardia autotrofica pre-cultivada se puede adicionar en una cantidad de 1 a 5 % (v/v) a un medio de cultivo. El cultivo de Pseudonocardia autotrofica se puede realizar a través de un medio y condiciones de cultivo, conocidos en la técnica. Tal proceso puede ser fácilmente ajustado por un experto en la técnica según una cepa seleccionada. Estos diferentes métodos son descritos en varias literaturas (p. ej., James et al., Biochemical Engineering, Prentice-Hall International Editions). Ellos se dividen en un método de cultivo en suspensión y un método de cultivo de fijación según un mecanismo de crecimiento celular, y también se dividen en un cultivo discontinuo, un lote alimentado, y un cultivo continuo según un método de cultivo.

35 [0023] Como un medio de cultivo, un medio que incluye una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, vitaminas, y minerales puede ser utilizado. En el medio para producir cultivos de la presente invención, la fuente de carbono puede ser al menos una seleccionada del grupo que incluye glucosa, sacarosa, maltosa, fructosa, lactosa, xilosa, galactosa, arabinosa, y una combinación de las mismas, y más preferiblemente puede ser glucosa. En el medio para producir cultivos de la presente invención, la fuente de nitrógeno puede ser al menos una seleccionada del grupo que incluye extracto de levadura, soítone, peptona, extracto de carne bovina, triptona, casítone, y una combinación de las mismas, y más preferiblemente puede ser extracto de levadura.

40 [0024] En el paso (a), Pseudonocardia autotrofica puede incluir cualquiera del mismo tipo de microorganismos, y puede incluir una de todas las subespecies y variedades de Pseudonocardia autotrofica. Preferiblemente, Pseudonocardia autotrofica ID9302 puede ser utilizada.

45 [0025] Pseudonocardia autotrofica ID9302, que es un biocatalizador según la presente invención, fue depositado en Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology Biological Resource Center (KCTC) el 7 de junio de 2001 (n.º de deposición: KCTC 1029BP).

50 [0026] En el paso (b), de la solución de cultivo, las células microbianas son recogidas. No hay limitación en el método de recogida de célula microbiana en la presente invención mientras sea un método usado de forma convencional para la recogida de células microbianas en estado vivo. Preferiblemente, un método de centrifugado puede ser utilizado. Preferiblemente, para eliminar componentes nutritivos en la solución de cultivo, las células microbianas recogidas se pueden lavar con un tampón. El tampón de lavado puede ser preferiblemente una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol según la presente invención.

55 [0027] En el paso (c), las células microbianas recogidas, vitamina D3, y la composición inventiva de tampón para la promoción de producción de calcitriol o calcifediol son mezclados. En el paso (c), las células microbianas recogidas son disueltas en la composición inventiva de tampón para la promoción de producción de calcitriol o calcifediol mientras se realiza una función de conversión de la vitamina D3 (como sustrato) en calcitriol o calcifediol.

60 [0028] En el paso (c), la mezcla se puede realizar en cualquier orden o por cualquier método siempre que el calcitriol o calcifediol sea producido por el método inventivo de producción. En un ejemplo, la vitamina D3 puede ser en primer lugar disuelta en un solvente conocido, y luego mezclado con el calcitriol inventivo o composición de tampón que promueve la producción de calcifediol que incluye las células microbianas recogidas disueltas en ella. En otro ejemplo,

- 5 el calcitriol inventivo o material de promoción de producción de calcifediol puede ser en primer lugar disuelto en la vitamina D3, y un solvente conocido, y luego mezclado con el calcitriol inventivo o composición de tampón que promueve la producción de calcifediol que incluye las células microbianas recogidas disueltas en ella. No hay limitación en el solvente mientras este pueda ayudar a la disolución de la vitamina conocida D3. Por ejemplo, el solvente puede ser metanol, etanol, acetona, DMSO, o una mezcla de los mismos. Mientras tanto, el calcitriol inventivo o material de promoción de producción de calcifediol puede ser, por ejemplo, ciclodextrina, cremofore, polietilenglicol, dipropilenglicol, tween 85, tween 80, o PEG 300.
- 10 [0029] También, vitamina D3 en una cantidad total requerida para la reacción se puede administrar en una vez, o diferentes veces divididas. De otra manera, la vitamina D3 puede ser administrada continuamente mientras la concentración predeterminada de vitamina D3 en la mezcla se mantenga. El estado de mezcla puede ser mantenido de diversas maneras teniendo en cuenta la eficiencia de la conversión de vitamina D3 en el calcitriol o calcifediol inventivo por las células microbianas recogidas, y el índice de supervivencia de las células microbianas. Preferiblemente, el estado de mezcla se puede mantener durante 4 a 10 días. Durante el periodo de estado de mezcla, un pH, un estado de agitación, y una cantidad de corriente de aire pueden ser apropiadamente mantenidos para producir eficazmente calcitriol o calcifediol, o para mantener la supervivencia de las células microbianas. Tal proceso puede ser fácilmente ajustado por un experto en la técnica.
- 15 [0030] En el ejemplo 1, GAC (células de crecimiento detenido) fueron preparadas por cultivo de Pseudonocardia autotrofica ID9302 y la recogida de células microbianas, a través de centrifugado. Ellas fueron usadas para medir productividades de calcitriol y calcifediol por vitamina D3 en varios tipos de composiciones de tampón.
- 20 [0031] Como resultado, se descubrió que las productividades de calcitriol y calcifediol eran máximas en un tampón TSSM que incluye tris(hidroximetil)aminometano 25mM, succinato de sodio 25mM, cloruro sódico 20mM, y cloruro de magnesio 4mM (véase ejemplo 1).
- 25 [0032] Luego, pruebas para añadir varios materiales para mejorar la productividad de calcitriol y calcifediol fueron efectuadas usando el tampón TSSM como un tampón básico.
- 30 [0033] En el ejemplo 2, un cambio en las productividades de calcitriol y calcifediol fue medido añadiendo ciclodextrina a concentraciones variables.
- [0034] Como resultado, se descubrió que la ciclodextrina aumentaba el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol, y especialmente, la adición de β -ciclodextrina aumenta el rendimiento de producción (véase ejemplo 2).
- 35 [0035] En el ejemplo 3, un cambio en las productividades de calcitriol y calcifediol fue medido añadiendo varios solventes orgánicos a concentraciones variables.
- [0036] Como resultado, se descubrió que la administración de un solvente orgánico aumentaba el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol, y especialmente, la adición de metanol aumentó el rendimiento de producción (véase ejemplo 3).
- 40 [0037] También, se descubrió que cuando se adicionó tanto ciclodextrina como un solvente orgánico, el rendimiento de producción fue notablemente superior a aquel de la administración de bien ciclodextrina o bien un solvente orgánico (véase ejemplo 4).
- 45 [0038] En el ejemplo 6, un cambio en las productividades de calcitriol y calcifediol fue medido añadiendo varios compuestos metálicos a concentraciones variables.
- 50 [0039] Como resultado, se descubrió que cuando CuCl_2 , CuSO_4 , COCl_2 , y CoSO_4 fueron usados, la reacción biocatalítica no era suficientemente realizada sin tener en cuenta concentraciones, o el rendimiento de producción de calcifediol y calcitriol fue reducido. Mientras tanto, se descubrió que la administración de FeCl_2 , FeCl_3 , FeSO_4 , ZnSO_4 o MnCl_2 aumentó el rendimiento de producción de calcifediol y calcitriol. Especialmente, la administración de ZnSO_4 o MnCl_2 aumentó altamente el rendimiento de producción (véase ejemplo 6).
- 55 [0040] En el ejemplo 7, un cambio en las productividades de calcitriol y calcifediol según un cambio en pH fue medido. [0041] Como resultado, se descubrió que el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol cambió según un pH, y el rendimiento de producción fue el máximo a un pH que varía de 7,0 a 7,4 (véase ejemplo 7).
- 60 [0042] En el ejemplo 8, calcitriol o calcifediol fue producido a gran escala en un tanque de fermentación 751 ajustando de diversas maneras un solvente orgánico y un compuesto metálico en la composición de tampón inventiva que promueve la producción calcitriol o calcifediol obtenida en los ejemplos descritos anteriormente.
- 65 [0043] Como resultado, en el calcitriol inventivo o composición de tampón que promueve la producción de calcifediol, en caso de FeCl_2 , FeCl_3 , y FeSO_4 a una concentración de 0,01 %, el rendimiento de producción de calcitriol fue 53,12mg/L, 60,8mg/L, y 62,42mg/L, y en caso de ZnSO_4 a una concentración de 0,01 %, el rendimiento de producción de calcitriol

fue 77,18mg/L. Especialmente, en caso de $MnCl_2$, a una concentración de 0,03 %, el rendimiento de producción de calcitriol fue 90,12mg/L, y el rendimiento de producción de calcifediol fue 166,87mg/L (véase ejemplo 8).

5 [0044] Por consiguiente, se descubrió que la composición inventiva que incluye $FeCl_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, $ZnSO_4$ y $MnCl_2$ muestra una productividad de calcitriol o de calcifediol alta.

10 [0045] También, cuando una producción en masa se llevó a cabo variando los tipos de solvente orgánico, el etanol mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 48,45mg/L, y la acetona y el DMSO mostraron un rendimiento de producción de calcitriol de 74,87mg/L y 70,85mg/L, respectivamente, y rendimiento de producción de calcifediol de 156,37mg/L y 141,81mg/L, respectivamente. Especialmente, el metanol mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 90,12mg/L, y un rendimiento de producción de calcifediol de 166,87mg/L (véase ejemplo 9). Por consiguiente, se puede observar que la composición inventiva que incluye metanol, etanol, acetona, y DMSO mostró una productividad de calcitriol o de calcifediol alta.

15 [0046] En el ejemplo 10, el calcitriol o calcifediol fue producido en un tanque de fermentación 751 según el método inventivo de producción de calcitriol o calcifediol usando la composición inventiva de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol obtenida en los ejemplos descritos anteriormente. Luego, el calcitriol o calcifediol producido fue separado y purificado.

20 [0047] Se descubrió que cuando el calcitriol o calcifediol fue producido por el método inventivo, en el 7º día, la productividad de calcitriol fue máxima (91,23mg/L), y la productividad de calcifediol fue 168,24mg/L

(Ejemplo 10).

25 [0048] El producto resultante fue recogido, y células microbianas fueron quitadas del producto. Luego, vitamina D3, calcifediol, y calcitriol fueron separados y purificados.

30 [0049] Como resultado, 7,6 g de calcifediol con una pureza de 90 % o más y 2,2 g de calcitriol con una pureza de 99 % fueron obtenidas (véase ejemplo 11).

35 [0050] Como se ha descrito anteriormente, en la composición inventiva de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol o el método de producción inventiva, después de la eliminación de una solución de cultivo, la reacción de la vitamina D3 con células microbianas se realiza en un estado de tampón. Así, es posible reducir la cantidad de otros metabolitos generada de un entorno de cultivo, aumentar el rendimiento de bioconversión en un material de objetivo requerido, y aumentan altamente la eficiencia de separación/purificación debido a una pequeña cantidad de impurezas generadas. Como resultado, es posible mejorar la calidad de una materia prima, y reducir el coste para la separación/purificación. Además, es ventajoso en la producción de calcitriol o calcifediol ya que una gruesa producción de calcitriol se puede aumentar a través de una alta reacción de concentración.

40 **Efectos ventajosos**

45 [0051] Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol, y un método para producir calcitriol o calcifediol que utiliza la misma. En el método de producción reacción catalítica en vez de en un sistema de cultivo de microorganismo. Así, no se requiere mantener un estado estéril. También, la separación/purificación después de la finalización de una reacción biocatalítica puede llevarse a cabo en un estado más limpio que en el método de cultivo de microorganismo. Por consiguiente, hay una ventaja en cuanto a que el coste requerido para la separación es bajo y la calidad es mejorada. Además, la composición de tampón inventiva que promueve la producción de calcitriol o calcifediol puede proporcionar una productividad alta de calcitriol o calcifediol.

50

Descripción de los Dibujos

[0052]

- 5 FIG. 1 es una vista que muestra una comparación de un proceso de producción de calcitriol a través de síntesis orgánica a partir de colesterol, con un proceso de producción de calcitriol por un biocatalizador de vitamina D3;
- FIG. 2 es un gráfico que muestra que calcifediol y calcitriol son producidos, en el que la ciclodextrina tiene un efecto en una reacción biocatalítica a la vez que bioconvierte la vitamina D3 (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción);
- 10 FIG. 3 es un gráfico que muestra que calcifediol y calcitriol son producidos, en el que un solvente orgánico específico tiene un efecto en reacción biocatalítica a la vez que bioconvierte la vitamina D3;
- FIG. 4 es un gráfico que muestra que una condición de mezcla de β - ciclodextrina con un solvente orgánico específico tiene un efecto en una reacción biocatalítica, para una productividad alta de calcifediol y calcitriol a través de la bioconversión de la vitamina D3 (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción);
- 15 FIG. 5 es un gráfico que muestra que un derivado activado de la vitamina D3 es producido a partir de la vitamina D3 a través de una reacción biocatalítica en un tanque de fermentación de 75 ℓ (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción);
- FIG. 6 es un gráfico que muestra que calcifediol y calcitriol son producidos, en el que un compuesto metálico tiene un efecto en una reacción biocatalítica a la vez que bioconvierte la vitamina D3 (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción);
- 20 FIG. 7 es un gráfico que muestra que calcifediol y calcitriol se producen cuando se mantiene un pH predeterminado durante una reacción biocatalítica (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción);
- FIG. 8 es un gráfico que muestra que calcifediol y calcitriol son producidos, en el que un compuesto metálico tiene un efecto en una reacción biocatalítica en un tanque de fermentación 751 a la vez que bioconvierte la vitamina D3 (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción); y
- 25 FIG. 9 es un gráfico que muestra que el calcifediol (vitamina D3 activada) y calcitriol son producidos a partir de la vitamina D3 a través de una reacción biocatalítica en un tanque de fermentación 751 (número d: un periodo (días) a partir del inicio de la reacción).

Modo para Invención

- 30 [0053] De ahora en adelante, la presente invención se describirá en detalle con referencia a Ejemplos. No obstante, los siguientes ejemplos son sólo para uso ilustrativo y no se destinan a limitar el ámbito de la invención.

<Ejemplo 1>**Determinación de un tampón de reacción biocatalítica para producir calcitriol**

- 40 [0054] La productividad de calcitriol fue evaluada en varios tipos de tampones de modo que GAC (células de crecimiento detenido) como biocatalizador pueden introducir un grupo hidroxílico a la vitamina D3 a través de una reacción biocatalítica.

<1-1> Preparación de Pseudonocardia autotrofica, ID9302 como GAC

- 45 [0055] Para uso como biocatalizador para producir calcifediol y calcitriol de la presente invención, una cepa de Pseudonocardia autotrofica ID9302 (de ahora en adelante, denominada ID9302) fue cultivada en un medio bajo condiciones apropiadas (levadura secada 0,4 %, glucosa 1 %, almidón 1 %, harina de pescado 1 %, cloruro sódico 0,2 %, dihidrógeno fosfato de potasio 0,01 %, extracto de carne bovina 0,1 %, fluoruro de sodio 0,01 %, y carbonato cálcico 0,2 %, un medio líquido esterilizado con pH 7,0), y luego células microbianas fueron recogidas a través de centrifugado. Las células microbianas recogidas fueron lavadas con un tampón de reacción biocatalítica (ver tabla 1) para ser usadas para el siguiente experimento, para eliminar completamente componentes nutritivos en la solución de cultivo. Luego, GAC (de ahora en adelante, denominada ID9302 GAC) para que la reacción biocatalítica sea llevada a cabo en el siguiente paso fueron preparadas.

<1-2> Medida de productividad de calcitriol y calcifediol por ID9302 GAC según una composición de tampón

- 55 [0056] GAC como biocatalizador, preparado por 50ml de cultivo principal fueron redisueltos en 50ml de varios tampones anotados en la tabla 1. La solución fue colocada en un matraz Erlenmeyer de 250M ℓ , y 300 $\mu\ell$ de una solución de vitamina D3 (en etanol) al 5 % fueron añadidos. Luego, la mezcla fue sometida a una reacción de agitación durante 9 días bajo la misma condición. En el día séptimo y el día noveno, 3M ℓ de la solución de cultivo fueron recogidos, y 6ml de un solvente de extracción (cloruro de metileno/metanol=1/1) fueron añadidos a estos, seguido de mezcla durante 30 min. Luego, una capa de solvente orgánico fue recogido, concentrado, y fue sometido a Análisis por HPLC para medir el rendimiento de la reacción biocatalítica, y la productividad de calcitriol y calcifediol.

- [0057] Perfiles de UV correspondientes a productos puros de calcitriol y calcifediol fueron comparados con picos que

muestran RT para determinar la productividad. En el Análisis por HPLC, una columna fue J'sfere ODS-H80 (150x4,6mm I.D.), una fase móvil fue un solvente mezclado de 450Mℓ de 0,1 % tris(hidroximetil) aminometano (THAM) y 550Mℓ de acetonitrilo, con un ácido fosfórico ajustado a pH de 7.2~7.3, un índice de movimiento fue 1Mℓ/min, y un detector de matriz de fotodiodos fue usado para la detección.

5

Tabla 1

Efecto en una reacción biocatalítica por varios tipos de tampones		
Especie de tampón	Cantidad de calcitriol producido (mg/L)	
	7º día de cultivo	9º día de cultivo
Solución salina	0,50	0,00
PBS tampón, pH 7,2	0,26	0,00
20mM Tampón de maleato, pH 6,5	0,67	0,76
15mM Tampón acetato, pH 5,0	0,05	0,09
TSSM tampón, pH 7,2	1,65	1,41
* TSSM tampón: 25mM Base de trizma, Tris(hidroximetil)aminometano, 25mM succinato de sodio, 20mM cloruro sódico, 4mM cloruro de magnesio		

10 [0058] Como resultado, como se nota en la tabla 1, se descubrió que cuando se usó tampón TSSM, la capacidad biocatalítica para la introducción de un grupo hidroxílico para la vitamina D3 por ID9302 fue máxima.

[0059] También, se descubrió que tampón de maleato fue un tampón relativamente superior para ID9302 como biocatalizador aunque su productividad de calcitriol fue inferior a la de tampón TSSM (1,65mg/L).

15 [0060] El tampón TSSM incluye Trizma base con un alto efecto de tampón de pH, NaCl con una fuerza iónica alta, metabolismo que aporta succinato de sodio, iones magnesio como cofactor de hidroxilasa p450, etc., y han mostrado una productividad especialmente superior con 10~50mM Trizma base, 10~50mM succinato de sodio, 10~30mM cloruro sódico, 1~8mM cloruro de magnesio, y pH de 7,0 a 7,4. Por consiguiente, tampón TSSM fue determinado como un
20 tampón para una reacción biocatalítica en el sistema de reacción de hidroxilasa p450.

<Ejemplo 2>

Efecto en una reacción biocatalítica por ciclodextrina

25 [0061] Bajo la misma condición de reacción biocatalítica como la determinada por el ejemplo 1, se efectuó una prueba de bioconversión. Para 50Mℓ de tampón TSSM, se añadió ID9302 GAC como biocatalizador, y varias ciclodextrinas fueron introducidas ahí con concentraciones de 0,25 %, 0,5 %, y 1 %. También, 300μℓ de solución de vitamina D3 al 5 % en etanol fueron colocados en un matraz Erlenmeyer. Luego, una prueba de bioconversión se efectuó de manera que la
30 mezcla fue sometida a una reacción de agitación durante 9 días. En el 5º día, el 7º día, y el 9º día, 3Mℓ de la muestra de prueba de reacción fueron recogidos, y fueron sometidos a extracción, concentración, y análisis por HPLC de la misma manera descrita en Ejemplo 1-2.

35 [0062] A través del Análisis por HPLC final, se descubrió que la ciclodextrina cambió las condiciones de tampón TSSM, y aumentado así el rendimiento de ID9302 GAC (como biocatalizador) para la introducción de un grupo hidroxílico en la vitamina D3 (véase FIG. 2). La productividad de calcitriol y calcifediol según la especie, concentración, y tiempo de cultivo de ciclodextrina fue resumido en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Efecto en la bioconversión de concentraciones adecuadas de varios tipos de cildodextrinas													
	concentraciønn	0 %			0.25 %			0.50 %			1 %		
		Tiempo de reacción	5d	7d	9d	5d	7d	9d	5d	7d	9d	5d	7d
calcitriol	α-CD	1.0	1.6	1.	1.86	3	2.05	1.44	2.3	1.47	1.69	1.99	1.36
		3	4	45									
	β-CD	1.0	1.6	1.	5.5	6.2	6	3.69	3.25	3.22	1.13	2.49	2.26
		3	4	45		2							

mg/L	γ -CD	1.0 3	1.6 4	1. 45	2.83	2.7 9	1.66	3.43	3.57	2.69	4.09	3.71	1.91
	M-CD	1.0 3	1.6 4	1. 45	3.46	4.7 1	5.16	1.89	2.59	2.86	0.74	1.42	1.09
calcifediol	α -CD	4.5 2	4.6 9	1. 94	4.6	5.5 3	1.77	7.62	5.69	2.09	9.36	8.55	2.11
mg/L	β -CD	4.5 2	4.6 9	1. 94	18.6 2	20. 5	21.6 3	12.8	16.2 4	6	8.96	14.6 8	4.89
	γ -CD	4.5 2	4.6 9	1. 94	11.9 1	8.7 9	2.19	15.8 3	12.1 3	4.62	14.7 2	11.9 7	4.73
	M-CD	4.5 2	4.6 9	1. 94	12.8 8	14. 28	12.2 9	13.3 9	15.3 6	15.1 3	8.9	12.2 3	12.2 3

[0063] Se descubrió que cuando α -ciclodextrin fue introducida a tampón TSSM, el rendimiento de producción de calcitriol a una concentración de 0,25 % fue aumentado 1,83 veces en comparación con el de un grupo de control (tampón TSSM sin adición de ciclodextrina, véase tabla 1). También, calcifediol como precursor de calcitriol aumentó según el aumento de concentración de α -ciclodextrin, y su productividad a una concentración de 1 % fue aumentada 1,82 veces.

[0064] Se descubrió que cuando β -ciclodextrin (β -CD) fue introducida en tampón TSSM, el mejor resultado de bioconversión fue mostrado a 0,25 %. Se puede encontrar que el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 3,79 veces en comparación con el de un grupo de control. También, se descubrió que la productividad de calcifediol aumentó 4,37 veces a una concentración de 0,25 % de β -ciclodextrin.

[0065] En un caso de γ -ciclodextrin (γ -CD), se descubrió que el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 1,7 veces, 2,18 veces, y 2,26 veces en proporción al aumento de la concentración de administración de 0,25 %, 0,5 %, y 1 %, y el rendimiento de producción de calcifediol fue altamente aumentado.

[0066] Metil- β -ciclodextrin (M-CD) (como precursor de β -ciclodextrin) mostró el máximo rendimiento de producción de calcitriol a 0,25 %, que es 2,87 veces más alto que el de un grupo de control. Luego, a las concentraciones siguientes, la productividad de calcitriol fue repentinamente disminuida mientras el rendimiento de producción de calcifediol fue mantenido alto.

[0067] De los resultados como se han descrito anteriormente, en la presente invención, se descubrió que tampón TSSM administrado con ciclodextrina a una concentración apropiada (de ahora en adelante, denominado 'tampón TSSMC') mostró un rendimiento de bioconversión de vitamina D3 alto, en comparación con un grupo de control (tampón TSSM) sin administración de ciclodextrina, y así el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol fueron aumentados.

<Ejemplo 3>

Efecto en una reacción biocatalítica por un solvente orgánico específico

[0068] Basado en las condiciones de reacción biocatalíticas determinadas del Ejemplo 1, un efecto en una reacción biocatalítica por un solvente orgánico, y efectos de producción de calcitriol y calcifediol fueron evaluados. Bajo las condiciones de reacción biocatalíticas del ejemplo 1, 4 tipos de solventes orgánicos anotados en la tabla 3 fueron administrados de manera que las concentraciones finales puedan alcanzar 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %, y 30 %, respectivamente. La prueba se efectuó bajo la misma condición que la de la reacción de agitación en el ejemplo 2. En el 8º día de la reacción biocatalítica, la reacción fue finalizada, y se efectuó un análisis cuantitativo por HPLC de la misma manera que en el ejemplo 1-2.

Tabla 3

Efecto en una reacción biocatalítica por un solvente orgánico específico								
Concentración de solvente orgánico (%)	Cantidad de calcitriol producido (mg/L)				Cantidad de calcifediol producido (mg/L)			
	etanol	metanol	acetona	DMSO	etanol	metanol	acetona	DMSO
0	1,66	1,66	1,66	1,66	5,53	5,53	5,53	5,53
2,5	0,74	4,45	3,54	3,39	36,34	25,91	30,24	28,32
5	0,30	4,77	3,91	3,87	30,66	28,48	31,05	25,83
10	0,02	5,84	4,14	4,03	1,97	33,90	36,44	25,36
20	0,00	0,00	0,66	1,66	1,03	1,36	4,05	0,90
30	0,00	0,00	0,04	0,08	0,49	0,00	2,04	0,23

5 [0069] Del resultado de análisis, se descubrió que el etanol no mostró en absoluto bioconversión de calcitriol (como material de objetivo) según el aumento de la concentración de etanol de administración, en comparación con un grupo de control sin etanol. Mientras tanto, a 2,5 %, y 5 % de etanol, el rendimiento de producción de calcifediol aumentó 6,57 veces y 5,54 veces, en comparación con el de un grupo de control.

10 [0070] Se descubrió que el metanol no muestra bioconversión en absoluto a una concentración de administración de 20 % o más, y luego a 2,5 % a 10 % de concentraciones de administración de metanol, el rendimiento de producción de calcitriol fue aumentado hasta 3,52 veces en comparación con la de un grupo de control. También, el rendimiento de producción de calcifediol fue aumentado 6 veces o más.

15 [0071] En un caso de acetona y dimetilsulfóxido (DMSO), el rendimiento de producción de calcitriol aumentó de 2 a 2,5 veces, y el rendimiento de producción de calcifediol aumentó de 5,5 a 6,5 veces, en comparación con el de un grupo de control.

20 [0072] De los resultados como se ha descrito anteriormente, se puede observar que la introducción de un solvente orgánico a una concentración predeterminada a una reacción biocatalítica aumenta la solubilidad de la vitamina D3 (material insoluble), aumentando así el rendimiento de producción de calcitriol (véase FIG. 3).

<Ejemplo 4>

Efecto en una reacción biocatalítica por una condición de mezcla de ciclodextrina y solvente orgánico

25 [0073] β -ciclodextrina al 0,25 %, que mostró el máximo efecto de bioconversión en el Ejemplo 2, fue introducida en un tampón TSSM, proporcionando así un tampón TSSMC. El tampón TSSMC fue usado como un tampón de reacción biocatalítica básica. Teniendo en cuenta un efecto válido en la bioconversión por un solvente orgánico, determinado en el ejemplo 3, un solvente orgánico fue introducido, a una concentración de 2,5 % a 10 %, al tampón de reacción biocatalítica. Luego, según la mezcla de ciclodextrina y solvente orgánico, el efecto en el rendimiento de bioconversión fue evaluado. La preparación GAC, condiciones de reacción de agitación, y análisis por HPLC fueron iguales que aquellas del ejemplo 1.

35 [0074] Como resultado, la mezcla de β -ciclodextrin y el solvente orgánico mostró una reacción positiva en la reacción biocatalítica. También, cuando se añadió metanol, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó, y la productividad de calcifediol (un precursor de biosíntesis de calcitriol) fue aproximadamente 4 veces más alta (89,14mg/L) que la de un grupo de control (ver FIG. 4).

Tabla 4

Resultados de bioconversión por la mezcla de β -ciclodextrin y varios tipos de solventes orgánicos, en el 8º día						
	Solvente orgánico (%)	0	2,5	5	7,5	10
Cantidad de calcitriol producido (mg/L)	etanol	6,37	6,78	8,67	3,53	1,39
	Metanol	6,37	10,91	11,77	30,32	14,32
	Acetona	6,37	10,03	11,01	11,74	13,08

	DMSO	6,37	11,42	18,32	10,65	9,32
Cantidad de calcifediol producido (mg/L)	Etanol	22,53	39,00	86,36	30,29	6,78
	Metanol	22,53	61,46	89,14	71,03	79,94
	Acetona	22,53	62,79	77,66	86,15	71,51
	DMSO	22,53	66,44	74,48	76,48	80,25

[0075] Como en el ejemplo 3, el metanol mostró el máximo rendimiento de producción de calcitriol a través de la mezcla con ciclodextrina. Metanol a una concentración de 2,5 % mostró aumentos de productividad de calcitriol y calcifediol, y luego a una concentración de metanol de 7,5 %, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 4,76 veces, en comparación con el de un grupo de control. En caso de acetona, a una concentración de 10 %, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó alrededor de dos veces en comparación con el de un grupo de control, y en caso de DMSO, a una concentración de 5 %, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 2.88 veces en comparación con el de un grupo de control. También, en caso de etanol, a una concentración de 5 %, la productividad de calcitriol aumentó 1.4 veces en comparación con la de un grupo de control, y la productividad de calcifediol aumentó 3.8 veces en comparación con la de un grupo de control mientras que en el ejemplo 3, no se produjo calcitriol.

[0076] Del resultado como se ha descrito anteriormente, puede encontrarse que la mezcla de ciclodextrina y un solvente orgánico mostró un efecto de sinergia en una reacción biocatalítica porque la ciclodextrina aumenta la solubilidad de vitamina insoluble D3, y el solvente orgánico aumenta la solubilidad de grasa en una condición de tampón. El efecto de sinergia mostró un aumento repentino en el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol. Especialmente, en un caso de metanol a 7.5 %, el rendimiento de producción de calcitriol fue el máximo (30,32mg/L), que aumentó aproximadamente 4,76 veces en comparación con el de un grupo de control. En caso de metanol a 5 %, el rendimiento de producción de calcifediol aumentó aproximadamente 4 veces (89,14mg/L) en comparación con el de un grupo de control.

<Ejemplo 5>

Producción de calcifediol (vitamina D3 activada) y calcitriol a través de una reacción biocatalítica en un tanque de fermentación de 75L

[0077] Basado en las condiciones de reacción determinadas de los Ejemplos 1 a 4, una prueba de producción de calcifediol/calcitriol se efectuó en la que un grupo hidroxílico fue introducido a la vitamina D3 usando un biocatalizador en un tanque de fermentación de 75L. La condición de cultivo fue la misma que en el Ejemplo 1 excepto que a través del escalado, 2L de solución de cultivo líquido (en un tanque de fermentación de 2,5L) fueron usados para un cultivo intermedio, y 50L de medio líquido (en un tanque de fermentación de 75L) fueron usados para un cultivo principal. El análisis por HPLC se efectuó de la misma manera que en el Ejemplo 1-2.

[0078] Después de la finalización del cultivo principal de ID9302 durante 5 días, se preparó ID9302 GAC como biocatalizador. En un tanque de fermentación de 75L como tanque de reacción, se colocaron 50L de un tampón de TSSMC que incluyen 7,5 % metanol a una concentración final, e ID9302 GAC fue redisuelto en el tampón de reacción. 300ml de una solución de vitamina al 5 % fueron preparados e introducidos en un sistema de reacción biocatalítica en el equilibrio. Luego, la bioconversión de vitamina D3 se efectuó bajo las condiciones de 28°C, 500rpm, y 1vvm durante 10 días. Durante 10 días a partir del 3.^{er} día, la solución de reacción fue sometida a análisis por HPLC, y luego la productividad de calcitriol y calcifediol fue evaluada.

[0079] Como resultado, en el 3.^{er} día de una reacción biocatalítica, la producción de calcifediol como precursor de calcitriol comenzó. Luego, en el 4^o a 5^o día de la reacción, la producción de calcifediol aumentó repentinamente, y al mismo tiempo, la producción de calcitriol fue en realidad comenzada. En el 7^o día de la reacción biocatalítica, la producción de calcitriol y calcifediol aumentó repentinamente, en el 8^o día de la reacción biocatalítica, la productividad de calcitriol fue máxima (38,1 mg/L), y en el 9^o día de la reacción, la productividad de calcifediol fue 109 mg/L. En comparación con el 3.^{er} día de reacción, la productividad de calcitriol aumentó 38 veces, y la productividad de calcifediol aumentó 15 veces. En el 12^o día de reacción biocatalítica a partir de la producción máxima, las productividades de los dos materiales disminuyeron lentamente (véase FIG. 5).

[0080] Por consiguiente, puede encontrarse que cuando un biocatalizador fue preparado por ID9302 y la reacción se efectuó en un tanque de fermentación de 75L, es posible introducir un grupo hidroxílico a la vitamina D3 y al mismo tiempo conseguir una productividad alta de calcitriol y calcifediol.

<Ejemplo 6>

Efecto en una reacción biocatalítica de un material metálico

- 5 [0081] En la bioconversión de vitamina D3 en calcifediol y calcitriol, la transferencia electrónica es importante. Cuando un tampón TSSMC se añade con un material metálico, los electrones que provienen del material metálico pueden facilitar la transferencia electrónica. Esto puede aumentar la actividad enzimática, aumentando así una proporción de bioconversión.
- 10 [0082] Basado en la condición de reacción biocatalítica determinada en el Ejemplo 4, un efecto del material metálico en una reacción biocatalítica, y un efecto de producción de calcifediol y calcitriol fueron evaluados.
- 15 [0083] Bajo una condición de reacción biocatalítica de un tampón TSSMC que incluye además un 7,5 % de metanol, 9 tipos de materiales metálicos anotados en la tabla 5 fueron administrados de manera que sus concentraciones pueden ser 0,01 %, 0,03 %, y 0,06 %. La prueba se efectuó bajo la misma condición que en la reacción de agitación del ejemplo 2, y luego en el 7º día y el 9º día de la reacción biocatalítica, el análisis cuantitativo de HPLC se efectuó de la misma manera que en el ejemplo 1-2.
- 20 [0084] Según el resultado del análisis, cuando CuCl₂, CuSO₄, CoCl₂, y CoSO₄ fueron usados, la reacción biocatalítica no fue suficientemente realizada independientemente de concentraciones. Como resultado, el rendimiento de producción de calcifediol y calcitriol se redujo. También, FeCl₂ y FeCl₃ no mostraron un aumento en los rendimientos de producción de calcifediol y calcitriol. Mientras tanto, en caso de FeSO₄ a 0,06 %, el calcitriol fue aumentado 1,14 veces en comparación con el de un grupo de control.
- 25 [0085] En caso de MnCl₂, a 0,06 %, los rendimientos de producción de calcifediol y calcitriol disminuyeron, y a 0,01 %, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 1,15 veces en comparación con el de un grupo de control. También, a una concentración de 0,03 %, el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol aumentó 1,83 veces, y 1,52 veces, respectivamente. MnCl₂ mostró el máximo aumento en el rendimiento de producción, en comparación con otros materiales metálicos.
- 30 [0086] En caso de ZnSO₄ a 0,01 %, un rendimiento de producción de calcitriol fue similar al de un grupo de control, mientras un rendimiento de producción de calcifediol aumentó 1,34 veces. A 0,06 %, en comparación con el de un grupo de control, el rendimiento de producción de calcitriol aumentó 1,3 veces (véase FIG. 6).
- 35 [0087] De los resultados como descritos anteriormente, puede encontrarse que la introducción de algún material metálico a una reacción biocatalítica aumentó un efecto de bioconversión, aumentando así el rendimiento de producción de calcifediol y calcitriol.

Tabla 5

Efecto en una reacción biocatalítica por un material metálico									
		Cantidad de calcitriol producido (mg/L)				Cantidad de calcifediol producido (mg/L)			
Compuesto metálico	Concentración (%)	0	0,01	0,03	0,06	0	0,01	0,03	0,06
	Tiempo de reacción								
FeCl ₂	D7	21,6 4	25,14	14,61	0	57,8 9	32,14	11,1	30,81
	D9	28,1 2	16,56	6,48	12,3 6	86,2 3	33,63	10,98	6,38
FeCl ₃	D7	22,6 4	30,9	24,32	0	57,8 9	82,84	54,5	15,01
	D9	28,1 2	29,31	11,02	15,9 8	86,2 3	75,41	40,89	15,66
FeSO ₄	D7	21,6 4	31,21	3,45	32,1 2	57,8 9	47,03	7,62	23,01
	D9	28,1	20,63	0	18,2	86,2	38,07	6,77	10,83
		2			3	3			
CuCl ₂	D7	21,6 4	3,24	0	0	57,8 9	11,69	17,88	0
	D9	28,1 2	3,23	0	0	86,2 3	10,93	18,58	9,45
CuSO ₄	D7	21,6 4	7,28	0	0	57,8 9	42,34	10,23	0
	D9	28,1 2	7,81	0	0	86,2 3	30,57	8,09	8,06

CoCl ₂	D7	21,6 4	0	0	0	57,8 9	33,69	27,41	30,63
	D9	28,1 2	0	0	2,68	86,2 3	40,12	33,18	29,56
CoSO ₄	D7	21,6 4	0	0	0	57,8 9	55,75	71,22	16,72
	D9	28,1 2	0	0	6,66	86,2 3	39,73	40,23	29,07
MnCl ₂	D7	21,6 4	28,12	51,55	19,7 6	57,8 9	60,37	101,2 6	21,41
	D9	28,1 2	32,23	50,57	7,51	86,2 3	88,01	131,2	9,25
ZnSO ₄	D7	21,6 4	28,6	28,01	36,6 6	57,8 9	115,5 4	104,9 7	54,48
	D9	28,1	28,59	20,14	23,5	86,2	113,5	106,2	39,42
		2			7	3	3	9	

<Ejemplo 7>

Efecto en una reacción biocatalítica del ajuste de pH

5

[0088] Conforme la reacción biocatalítica avanza, el pH de una solución de reacción aumenta continuamente. En un caso donde se mantuvo un pH fijo de una solución de reacción, para probar un efecto en la reacción biocatalítica, la reacción biocatalítica se efectuó usando un tanque de fermentación de 5L. La condición de cultivo fue la misma que en el Ejemplo 1 excepto que 140ml solución de cultivo líquido fueron usados para un cultivo intermedio, y 3,5L de medio líquido fueron usados para un cultivo principal. La condición de reacción fue basada en la de los ejemplos 1 a 6.

10

[0089] Después de la finalización del cultivo principal de ID9302 durante 5 días, se preparó ID9302 GAC como biocatalizador. En un tanque de fermentación de 5L como tanque de reacción, se colocaron 3,5L de un tampón de TSSMC (pH 7,2) que incluye un 0,03 % de MnCl₂, e ID9302 GAC fue redisolto en el tampón de reacción. Luego, el sistema de reacción fue mantenido en equilibrio con 28°C, 500rpm, y 0,5vvm. Vitamina D3 y β-ciclodextrin, correspondientes a 0,02 % y 0,05 % respecto a los 3,5L de solución de reacción, fueron disueltos en 52,5ml de metanol, y luego continuamente administrados durante 5 días desde el inicio de la reacción. Aquí, un pH fue mantenido a 6,2; 6,6; 7,0; 7,4; 7,8; y 8,0 usando 1N NaOH y 0,5N HCl. El 6º, 8º, y 10º día, soluciones de reacción del biocatalizador fueron sometidas a análisis por HPLC de la misma manera que las del Ejemplo 1-2, y luego la productividad de calcifediol y calcitriol fue evaluada.

15

20

[0090] Como resultado, a pH 6,2, la bioconversión no tuvo lugar en absoluto y así calcitriol y calcifediol no fueron apenas producidos. También, a pH 6,6, el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol fue muy bajo. Mientras tanto, a pH 7, y 7,4, el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol fue alto. A pH 7,0, las productividades de calcitriol y calcifediol aumentaron 1,15 veces y 1,16 veces, en comparación con las de un grupo de control. A pH 7,4, las productividades aumentaron 1,12 veces y 1,03 veces. A pH 7,8 y 8,2, el rendimiento de producción de calcitriol y calcifediol disminuyó repentinamente (véase FIG. 7 y tabla 6).

25

[0091] Como se puede observar del resultado, el mantenimiento de un predeterminado pH durante una reacción biocatalítica puede aumentar el rendimiento de producción de calcifediol y calcitriol. Aquí, es preferible mantener un pH dentro de un rango de 7,0 a 7,4.

30

Tabla 6

Efecto en una reacción biocatalítica del ajuste de pH			
pH	Tiempo de reacción	Cantidad de calcitriol producido	Cantidad de calcifediol producido
		(mg/L)	(mg/L)
Grupo de control	D6	75,32	140,23
	D8	80,23	142,54
	D10	78,34	141,33
6,2	D6	0	12,53
	D8	0	14,65

	D10	0	12,32
6,6	D6	20,51	33,57
	D8	19,71	32,75
	D10	18,36	53,43
7,0	D6	88,4	165,87
	D8	91,96	166,05
	D10	85,14	163,84
7,4	D6	87,88	150,61
	D8	89,98	147,23
	D10	83,97	148,08
7,8	D6	64,75	84,04
	D8	61,32	67,245
	D10	57,11	71,791
8,2	D6	28,63	64,74
	D8	25,06	62,13
	D10	18,99	41,4

<Ejemplo 8>

Comparación de productividad entre calcifediol y calcitriol según tipos de compuestos metálicos en un tanque de fermentación de 75L

5

[0092] Basado en las condiciones de reacción obtenidas de ejemplos 1 a 7, se efectuó una prueba de producción de calcifediol y calcitriol en la que un grupo hidroxílico fue introducido a la vitamina D3 usando un biocatalizador en un tanque de fermentación de 75L. La condición de cultivo fue la misma que en el Ejemplo 1 excepto que a través del escalado, 2L solución de cultivo líquido fueron usados para un cultivo intermedio, y 50L de medio líquido (en un tanque de fermentación de 75L) fueron usados para un cultivo principal.

10

[0093] Después de la finalización del cultivo principal de ID9302 durante 5 días, se preparó ID9302 GAC como biocatalizador. En un tanque de fermentación de 75L como tanque de reacción, se colocaron 50L de un tampón de TSSM, y 9 tipos de compuestos metálicos anotados en la tabla 5 fueron administrados de manera que las concentraciones pueden ser 0,01 %, 0,03 %, y 0,06 %.

15

[0094] GAC fue redissuelto en el tampón de reacción. Luego, el sistema de reacción fue mantenido en el equilibrio con 28°C, 500rpm, y 0,5vvm. Vitamina D3 y β -ciclodextrina, correspondiente a 0,02 % y 0,05 % respecto a los 50L de solución de reacción, fueron disueltos en 750ml de metanol, y luego administrados continuamente durante 5 días a partir del inicio de la reacción.

20

[0095] Aquí, un pH fue mantenido a 7,0 usando 1N NaOH y 0,5N HCl. Durante 10 días, soluciones de reacción del biocatalizador fueron sometidas a análisis por HPLC de la misma manera que aquellas del ejemplo 1-2, y luego la productividad de calcifediol y calcitriol fue evaluada.

25

[0096] Como resultado, como se anota en la tabla 7, cuando CuCl_2 , CuSO_4 , CoCl_2 , y CoSO_4 fueron usados, la reacción biocatalítica no se realizó suficientemente independientemente de las concentraciones. Mientras tanto, FeCl_2 , FeCl_3 , y FeSO_4 , a una concentración de 0,01 %, mostraron rendimientos de producción de calcitriol de 53,12mg/L, 60,8mg/L, y 62,42mg/L, respectivamente. También, ZnSO_4 , a una concentración de 0,01 %, mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 77,18mg/L. especialmente, MnCl_2 , a una concentración de 0,03 %, mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 90,12mg/L y un rendimiento de producción de calcifediol de 166,87mg/L (véase FIG. 8).

30

[0097] Por consiguiente, se puede observar que la composición inventiva que incluye FeCl_2 , FeCl_3 , FeSO_4 , ZnSO_4 y MnCl_2 mostró una alta productividad de calcitriol o calcifediol.

Tabla 7

5

Cambio en cantidades de calcitriol y calcifediol producido según los tipos de compuestos metálicos									
Compuesto metálico	concentración (%)	Cantidad de calcitriol producido (mg/l)				Cantidad de calcifediol producido (mg/l)			
		0	0,01	0,03	0,06	0	0,01	0,03	0,06
	Tiempo de reacción								
FeCl_2	D7	43,27	50,28	50,22	32,17	128,18	64,28	122,21	77,02
	D9	48,39	53,12	52,96	30,94	134,76	67,26	121,96	89,13
FeCl_3	D7	43,27	60,8	48,64	35,18	128,18	265,68	109,03	37,52
	D9	48,39	58,62	42,04	39,95	134,76	150,82	111,78	39,15
FeSO_4	D7	43,27	62,42	46,9	40,35	128,18	130,15	120,24	57,52
	D9	48,39	61,26	50,84	45,57	134,76	146,14	130,54	57,07
CuCl_2	D7	43,27	6,48	0	0	128,18	83,38	35,76	0
	D9	48,39	6,46	0	0	134,76	81,86	37,16	23,62
CuSO_4	D7	43,27	14,56	0	0	128,18	84,68	20,46	0
	D9	48,39	15,62	0	0	134,76	61,14	16,18	20,15
CoCl_2	D7	43,27	11,23	0	0	128,18	67,38	54,82	76,57
	D9	48,39	13,84	0	6,7	134,76	80,24	66,36	73,9
CoSO_4	D7	43,27	8,37	0	0	128,18	111,5	50,44	41,8
	D9	48,39	9,79	0	16,65	134,76	79,46	60,46	72,67
MnCl_2	D7	43,27	56,24	83,1	49,4	128,18	120,74	150,12	153,52
	D9	48,39	64,46	90,12	48,77	134,76	136,02	166,87	153,21
ZnSO_4	D7	43,27	57,2	56,02	61,65	128,18	151,08	140,25	136,2
	D9	48,39	77,18	50,28	58,92	134,76	167,06	138,67	138,55

<Ejemplo 9>

10

Comparación de productividad entre calcifediol y calcitriol según tipos de solventes orgánicos en un tanque de fermentación de 75L

[0098] Basado en las condiciones de reacción obtenidas de Ejemplos 1 a 7, se efectuó una prueba de producción de calcifediol y calcitriol en la que un grupo hidroxílico fue introducido en una vitamina D3 utilizando un biocatalizador en un tanque de fermentación de 75L.

15

[0099] La condición de cultivo fue la misma que en el Ejemplo 8. Después de la finalización del cultivo principal de ID9302 durante 5 días, se preparó ID9302 GAC como biocatalizador. En un tanque de fermentación de 75L como tanque de reacción, se colocaron 50L de un tampón TSSMC que incluye 0,03 % de MnCl_2 a una concentración final, y luego etanol, metanol, acetona, y DMSO fueron administrados a concentraciones respectivas que muestran la máxima productividad en el Ejemplo 4.

20

[0100] GAC fue redissuelto en el tampón de reacción. 300Mℓ de 10 % vitamina D3 solución fue preparada e introducida en un sistema de reacción biocatalítica en el equilibrio. Luego, la bioconversión de vitamina D3 se efectuó bajo condiciones de 28°C, 500rpm, y 0.5vvm durante 10 días.

25

[0101] Aquí, un pH fue mantenido a 7,0 usando 1N NaOH y 0,5N HCl. Durante 10 días, soluciones de reacción del biocatalizador fueron sometidas a análisis por HPLC de la misma manera que aquella del Ejemplo 1-2, y luego la productividad de calcifediol y calcitriol fue evaluada.

5 [0102] Como resultado, como anotado en la Tabla 8, etanol mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 48,45 mg/L, y acetona y DMSO mostraron una producción de calcitriol de 74,87 mg/L y 70,85 mg/L, respectivamente, y rendimiento de producción de calcifediol de 156,37 mg/L y 141,81 mg/L, respectivamente. Especialmente, el metanol mostró un rendimiento de producción de calcitriol de 90,12mg/L, y un rendimiento de producción de calcifediol de 166,87mg/L.

10 [0103] Por consiguiente, se puede observar que la composición inventiva que incluye metanol, etanol, acetona, y DMSO mostró una productividad de calcitriol o calcifediol alta.

Tabla B

Cambio en cantidades de calcitriol y calcifediol producido según los tipos de solventes orgánicos			
Solvente orgánico	Tiempo de reacción	Cantidad de calcitriol producido (mg/l)	Cantidad de calcifediol producido (mg/l)
ethanol (5 %)	D7	33,24	113,01
	D9	48,45	128,96
methanol (7,5 %)	D7	83,10	150,12
	D9	90,12	166,87
Acetone (10 %)	D7	63,12	148,28
	D9	74,87	156,37
DMSO(5 %)	D7	62,32	131,87
	D9	70,85	141,81

<Ejemplo 10>

15 **Producción de calcifediol (vitamina activada D3) y calcitriol a través de una reacción biocatalítica en un tanque de fermentación de 75L**

20 [0104] Basado en las condiciones de reacción determinadas en los Ejemplos 1 a 9, se efectuó una prueba de producción de calcifediol/calcitriol en la que un grupo hidroxílico fue introducido a la vitamina D3 usando un biocatalizador en un tanque de fermentación de 75L. La condición de cultivo fue la misma que en el Ejemplo 9.

25 [0105] Después de la finalización del cultivo principal de ID9302 durante 5 días, se preparó ID9302 GAC como biocatalizador. En un tanque de fermentación de 75L como tanque de reacción, se colocaron 50L de un tampón TSSMM, y GAC fue redissuelto en el tampón de reacción. Luego, el sistema de reacción fue mantenido en el equilibrio con 28°C, 500rpm, y 0,5vvm. Vitamina D3 y β -ciclodextrin, correspondiente a 0,02 % y 0,05 % respecto a los 50L de solución de reacción, fueron disueltos en 750ml de metanol, y luego continuamente administrados durante 5 días a partir del inicio de la reacción. Aquí, un pH fue mantenido a 7,0 usando 1N NaOH y 0,5N HCl. Durante 10 días, soluciones de reacción del biocatalizador fueron sometidas a análisis por HPLC de la misma manera que aquella del Ejemplo 1-2, y luego la productividad de calcifediol y calcitriol fue evaluada.

30 [0106] Como resultado, en el 1.^{er} día de una reacción biocatalítica, la producción de calcifediol como precursor de calcitriol fue comenzada. Luego, en el 2^o a 3.^{er} día de la reacción, la producción de calcifediol aumentó repentinamente, y al mismo tiempo, la producción de calcitriol fue en realidad comenzada. En el 4^o día de la reacción biocatalítica, la producción de calcitriol y calcifediol aumentó repentinamente, y en el 7^o día de la reacción biocatalítica, la productividad de calcitriol fue máxima (91,23 mg/L), y la productividad de calcifediol fue 168,24 mg/L. En comparación con la del 1.^{er} día de reacción, la productividad de calcitriol aumentó 90 veces, y la productividad de calcifediol aumentó 3 veces. En el 10^o día de la reacción biocatalítica a partir de la producción máxima, las productividades de los dos materiales fueron lentamente disminuidas (véase FIG. 9).

40 [0107] Por consiguiente, puede encontrarse que cuando un biocatalizador fue preparado por ID9302 y la reacción se efectuó en un tanque de fermentación de 75L, es posible introducir un grupo hidroxílico a la vitamina D3 y al mismo tiempo para conseguir una productividad alta de calcitriol y calcifediol.

45 [0108] Es más, además del método según la presente invención, puede encontrarse que un aumento en la cantidad de un sustrato dentro de un rango de concentración que no causa ninguna reducción en la actividad enzimática de

biocatalizador puede aumentar la productividad de calcitriol o calcifediol como producto final.

<Ejemplo 11>

5 **Separación de la vitamina activada D3 de una solución de reacción**

10 [0109] Después de la reacción biocatalítica, 50L de una solución de reacción fueron añadidos con un 1 % de absorbente sintético, Sepabeads SP850 (Mitsubishi chemical, Japón). Luego, a través de un proceso de agitación a 400 rpm durante 1 hora, la vitamina D3 y vitamina D3 activada en la solución de reacción fueron absorbidas. Células y SP850, filtradas por un equipo de filtración multicapa, fueron extraídas con 25L de acetona, y concentradas a vacío a 40°C o menos.

15 [0110] El concentrado fue redisoluto en 2L de 50 % metanol, y adicionado con 2L hexano a través de un embudo separatorio, seguido de primera reextracción. El extracto (fase superior, calcifediol en hexano, vitamina D3, impurezas liposolubles) fueron recogidas. El extracto fue concentrado al vacío a 40°C o menos, y recogido por columna de gel de sílice (fase móvil: una mezcla 7:3 de hexano/acetato de etilo, y velocidad de flujo: 10ml/min). La vitamina D3 y el calcifediol fueron consecutivamente recogidos. La vitamina D3 y el calcifediol tuvieron una pureza de 90 % o más, y fueron recogidos en cantidades de 18g y 7,6g, respectivamente. Ellos fueron capaces de ser reutilizados como un precursores para producir calcitriol.

20 [0111] El residuo desde la primera reextracción (fase inferior, calcitriol en 50 % metanol, impurezas solubles) fue en segundo lugar reextraído con 2L diclorometano, para recopilar un extracto de calcitriol sin impurezas solubles (fase inferior, calcitriol en el diclorometano). El extracto fue concentrado a vacío a 40°C o menos, y el calcitriol fue recogido separadamente por columna C-18 ODS (fase móvil: 75 % metanol, y velocidad de flujo: 10ml/min). El calcitriol recogido fue concentrado a vacío a 40°C o menos, y luego disuelto en metanol para separar calcitriol tipo α de calcitriol tipo β a través de columna YMC J'sfere ODS. A través de la separación se efectuó bajo una condición de fase de movimiento de 45 % acetonitrilo, 230nm, 15ml/min para proporcionar 2,2g de calcitriol de cristalino blanco con una pureza de 99 %.

30 **Aplicabilidad Industrial**

35 [0112] Como se puede observar de lo anteriormente mencionado, la presente invención proporciona una composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol, y un método para producir calcitriol o calcifediol que utiliza la misma. En el método de producción inventiva, el rendimiento de producción de calcitriol o calcifediol es alto, y la bioconversión se realiza en un sistema de reacción catalítica en vez de en un sistema de cultivo de microorganismo. Así, no se requiere mantener un estado estéril. También, la separación/purificación después de la finalización de una reacción biocatalítica puede llevarse a cabo en un estado de limpiador que el método de cultivo de microorganismo. Por consiguiente, hay una ventaja en cuanto a que un coste requerido para separación es bajo y la calidad es mejorada. Además, la composición inventiva de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol puede proporcionar una productividad alta de calcitriol o calcifediol.

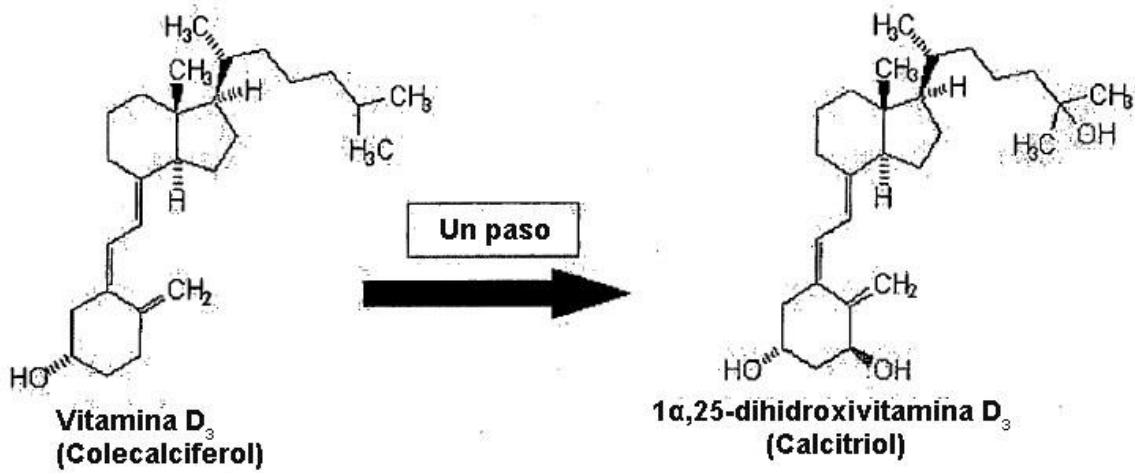
40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de tampón para promover la producción de calcitriol o calcifediol que consiste en 0,01 a 0,3 % (p/v) de al menos un compuesto metálico seleccionado del grupo que consiste en FeCl₂, FeCl₃, FeSO₄, MnCl₂, y ZnSO₄ de 1 a 10 % (p/v) de al menos un solvente orgánico seleccionado del grupo que consiste en etanol, metanol, acetona, y dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1 a 5 % (p/v) de ciclodextrina, 0,01 a 1 % (p/v) de tris(hidroximetil)aminometano, 0,01 a 1 % (p/v) de succinato de sodio, 0,01 a 1 % (p/v) de cloruro sódico, 0,001 a 0,5 % (p/v) de cloruro de magnesio, y una cantidad residual de agua.
- 10 2. Composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol según la reivindicación 1, donde el compuesto metálico está en una concentración de 0,01 a 0,03 % (p/v), el solvente orgánico está en una concentración de 2,5 a 10 % (p/v), la ciclodextrina está en una concentración de 0,25 a 1 % (p/v), el tris(hidroximetil)aminometano está en una concentración de 0,12 a 0,61 % (p/v), el succinato de sodio está en una concentración de 0,16 a 0,8 % (p/v), el cloruro sódico está en una concentración de 0,06 a 0,18 % (p/v) y el cloruro de magnesio está en una concentración de 15 0,006 a 0,05 % (p/v) de la composición.
3. Composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol según la reivindicación 1, donde el compuesto metálico es MnCl₂.
- 20 4. Composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol según la reivindicación 1, donde el solvente orgánico es metanol.
5. Composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol según la reivindicación 1, donde la ciclodextrina es β-ciclodextrina.
- 25 6. Método para producir calcitriol o calcifediol, que incluye las etapas de;
- (a) cultivo de Pseudonocardia autotrofica;
- 30 (b) recolección de células microbianas de la solución de cultivo; y
- (c) mezcla de las células microbianas recogidas, vitamina D₃, y la composición de tampón que promueve la producción de calcitriol o calcifediol de alguna de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. Método para la producción de calcitriol o calcifediol según la reivindicación 6, donde la Pseudonocardia autotrofica es Pseudonocardia autotrofica ID9302.

Fig. 1

Biotransformación



Síntesis química

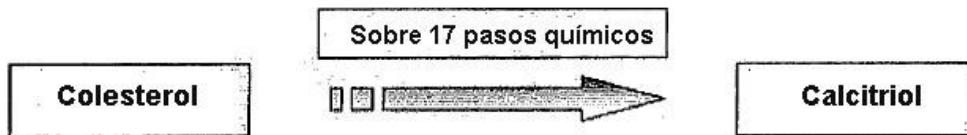


Fig. 2

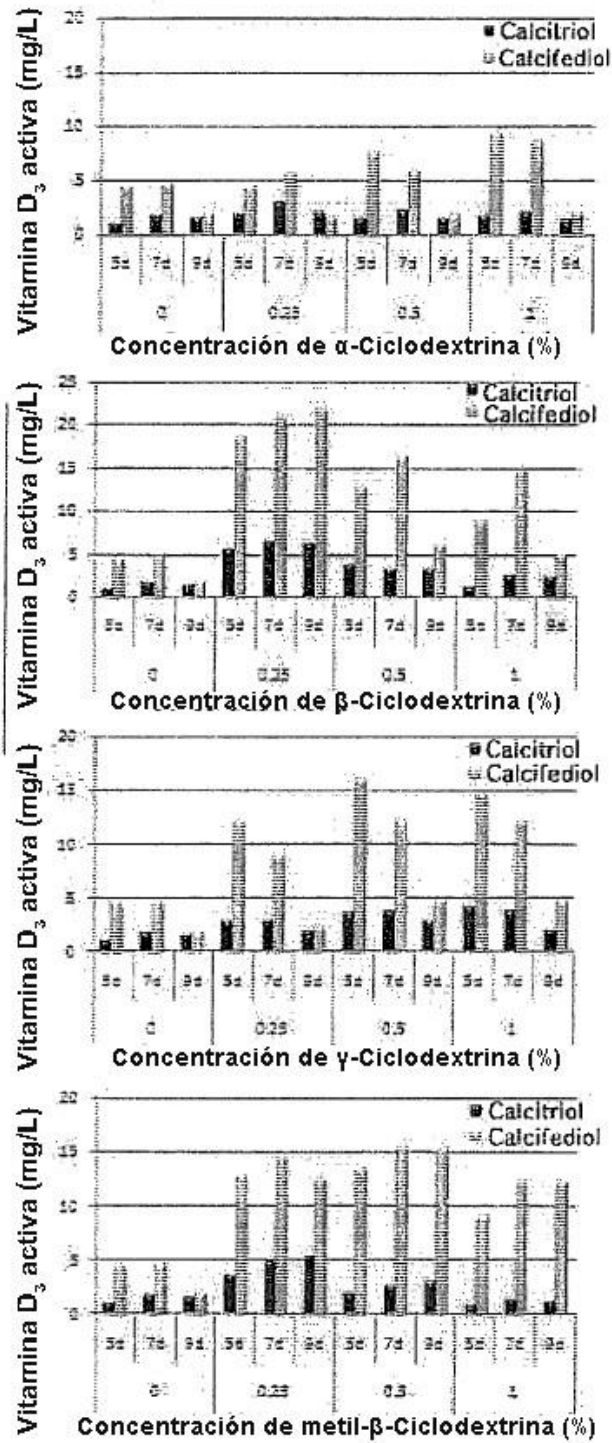


Fig. 3

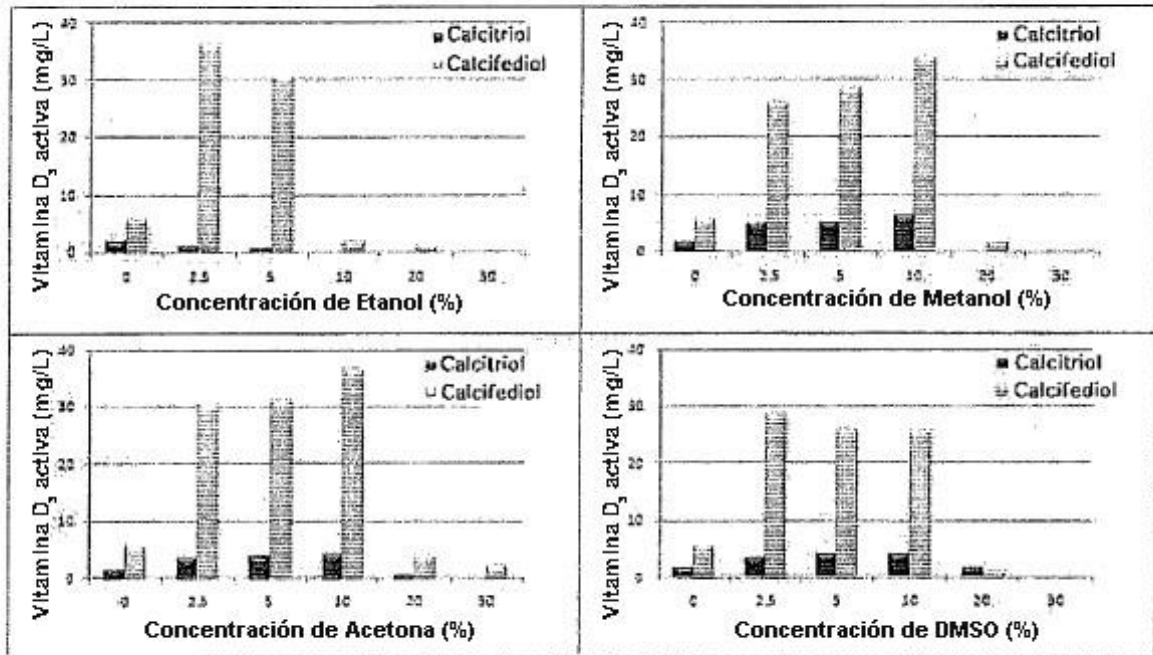


Fig. 4

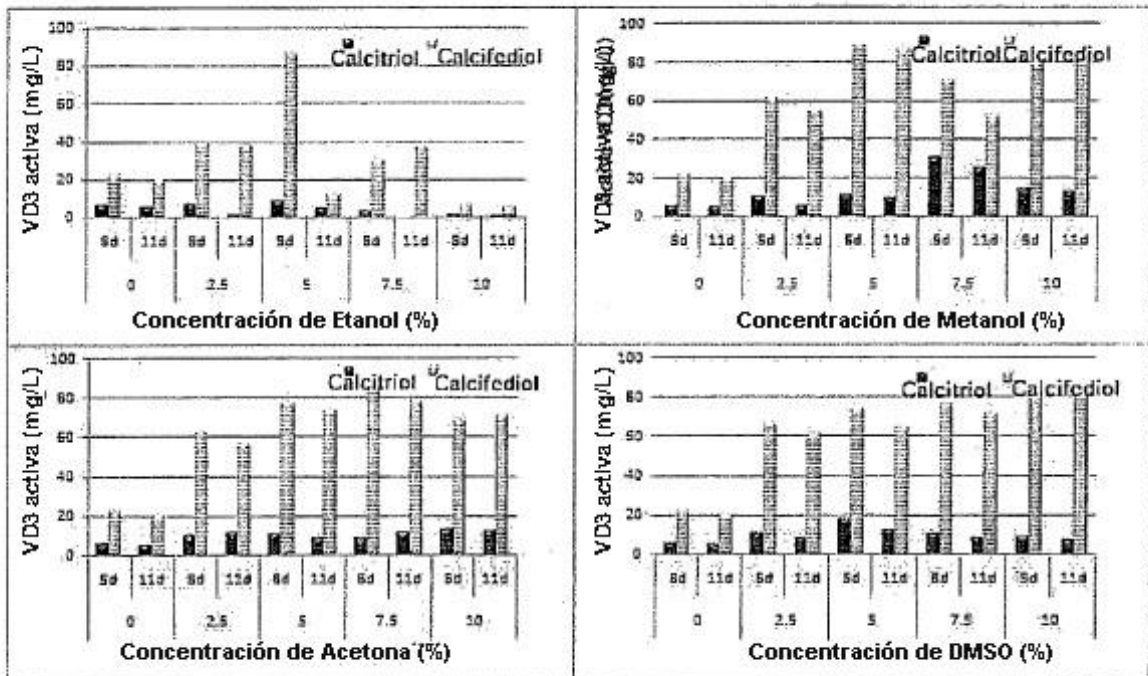


Fig. 5

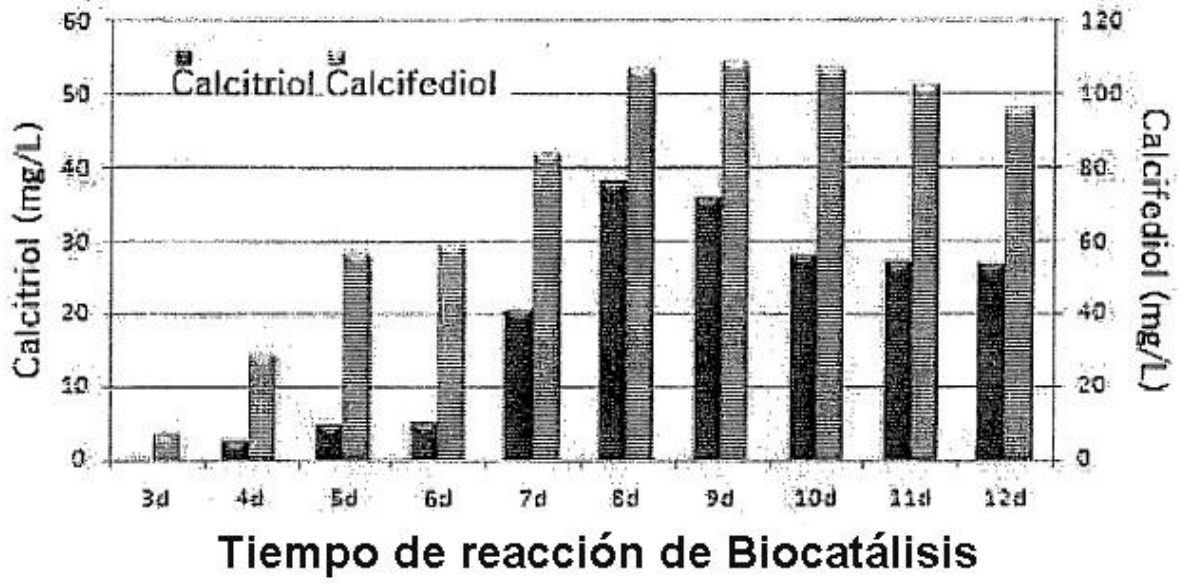


Fig. 6

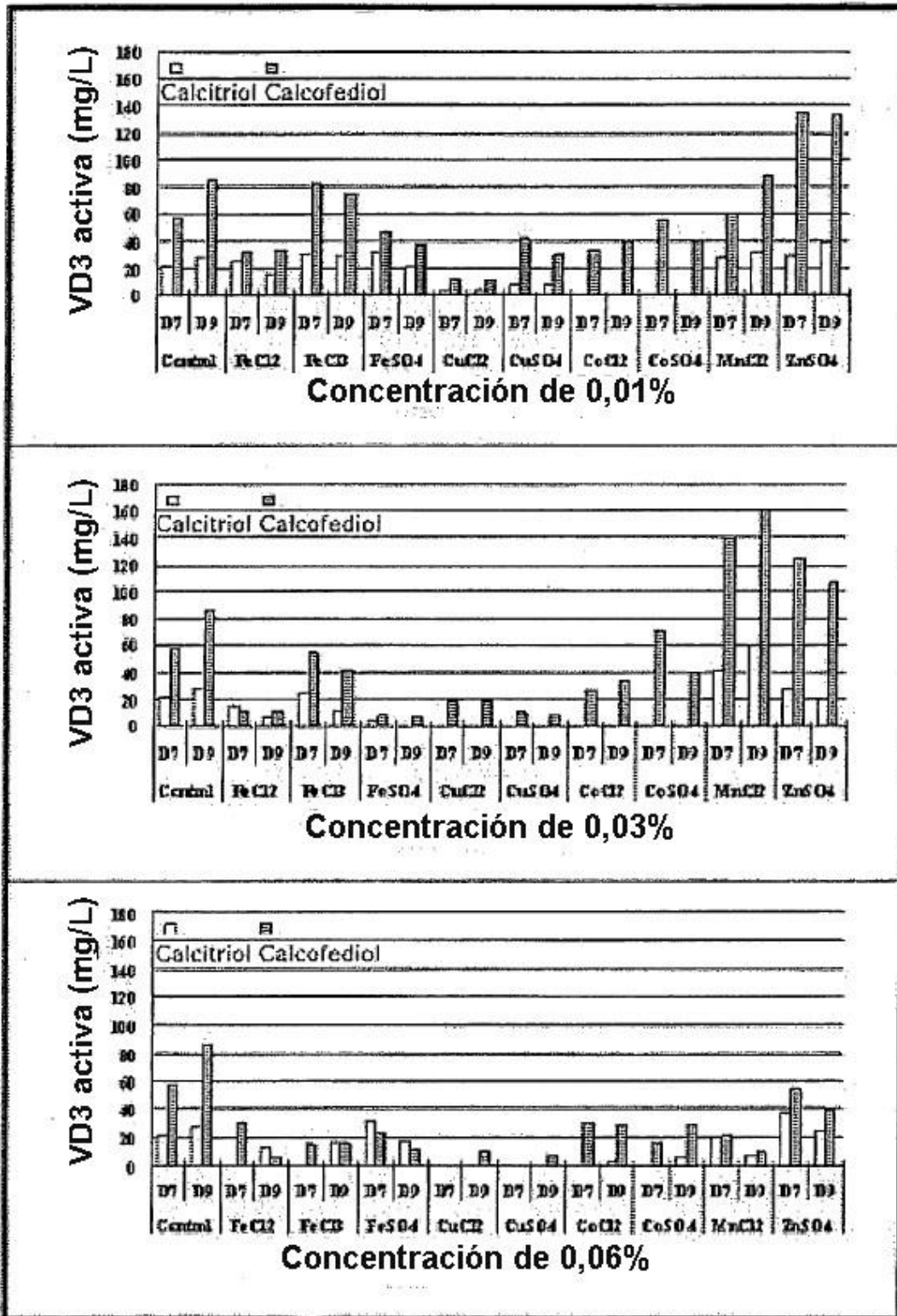


Fig. 7

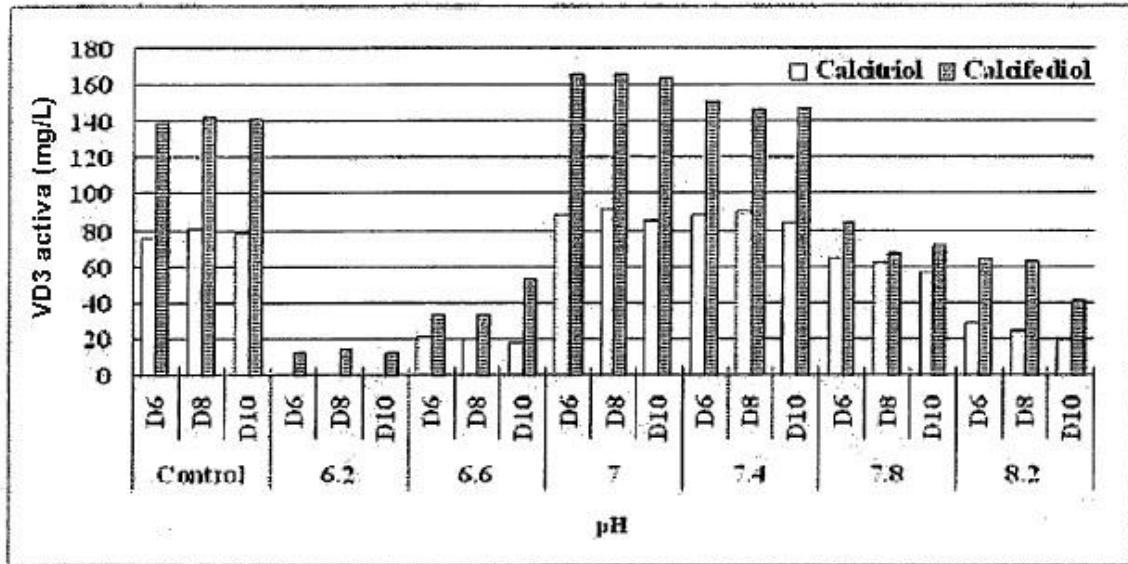


Fig. 8

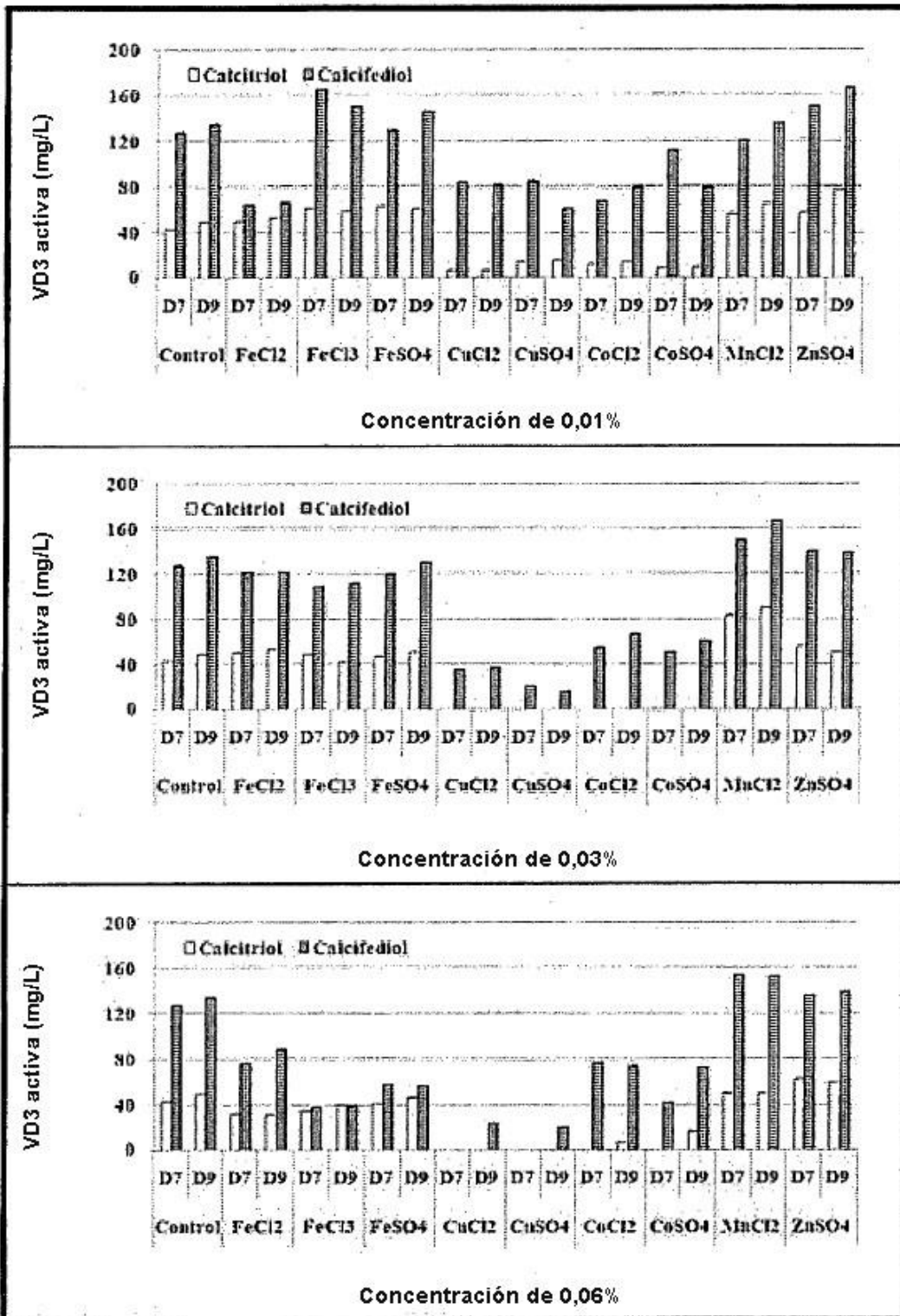


Fig. 9

