

PROTIRAKOVINOVÉ TAXÁNOVÉ PRÍRODNÉ LÁTKY

MICHAL MARUNA, MÁRIA ŠTURDÍKOVÁ
a PETRA ONDREJÍČKOVÁ

Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej
a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava
maria.sturdikova@stuba.sk

Došlo 12.2.08, prepracované 14.5.09, prijaté 4.6.09.

Kľúčové slová: diterpény, paclitaxel, taxány, *Taxus* sp.,
rakovina

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia taxánových diterpénov
 - 2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie analógov paclitaxelu
 - 2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín
 - 2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe
3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných a alternatívnych zdrojov
 - 3.1. Biosyntéza
 - 3.2. Izolácia z rastlinného materiálu
 - 3.3. Semisyntéza
 - 3.4. Chemická syntéza
 - 3.5. Biotechnologická produkcia
4. Záver

1. Úvod

Prírodné produkty sa oddávna používali ako účinné prostriedky na liečenie rôznych chorôb či už v tradičnej alebo v dnešnej novodobej medicíne. V súčasnosti sa čoraz viac do popredia dostávajú ťažko liečiteľné civilizačné choroby ako napr. rakovina. Preto sa vedci intenzívne zaoberajú vývojom nových liečiv a inšpiráciu častokrát hľadajú v prírode. Mnohé farmaceuticky významné látky boli izolované z rastlín, živočíchov, húb, morských organizmov a mikroorganizmov. Aj diterpenoidné taxány s hlavným zástupcom paclitaxelom boli objavené pri štúdiách viac ako 12 000 prírodných látok s protirakovinovou aktivitou.

Skúmania fytochemického profilu extraktov kôry *Taxus* sp. (tis) viedli k izolácii cytotoxických diterpenových taxánov, spomedzi ktorých najúčinnější je paclitaxel. V poslednom desaťročí je paclitaxel významným príro-

som v chemoterapii malígnych ochorení. Je účinný na rôzne druhy nádorov, špeciálne vaječníkov a prsníkov. Skúma sa aj ako potenciálne liečivo voči skleróze multiplex, psoriáze, reumatoidnej artritíde. Doteraz je známych viac ako 300 taxánov (prírodných aj semisyntetických), z nich mnohé sú dnes v preklinickom výskume ako potenciálne protirakovinové liečivá. Farmaceutický význam, intenzívny výskum a nízky obsah tejto zložitej látky v rastline (do 600 ppm v suchých častiach) viedli k hľadaniu možností biotechnologickej produkcie, pretože priemyselne zatiaľ dominuje finančne náročná chemická semisyntéza spojená s izoláciou z mezoproduktov rastlín *Taxus* sp. Alternatívne produkčné systémy pre taxány sú najmä rastlinné bunky *Taxus* sp. a mikroorganizmy. V tejto súvislosti boli začaté intenzívnejšie štúdie endofytických a epifytických fungálnych a bakteriálnych komunit hostiteľských farmaceuticky významných rastlín.

2. Charakterizácia taxánových diterpénov

Diterpény sú veľkou podskupinou terpenov, ktoré tvoria jednu z najväčších skupín prírodných produktov. Viac ako 30 000 zlúčenín patriacich do tejto skupiny zahŕňa aj medicínsky významné látky ako vitamíny, hormóny a cytostatické liečivá.

Taxány sú vo vode málo rozpustné diterpény, ktorým sa v poslednej dobe venuje veľa pozornosti, pretože sú účinnými protinádorovými látkami. Paclitaxel, komplexný amidový diterpenový derivát izolovaný z pacifického tisu (*Taxus brevifolia*), bol popísaný Národným rakovinovým inštitútom (NCI) v USA v roku 1962. V deväťdesiatych rokoch 20. storočia bol spoločnosťou Bristol-Myers Squibb patentovaný obchodný názov paclitaxelu Taxol®. V súčasnosti je považovaný za jeden z najdôležitejších protirakovinových prostriedkov¹. Záujem o paclitaxel začal okolo roku 1962, keď extrakt z kôry *Taxus brevifolia* bol testovaný v rastlinnom skríningu NCI (National Cancer Institute, USA). Klinický výskum paclitaxelu bol však oneskorený pre ťažkosti, ktoré súviseli s jeho toxicitou, určením presnej chemickej štruktúry a hlavne výskytom v prírodných zdrojoch vo veľmi malých množstvách. Diterpenový pseudoalkaloid so sumárnym vzorcom $C_{47}H_{51}NO_{14}$ a molekulovou hmotnosťou 852 Da bol prvýkrát získaný v čistej forme v roku 1969 a jeho komplikovaná štruktúra bola publikovaná v roku 1971 (cit.²). História paclitaxelu je prehľadne sumarizovaná v tabuľke I.

2.1. Biologická aktivita a terapeutické využitie analógov paclitaxelu

Taxánové zlúčeniny disponujú viacerými funkciami priaznivými ale aj nevhodnými pre organizmus. Toxicita

Tabuľka I
História paclitaxelu (Taxolu®) ako protirakovinovej látky³

Rok	Udalosť
1963	Objavenie protirakovinovej aktivity extraktu kôry <i>Taxus brevifolia</i> počas skríningu 35 000 rastlín.
1971	Identifikácia paclitaxelu ako aktívnej súčasti protinádorovej aktivity extraktu.
1979	Zistenie unikátneho mechanizmu paclitaxelu na stabilizáciu tubulínu.
1983	Zahájenie klinickej skúšky bezpečnosti a účinnosti paclitaxelu voči rôznym typom rakoviny (NCI).
1989	Dosiahnutie 30 % úspešnosti liečby rozvinutej rakoviny vaječníkov.
1991	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb je vybraná ako komerčný partner NCI vo vývoji injekčnej formy a aplikácií paclitaxelu.
1992	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu ťažko liečiteľnej rakoviny vaječníkov. Klinické testy ukázali, že toto liečivo je účinné aj na pokročilé štádium rakoviny prsníkov.
1993	Spoločnosť Bristol-Myers Squibb končí s ťažbou <i>Taxus brevifolia</i> pre výrobu paclitaxelu a začína skúmať iné obnoviteľnejšie zdroje tejto zlúčeniny.
1994	Úradné schválenie používania paclitaxelu na liečbu rakoviny prsníkov v štádiu, keď počiatočná chemoterapia po šesť mesačnej liečbe nebola účinná alebo na liečbu metastázujúcej rakoviny prsníkov, ktorá sa nedá liečiť chemoterapeutickou kombináciou.
1995	Prehodnocovanie schválenia používania semisyntetickej formy paclitaxelu.
1997	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu na liečbu Kaposiho sarkómu spojeného s AIDS v druhej línii liečby. Schválenie produkcie paclitaxelu pomocou rastlinných bunkových kultúr <i>Taxus sp.</i> v Kórei a dovoz do iných krajín spoločnosťou Samyang Genex.
1998	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rozvinutého karcinómu vaječníkov v prvej línii liečby.
1999	Úradné schválenie používania semisyntetického paclitaxelu v kombinácii s cisplatinou na liečbu rakoviny pľúc u pacientov, ktorí nie sú vhodní kandidáti na operáciu alebo rádioterapiu.
2000	Zisk z predaja paclitaxelu dosiahol 1,6 miliardy USD.
2001	Patent na výrobu a predaj semisyntetického derivátu paclitaxelu docetaxelu (obchodný názov Taxotere, firma Sanofi-Aventis).
2005	Povolenie používania Abraxanu (paclitaxel naviazaný na albumín) na liečbu rakoviny prsníkov.
Súčasnosť	Produkcia paclitaxelu firmou Phyton pomocou explantátových kultúr <i>Taxus sp.</i>

rastlín *Taxus* bola už dlho známa, pripisovali ju hlavne taxínom, zmesi látok získanej z ich ihličia prvýkrát v roku 1856. Neskôr sa ukázalo, že taxíny sú zmesou siedmich alkaloidov a k toxicite tisu prispievajú nemalou mierou aj odlišné cytotoxické diterpénové taxány. Aj mnohé iné viac rozšírené rastliny sú bohaté na taxíny, ktoré môžu byť alternatívnymi štartovacími látkami pre semisyntézu paclitaxelu⁴.

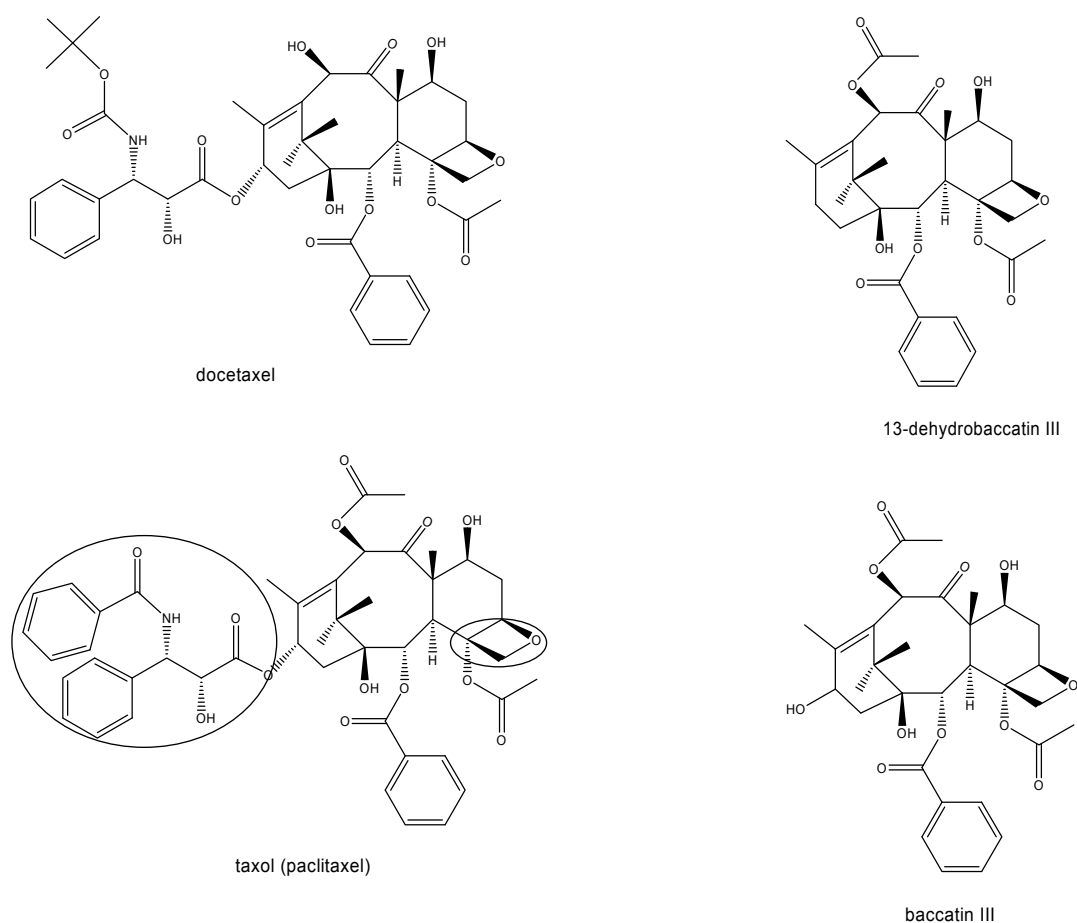
Najdôležitejšiou vlastnosťou taxánov je ich cytotoxický účinok. Touto vlastnosťou sa vyznačuje hlavný zástupca paclitaxel a niekoľko jeho prírodných i semisyntetických derivátov s postranným C-13 reťazcom v taxánovej molekule (docetaxel, 7-epitaxol alebo IDN 5109). Taxány sú v dnešnej dobe prototypom novej triedy chemoterapeutík. Ich biologická aktivita bola dokázaná už dávnejšie na viacerých modeloch rakovinových buniek: L1210, Walker 256, P 1534, P 388 a B 16 (cit.⁵).

Podaktoré taxány vykazujú antifungálnu aktivitu, sú schopné inhibovať rast niektorých parazitických húb, napr.

Plasmodium falciparum, alebo *Toxoplasma gondii*⁶. Taxány majú ďalej význam pri ochrane rastlín *Taxus sp.* pred patologickými zmenami koreňa spôsobenými fytopycétami *Pythium* a *Phytophthora*. Hoci rastú pri močiaroch a jazerách, veľmi zriedka trpia hnilobou koreňov⁷.

Schopnosť zastaviť rast nádorových buniek má niekoľko taxoidov. Sú vhodné a veľmi účinné najmä voči rakovine prsníkov a vaječníkov. Výskumy ukázali, že ich biologická aktivita sa prejavuje i na bunkách rakoviny hrdla (regresia tumoru 20–40 %), žalúdka a kože^{8,9}. Dnes sa už úspešne aplikujú liečivé preparáty, ktoré obsahujú docetaxel (taxotere), semisyntetický člen taxánových zlúčenín. Efektívne pôsobí pri liečbe pacientiek s pokročilou (lokálnou i metastázovou) rakovinou prsníkov s účinnosťou 54–69 % v prvej línii monoterapie¹⁰. V štádiu výskumu je jeho použitie pri liečbe ďalších ochorení, napr. pokročilého štádia rakoviny žalúdka, hrubého čreva (HCT 116) alebo močových ciest^{11–13}.

Prípravok TAXOL je indikovaný na liečbu nasledujú-



Obr. 1. Štruktúry najznámejších taxánov (paclitaxel a jeho za cytotoxicitu zodpovedný reťazec na 13. uhlíku a oxetánový kruh na 4. a 5. uhlíku)

cich ochorení:

- Karcinóm ovárií: aplikuje sa samostatne alebo v kombinácii s cisplatinou v pokročilom štádiu ochorenia. Pri sekundárnej liečbe sa používa na terapiu metastázujúceho karcinómu vaječníkov po zlyhaní štandardnej terapie.
- Karcinóm prsníkov: nasadzuje sa po zlyhaní štandardnej terapie alebo v adjuvantnej liečbe karcinómu prsníka s metastázami do uzlín po predchádzajúcej štandardnej kombinovanej terapii.
- Nemalobunkový karcinóm pľúc: využíva sa pri liečbe pacientov, u ktorých primárne nie je možné uskutočniť radikálny spôsob liečby (chirurgický výkon alebo ožiarenie).
- Kaposiho sarkóm: ide o sekundárnu terapiu u pacientov s AIDS¹⁴.

Z farmaceutického hľadiska významnými derivátmi paclitaxelu sú 7-epitaxol alebo derivát 14-hydroxy-10-deacetylbaaccatinu III označený ako IDN 5109, ktorý vykazuje vysokú účinnosť na bunky karcinómu vaječníkov

(modely 1A9, HOC 18), pričom spôsobuje 90–100% nádorovú regresiu. Navyše je zatiaľ jediným taxánom, ktorý by bol vhodný i na perorálnu aplikáciu⁹.

Protinádorové deriváty paclitaxelu sa môžu aplikovať buď ako jediná terapeutická zložka (monoterapia) alebo spolu s niektorými inými cytostatickými látkami, ako sú doxorubicín, vinblastín, vinkristín atď. Napríklad boli zaznamenané úspechy pri sledovaní inhibície rastu buniek rakoviny prostaty na modeloch LN Cap a PC-3, kedy sa použila kombinácia paclitaxelu so selénom¹⁵.

Paclitaxel má predpokladané terapeutické využitie aj pri liečbe psoriázy, reumatoidnej artritídy, Alzheimerovej choroby ako aj pri liečbe polycystickej autozomálnej choroby obličiek. Okrem uvedených aktivít sú známe aj jeho antiproliferačné a protizápalové vlastnosti. Štyri taxánové zlúčeniny izolované z *Taxus baccata* L. taxusin, baccatin VI, baccatin III a 1-hydroxybaccatin I majú protizápalovú a antinociceptívnu aktivitu¹⁶. Chemické vzorce najznámejších taxánov sú uvedené na obr. 1.

2.2. Mechanizmus účinku taxánových zlúčenín

V roku 1979 Fuchs a Johnson popísali biologicky aktívne taxány ako látky pôsobiace antimitoticky na bunky¹⁷ a v tom istom roku Horwitz objasnil, že napomáhajú ireverzibilnému zhlukovaniu tubulínu, ktorý je súčasťou mikrotubulov¹⁸.

Chemická štruktúra jednotlivých taxánov zodpovedá za ich, či už väčšiu alebo menšiu, biologickú účinnosť. Dokázalo sa, že je to predovšetkým oxetánový kruh a postranný reťazec na C-13 (obr. 1), ktoré sú nevyhnutné pre zabezpečenie ich cytotoxicity. Oxetánový kruh je nielen akceptorom protónov, ale zaisťuje aj pružnosť tetra-cyklického jadra taxánového skeletu, čím sú taxány schopné zapojiť do reakcie s proteínmi bočné reťazce v polohách C-2, C-4 a C-13 (cit.¹⁹).

Mikrotubuly sú vnútrobunkové polymérne útvary, ktorých dynamika má rozhodujúcu úlohu v tvorbe mitotického vretienka, pri kontrole mitózy a v pohybe chromozómov. Predpokladá sa schopnosť paclitaxelu potlačiť dynamiku mikrotubúl a tým inhibovať mitózu v bunkovom cykle, čiže aj proliferáciu. Zistené to bolo na dvoch druhoch ľudských nádorových buniek, konkrétne vaječnickových Caov-3 a obličkových A-498. Mitotické vretienko bolo abnormálne u 30 % buniek Caov-3 z celkového počtu a až 58 % v prípade A-498 buniek po aplikácii paclitaxelu²⁰.

Biologická aktivita taxánov spočíva v schopnosti navzájom pútať tubulínové vlákna a iniciovať koaguláciu mikrotubulov, čo znemožňuje ich depolymerizáciu späť na tubulín. Tak vznikajú nefunkčné, abnormálne proteínové štruktúry, ktoré zapríčinia zastavenie bunkového cyklu v G₂/M fáze, čo inhibuje rast nádorových buniek. Paclitaxel je jedným z mála zlúčenín, ktoré sa vyznačujú takýmto cytotoxickým účinkom²¹.

2.3. Formy aplikácie taxánov v liečbe

Pri vývoji a výrobe liečiv na báze taxánov sa stretávajú s dvoma vážnymi problémami. V prvom rade je to ich veľmi slabá rozpustnosť vo vode (približne 4 µg ml⁻¹), čo spôsobuje značné ťažkosti s aplikáciou pacientom pri liečbe. Druhým problémom je vyčerpatelnosť prírodného zdroja, nízke výťažky a vysoká náročnosť prípravy v purifikovanej forme vyhovujúcej klinickým potrebám⁵. Taxány používané v medicíne sú 3 až 10× menej rozpustné ako iné látky s podobným účinkom (doxorubicín, daunorubicín). Pretože ich funkčné skupiny sú ionizované v rozmedzí hodnôt pH nevhodných pre farmaceutické použitie, zmenou pH sa rozpustnosť nezmení. Výskumy zamerané na zvyšovanie solubility zahŕňali aplikácie rôznych komplexov (kladne alebo záporne nabitých), prípravu ich solí, atď. Pozitívnejšie výsledky priniesli pokusy chemicky modifikovať polohy C-2 a C-7, čím vznikli syntetické deriváty taxánov nazývané ako „prodrugs“. Takéto zlúčeniny už mali dostatočnú rozpustnosť a tým primerané farmaceutické vlastnosti, vyhovujúce prísnyim požiadav-

kám na použitie v humánnej medicíne. Tieto deriváty nevykazovali biologickú aktivitu, avšak po aplikácii do organizmu sa hydrolyzovali za vzniku pôvodného účinného taxánu²². Skúma sa ďalej naviazanie xylozylových, glukozylpyranozylových, sukcinátových, glutarátových zvyškov, prípadne ich esterov a solí, niektorých aminokyselín v polohe C'-2. Veľká pozornosť sa venuje v dnešnej dobe konjugátu kyseliny glutámovej s paclitaxelom v polohe C-2 (paclitaxel poliglumex, nazývaný tiež XYOTAX). Je to inaktívny, dostatočne rozpustný komplex, paclitaxel sa z neho uvoľňuje po pôsobení proteázy katepsínu B, ktorá sa vo väčšej miere nachádza v rakovinových bunkách a tým je zaručený účinok paclitaxelu len na nádorové bunky²³.

Druhá generácia taxoidov bola pripravená systematickou modifikáciou na C-2, C-10 a C-3'N pozíciách a bol študovaný vzťah ich štruktúry a biologickej aktivity. Vyvíjanie taxánov s lepšími farmakologickými vlastnosťami a zvýšenie aktivity špeciálne proti rakovine rezistentnej na terapeutiká viedol k vývoju tretej generácie taxoidov. Niektoré taxoidy tretej generácie prejavujú excelentnú toxicitu voči línii pankreatických buniek expresiou „multidrug“ rezistentných génov^{24,25}.

V súčasnosti sa tiež študujú nanočastice s enkapsulovaným paclitaxelom samotným a enkapsulovaným paclitaxelom spolu s inhibítorom P-glykoproteínu (P-gp), kľúčovým faktorom rezistencie na nádorové liečivá²⁶.

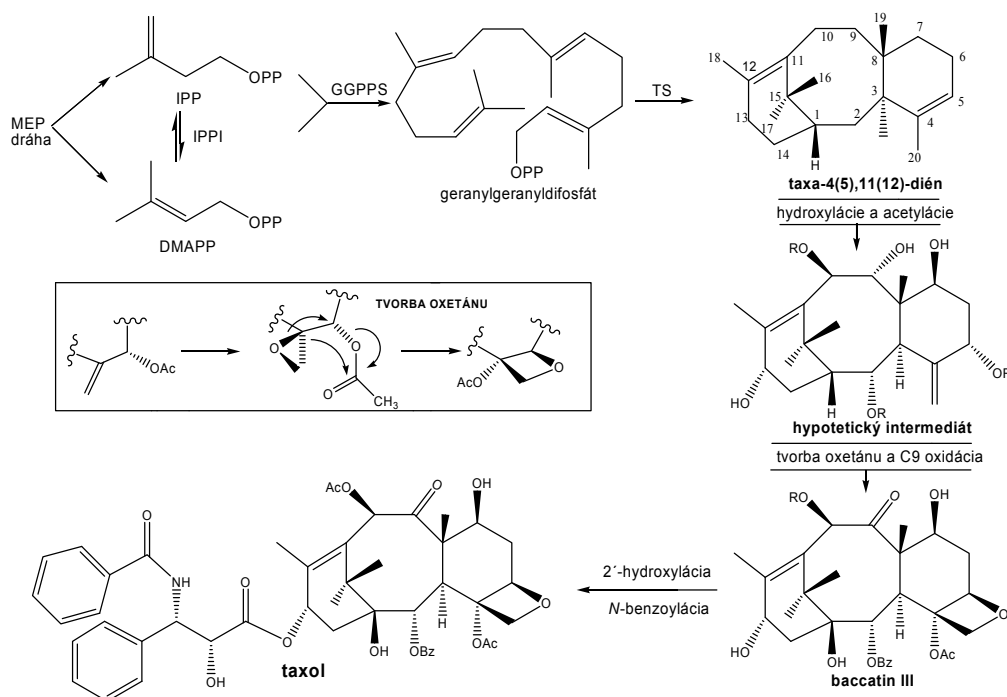
Ďalej sa výskum zamerával na iné látky (prípadne ich zmesi), ktorých prítomnosť v preparáte by zvýšila hydrofilnosť taxánov (etanol, dimetylsulfoxid, Tween 80, karboxymetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, polyetylén-glykol, lecitín, polyoxyetylovaný ricínový olej – Cremofor EL). Nakoniec sa ako najvhodnejší pre klinický vývoj ukázal polyoxyetylovaný ricínový olej (50%) a dehydrátovaný alkohol s koncentráciou účinného taxánu 6 mg ml⁻¹. Bežné balenie vyvinutého preparátu obsahuje 5 ml tejto zmesi. Pri aplikácii je liek 5 až 20× zriedený fyziologickým roztokom alebo 5% roztokom dextrózy, takže koncentrácia účinnej látky je 1,2–0,3 mg ml⁻¹. Nemenej významnú úlohu zohrávajú i fosfolipidové nosiče taxánových liečiv, lipozómy. Biologicky aktívny taxán, ktorý je inkorporovaný do lipozómov, penetruje do nepolárnej časti lipidickej dvojvrstvy²⁷.

Nedávno bol vyvinutý biodegradovateľný polymérny systém na báze poly-(kyselina sebaková – kyselina ricínolejová) na prenos paclitaxelu priamo do miesta proliferácie. Takto zavedený paclitaxel do polyméru a injektovaný do vnútra nádora bol efektívny v liečbe lokalizovaných nádorov²⁸.

3. Tvorba a získavanie taxánov z prírodných a alternatívnych zdrojov

3.1. Biosyntéza

Dve základné metabolické cesty sú známe pre biosyntézu izoprenoidov a to mevalonátová a ne-mevalonátová

Obr. 2. Schéma biosyntézy paclitaxelu²⁹

dráha. Prvým prekuzorom mevalonátovej dráhy je acetát aktivovaný ako acetylkoenzým A. Dve následné kondenzácie vytvárajú acetoacetyl-CoA a 3-hydroxy-3-metylglutaryl-koenzým A (HMG CoA), ktorý je potom redukovaný na mevalonát. Reakcia je katalyzovaná HMG-CoA-reduktázou. Dve ďalšie fosforylácie mevalonátu nasledované dekarboxyláciou za účasti ATP vedú k vzniku izopentenylfosfátu, pre ktorý je charakteristický päťuhlíkatý reťazec všetkých izoprenoidov. Nemevalonátová dráha je rozšírená v baktériách a vyšších rastlinách. Reakciu pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu cez sériu katalytických krokov vznikne izopentenylidifosfát (IPP). Za kľúčový prekuzor izoprenoidov je teda považovaný IPP a nie mevalonát. IPP vystupuje ako prekuzor izoprenoidov tak u organizmov obsahujúcich mevalonátovú, ako aj glyceraldehyd-pyruvátovú dráhu. Z IPP ďalej vzniká geranylgeranylidifosfát (GGPP), prekuzor protirakovinových taxoidných liečiv²⁹. Na objasnenie celej biosyntézy sa použilo náhodné sekvenovanie cDNA knižnice buniek *Taxus cuspidata*, v ktorých bola biosyntéza taxánov indukovaná metyljasmonátom³⁰. Kľúčovým krokom biosyntézy je zacyklenie univerzálneho prekuzora GGPP na taxa-4, (5),11(12)-dién (obr. 2). Reakciu katalyzuje enzým taxadiénsyntáza. Z hľadiska stereochemie mechanizmus tohto kroku spočíva v tom, že GGPP sa uzatvára do cyklickej formy za vzniku prechodného verticilénového intermediátu, nasleduje transfer α -protónu z polohy C-11 na C-7, čo iniciuje vznik B/C kruhu (vytvorená zlúčenina je taxanylovy kation). Nasleduje deprotonizácia na C-5 (cit.³¹). Bol

zaznamenaný vysoký stupeň expície génu pre taxadiénsyntázu (TS). Aj napriek značnému množstvu enzýmu TS (jeho koncentrácia je najvyššou zo všetkých enzýmov biosyntézy taxánov), cykлизácia GGPP je pomalý krok tvorby taxánov. V ďalšom formovaní molekuly taxánov zohrávajú dôležitú úlohu cytochróm P450 oxygenázy. Príslušné oxygenácie zahŕňajú takmer polovičný počet reakcií taxánovej biosynthetickej dráhy. Katalyzuje ich skupina enzýmov, ktorá v *Taxus cuspidata* obsahuje 2 α -, 5 α -, 7 β -, 10 β -, 13 α - a 14 α -hydroxylázy³². Acylácia hydroxylových skupín patrí do ďalšej série úprav postranných reťazcov taxánov. CoA dependné acyl- a aryl-transferázy sú tiež dôležitou súčasťou biosyntézy paclitaxelu. Katalyzujú 5 z 19 krokov dráhy tvorby taxánov³³. Je známy veľký počet taxánov, ktoré sa líšia polohou hydroxylov na taxánovom jadre a tiež typom acylu alebo arylu. Rekombinantné transferázy umožnili počiatočnú acetyláciu na C-5 taxánového jadra, následne benzoyláciu na C-2, acetyláciu na C-10. N-benzoylácia na C-13 prebieha pomocou fenylalanínaminomutázy. Otvárajúce úpravy reťazca pozostávajú z C-1 a C-9 hydroxylácie, C-4 a C-20 epoxidácie. Tieto úpravy vedú k vzniku baccatinu III (obr. 2, cit.³⁴).

3.2. Izolácia z rastlinného materiálu

Taxány možno získať priamou izoláciou z rastlinného materiálu, čo je však najmä z ekologického hľadiska nepri-

puštné, pretože dochádza k ničeniu vzácnych tisových stromov. Získanie 2 g čistého paclitaxelu vyžaduje vyhubenie približne 12 veľkých stromov tisu a stojí 10 000 USD (cit.³⁵). Výťažky taxánov získaných týmto procesom sú veľmi nízke, pohybujú sa v rozmedzí 100–300 ppm purifikovanej látky vzhľadom na hmotnosť suchého floému. Taxány sa extrahujú tiež z ihličiek *Taxus sp.*, kde ich obsah je vyšší, do 500 ppm hmotnosti suchého ihličia pre cephalomanin a baccatin III, do 480 ppm hmotnosti suchých ihličiek pre brevifoliol a 10-deacetyl-baccatin III. Problém spojený s izoláciou z pletív predstavuje i fakt, že zastúpenie taxánov počas jednotlivých ročných období u toho istého druhu sa značne mení³⁶.

Taxus sp. môžeme najčastejšie nájsť na území Severnej Ameriky a Euroázie, ide o veľa vzácnych druhov. Vo všeobecnosti sa tieto ihličnaté stromy vyskytujú vo vlhkom prostredí pralesov severnej hemisféry, ale rastú tiež v subtropickom a tropickom pásme na juhu a juhovýchode Ázie a Strednej Ameriky, aj na južnej pologuli na ostrovoch Sumatra a Celebes.

Podľa geografickej lokality rozoznávame niekoľko prirodzených sa vyskytujúcich druhov:

- *Taxus brevifolia* rastie v západnej časti Kanady a USA,
- *Taxus globosa* sa vyskytuje v Mexiku, El Salvadore, Hondurase a Guatemale,
- *Taxus floridana* je endemickým ihličnanom na severe Floridy,
- *Taxus canadensis* je rozšírený od Newfoundlandu až k Manitobe a od Iowy k Severnej Karolíne,
- *Taxus baccata* má domov v Európe a na severe Afriky,
- *Taxus cuspidata* je typickou rastlinou v Číne, Japonsku, Kórei,
- *Taxus wallichiana* rastie vo východnom Afganistane, Tibete, Číne.

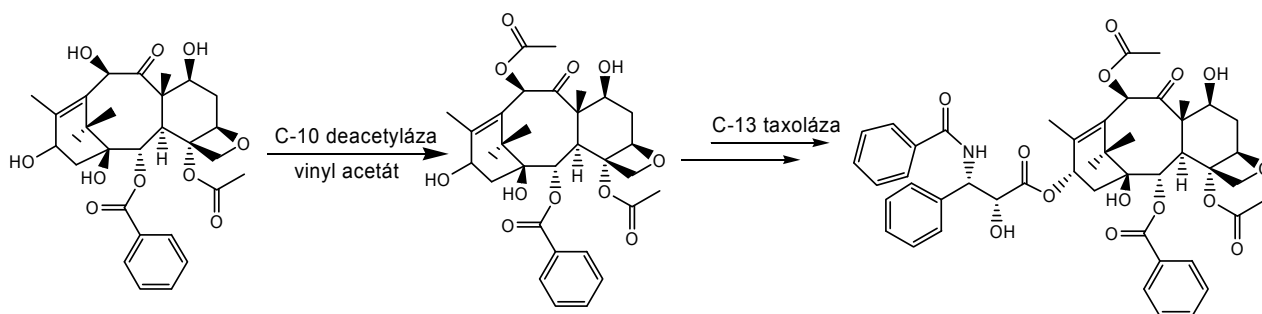
Z ďalších druhov možno spomenúť *Taxus chinensis*, *Taxus celebica*, *Taxus x media*, *Taxus yunnanensis*, *Taxus maire* a *Taxus sumatrana*³⁷. Na zastúpenie jednotlivých taxánov v ihličnanoch majú vplyv okrem geografickej lokality i ekologické a poľnohospodárske faktory aj podmienky skladovania. V experimente, ktorý uskutoč-

nil van Rozendaal a spol. v roku 2000, bolo analyzované ihličie niekoľkých druhov a kultivarov tisu metódou HPLC. Sledovali prítomnosť paclitaxelu, 10-deacetyl-paclitaxelu, cefalomanínu, baccatinu III, 10-deacetyl-baccatinu III a brevifoliolu. Z piatich rôznych lokalít v Holandsku a vo Veľkej Británii bolo odobratých okolo 750 rôznych vzoriek. Výsledky skriningu ukázali veľkú variabilitu v obsahu taxánov medzi rôznymi druhmi a kultivarmi. Obsah paclitaxelu a 10-deacetyl-baccatinu III sa pohyboval v rozmedzí 0–500 ppm a 0–480 ppm hmotnosti suchého ihličia. Brevifoliol sa vo vysokej koncentrácii našiel u *Taxus brevifolia*. 10-deacetylpaclitaxel, cefalomanín a baccatin III sa vyskytovali v koncentráciách v rozsahu 0–500 ppm hmotnosti suchého ihličia. Obsah paclitaxelu je najviac 100 ppm v suchom ihličí. Storočný strom tisu obsahuje okolo 300 mg tejto zlúčeniny³⁶. Ďalším primárnym zdrojom taxánov je cyprus *Taxodium distichum*, pre ktorý je typické podobné prostredie ako pre *Taxus sp.* Ide taktiež o neopadávy ihličnan s lineárnym dvojradom ihličiek, ktorý preferuje vlhké podnebie. Má výšku 30–40 m a je charakteristickou drevinou v oblasti močiarov na juhovýchode USA³⁵.

3.3. Semisyntéza

Semisyntéza je v súčasnosti jedným z hlavných postupov, ktorými sa pripravujú taxány. Tento proces zahŕňa limitované množstvo syntetických krokov (napr. pripojenie C-13 postranného reťazca) potrebných na konverziu taxánových intermediátov extrahovaných z rastlinných pletív *Taxus sp.* na 10-deacetyl-baccatin III. Táto zlúčenina je potom použitá na prípravu finálnych taxánových produktov ďalšími úpravami jej postranných reťazcov za vzniku želaných produktov. Vo farmaceutickej výrobe paclitaxelu zatiaľ prevláda chemicko-organický spôsob pripájania postranných reťazcov na základný taxánový skelet aj napriek tomu, že sú známe biologické produkčné systémy, čo je pravdepodobne dané ekonomickým hľadiskom.

Medzi príklady firiem používajúcich biologický systém patrí spoločnosť Bristol-Myers Squibb. Ide o kmeň



Obr. 3. Enzymová konverzia 10-deacetyl-baccatinu III cez baccatin III na paclitaxel³⁸

Tabuľka II

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, baničkové kultivácie⁴³

Druh	Taxán	Produkcia [mg l ⁻¹]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus canadensis</i>	paclitaxel	117	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	506	
<i>Taxus media</i>	paclitaxel	110,3	elicitácia metyljasmonátom
	celkové taxány	145,3	
<i>Taxus chinensis</i>	paclitaxel	153	optimalizácia média, elicitácia, dovojpasážová kultivácia
	celkové taxány	295	
	paclitaxel	67	prerušené prítokovanie maltózy
	paclitaxel	78,5	regulácia osmotického tlaku
	paclitaxel	49,6	elicitácia AgNO ₃
	taxuyunnanin C	885,9	
	paclitaxel	82,4	elicitácia AgNO ₃ a teplotný posun
	taxuyunnanin C	512,9	
	paclitaxel	137,5	elicitácia AgNO ₃ a teplotný posun
	taxuyunnanin C	274,4	prítokovanie sacharózy
	taxuyunnanin C	527	elicitácia metyljasmonátom a teplotný posun

Tabuľka III

Produkcia taxánov rôznymi bunkovými kultúrami *Taxus* sp. za rôznych kultivačných podmienok, kultivácie v bioreaktoroch⁴³

Druh	Taxán	Produkcia [mg l ⁻¹]	Stratégia kultivácie
<i>Taxus cuspidata</i>	Paclitaxel	22	kinetická štúdia
	Celkové taxány	74	prítokované médium
<i>Taxus chinensis</i>	Taxuyunn-anin C	229	prídavok etylénu
	Taxuyunn-anin C	336	elicitácia metyljasmonátom, prítokovanie sacharózy, pridávanie etylénu
	Taxuyunn-anin C	612	opakovaná elicitácia metyljasmonátom, pridávanie sacharózy
<i>Taxus media</i>	Paclitaxel	21,1	použitie prekurzorov metyljasmonátu,
	Baccatin III	56	dve pasáže

Nocardia lutenis, realizujúci biotransformáciu 10-deacetyl-baccatinu III na baccatin III (obr. 3, cit.³⁸). Ďalšia konverzia baccatinu III na paclitaxel prebieha vo výrobe chemickou syntézou. V literatúre sú popísané aj enzýmy, ktoré nahrádzajú chemickú katalýzu 10-deacetyl-baccatinu III na paclitaxel. Sú to C-13 taxoláza, C-10 deacetyláza. Enzýmy sa získavajú pomocou mikroorganizmov, napr. *Nocardioides albus*, *Moraxella* sp.³⁸.

Bola zistená aj biotransformácia taxánov produkovaných *Taxomyces andreanae*, ktorá zahŕňa hydroxyláciu, deacetyláciu, hydrolyzu, epimerizáciu, a to viacerými hubami napr. *Cunninghamella echinulata*, *Cunninghamella elegans*, *Absidia coerulea*, *Microsphaeropsis onychiuri*, *Mucor* sp., *Alternaria alternata* a *Aspergillus niger*³⁹. Napriek tomu, že proces semisyntézy je efektívny, purifikácia prekurzorov z rastlinného pletiva je náročná a zdĺhavá

vďaka veľkému množstvu fenolických, lipidických a ďalších kontaminantov vyskytujúcich sa v rastlinách. Nevýhodou pri extrakcii prekurzorov biosyntézy taxánov z rastlinného materiálu je aj variabilita obsahu taxánov v závislosti od epigenetických a environmentálnych faktorov, ako aj pomalý rast *Taxus* sp.⁴⁰.

3.4. Chemická syntéza

Keďže taxány sú pomerne zložité štruktúry, totálna syntéza predstavuje finančne veľmi náročnú cestu ich prípravy, a preto je nevýhodná. Napriek tomu už boli navrhnuté všetky kroky syntézy, ktorej princípom je konvergentná stratégia, čím sa otvorila nová možnosť výroby taxánov⁴¹.

3.5. Biotechnologická produkcia

Biotechnologický proces prípravy taxánov je založený na kultivačných postupoch s rastlinnými bunkovými kultúrami alebo na mikrobiálnom princípe, kde sa môžu uplatniť i metódy génového inžinierstva, prípadne nahradenie niektorého kroku tvorby produktu chemickými syntézami alebo aplikáciou enzýmov. Väčšina takýchto procesov je v ďalšom štádiu výskumu, postupne sa však predpokladá aj ich využitie v priemysle.

Využitie explantátových kultúr

Taxánové metabolity sú izolované z podkôry ihličnana procesom, ktorý rastliny ničí. *Taxus* sp. nie je bežnou drevinou a rastie veľmi pomaly. Jednou z alternatív, čo rieši tento problém, je kultivácia rastlinných buniek rôznych línií schopných produkovať väčšie množstvá taxánových sekundárnych metabolitov v závislosti od zloženia kultivačného média⁴. Rastlinné bunkové a pletivové kultú-

ry nazývané explantáty z intaktných rastlín sa získavajú selekciou a izoláciou živých rastlinných pletív. Prostredie pre explantáty je prísne kontrolované, sú dodržiavané striktné aseptické podmienky, dôležité je zloženie média a fyzikálne faktory (teplota, svetlo, vlhkosť). Pre bunkové kultúry *Taxus* sp. sú už vyvinuté techniky využívajúce diferencované aj nediferencované bunky. Kalusové kultúry boli úspešne vytvorené z kôry, mladých kmeňov a z ihličia rôznych druhov *Taxus*. Pojem kalus predstavuje neorganizovanú, množiacu sa masu nediferencovaných buniek. Prenosom kalusov do vhodného tekutého živného média sa dajú vytvoriť bunkové suspenzie. Suspenzné kultúry sú výhodné, pretože v takomto systéme sa ľahšie ovplyvňujú podmienky rastu a produkcie látok⁵. Na syntézu taxánov sa využívajú rovnako aj diferencované bunkové kultúry obsahujúce organizované pletivá, v ktorých sú zachované interakcie medzi bunkami, pletivami a orgánmi, podobné tým v intaktných rastlinách. Diferencované bunkové kultúry môžu byť výhodné z hľadiska tvorby sekundárnych metabolitov, pretože tu existuje predpoklad zachovania dočasnej schopnosti priestorovej expresie génov, esenciál-

Tabuľka IV

Mikroorganizmy produkujúce taxány

Metabolit	Produkčný mikroorganizmus	Hostiteľský organizmus	
Taxány	<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i> ⁴⁴	
	<i>Pestalotiopsis quepinii</i>	<i>Wollemia nobilis</i> ⁴⁵	
	<i>Pestalotia heterocornis</i>	<i>Taxus</i> sp. ⁴⁵	
	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹	
	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ⁴⁴	
	<i>Pestalotia bicilia</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹	
	<i>Pithomyces</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹	
	Paclitaxel	<i>Sporormia minima</i>	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
		<i>Trichothecium</i> sp.	<i>Taxus</i> sp. ¹⁹
		<i>Tubercularia</i> sp.	<i>Taxus mairei</i> ^{17,46}
<i>Mucor rouxianus</i>		<i>Taxus chinensis</i> ⁴⁹	
<i>Monochaetia</i> sp.		<i>Taxus</i> sp. ¹⁹	
<i>Nodulisporium sylviforme</i>		<i>Taxus brevifolia</i> ⁴⁸	
<i>Seimatoantlerium tepuiense</i>		<i>Maguireothamnus Speciosus</i> ⁴⁶	
<i>Sporormia minima</i>		<i>Taxus</i> sp. ⁴⁶	
<i>Trichothecium</i> sp.		<i>Taxus wallichiana</i> ⁴⁶	
<i>Corylus avellana</i>		<i>Taxus wallichiana</i> ⁴⁶	
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallichiana</i> ³⁵		
<i>Ozonium</i> sp.	<i>Taxus chinensis</i>		
	<i>Taxus yunnanensis</i> ⁴⁷		
	<i>Taxus chinensis</i> var. <i>Mairei</i> ⁵⁰		
<i>Fusarium mairei</i>	<i>Terminalia arjuna</i> ⁵¹		
<i>Pestalotiopsis terminaliae</i>	<i>Taxus</i> sp. ⁵²		
<i>Nodulisporium sylviform</i>	<i>Citrus medica</i> ⁵³		
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Taxus celebica</i> ⁵⁴		
<i>Fusarium solani</i>	<i>Wrightia tinctoria</i> ⁵⁵		
<i>Phyllosticta tabernaemontanae</i>	<i>Terminalia arjuna</i> ⁵⁶		
<i>Chaetomella raphigera</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i> ⁵⁷		
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Podocarpus</i> ⁵⁸		
<i>Aspergillus fumigates</i>			

nych pre syntézu žiadaných látok⁴². Príklady produkcie taxánov explantátovými kultúrami *Taxus* sp. v baničkách, resp. v bioreaktoroch sú uvedené v tab. II a tab. III.

Mikrobiálna príprava taxánov

Dôkaz, že aj iný organizmus ako bunky *Taxus* sp. dokáže produkovať taxány, bol uskutočnený u mikroorganizmu *Taxomyces andreanae*, endofytickej huby, izolovanej z floému *Taxus brevifolia*. Huba patrí do triedy *Hyphomycetes* (pododdelenie *Deuteromycotina*) a je schopná syntetizovať taxánové metabolity kultiváciou na semisynetickom kvapalnom médiu. Výťažky boli pôvodne veľmi malé, 25–50 ng l⁻¹ (cit.⁴⁴).

Súčasnne poznatky naznačujú možnosť horizontálneho transferu génov zodpovedajúcich za tvorbu taxánov, ku ktorému môže dochádzať medzi jednotlivými druhmi *Taxus* sp. i medzi nimi a hosťujúcimi endofytmi. Prenos genetickej informácie súvisí pravdepodobne s tým, že niektoré mikroorganizmy rastlín *Taxus* sp. tvoria taxány, aby mohli prežiť v pletivách týchto ihličnanov³⁵. Jednoznačným dôkazom tohoto tvrdenia bolo objavenie endofyту *Pestalotiopsis microspora*. Bol potvrdený jeho výskyt v istom druhu *Taxus*, z ktorého bol získaný aj produkčný kmeň *Taxomyces andreanae*. Rod *Pestalotiopsis* je zrejme geneticky veľmi flexibilná skupina mikroorganizmov. Je to evidentné tak zo značnej variabilnosti v tvorbe produktov, ako aj z ich kultivačných charakteristík⁷. Okrem uvedených mikroorganizmov ako producentov taxánov je už známych viacero ďalších, ktorých prehľad obsahuje tab. IV.

4. Záver

Rastliny produkujú široké spektrum chemických látok, ktoré majú veľký ekonomický význam. Známych je takmer sto tisíc zlúčenín rastlinného pôvodu, pričom najväčšiu skupinu tvoria terpenoidy zahŕňajúce viac ako jednu tretinu všetkých poznaných látok. Najúspešnejšie prírodné liečivá s protinádorovým účinkom posledných rokov sú rastlinné fytochemikálie paclitaxel a kamptotecín. Objemovo produkcia týchto rastlinných látok pre farmaceutický priemysel je nízka. Ide o kilogramové až sto kilogramové množstvá. Cena týchto produktov nie je stála, závisí od rôznych činiteľov, ako sú klimatické i pestovateľské podmienky a je veľmi vysoká. To vedie k zvýšenému záujmu vyvíjať biotechnologické procesy pre priemyselnú produkciu týchto liečiv. Existujú viaceré možnosti pre biotechnologickú produkciu konkrétne explantátové kultúry rastlín, transgénne mikroorganizmy a endofytické a epifytické mikroorganizmy. Možnosť riešiť produkciu bioaktívnych látok rastlín mikroorganizmami je zvlášť perspektívna, nakoľko kultivácia mikroorganizmov je jednoduchšia a výhodnejšia v porovnaní s pestovaním vyšších rastlín, resp. s využitím explantátových kultúr alebo chemickej semisyntézy, ktorá zatiaľ dominuje v priemyselnom merítku.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja SR v rámci projektu Zmluvy č. APVV-20-014105 a Grantovou agentúrou VEGA 1/0747/08.

LITERATÚRA

1. Yuan H., Miao J., Du Y., You J., Hu F., Zeng S.: Int. J. Pharm. 348, 137 (2008).
2. Singla A. K., Garg A., Aggar W.: Int. J. Pharm. 235, 179 (2001).
3. Tabata H.: Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 7, 1 (2004).
4. Theodoridis G., Laskaris G., Jong C. F., Hofte A. P. J., Verpoorte R.: J. Chromatogr. 802, 297 (1998).
5. Ramesh N. P.: Ann. Rev. Microbiol. 98, 361 (1998).
6. Estes R., Vogel N., Mack D., McLeod R.: Antimicrob. Agents Chemother. 8, 2036 (1998).
7. Li J., Stobel G., Sidhu R., Hess W. M., Ford E. J.: Microbiology 142, 2223 (1996).
8. Schrijvers D., Vermorken J. B.: Oncology 5, 199 (2000).
9. Nicoletti M. I., Colombo T., Rossi C., Monardo C., Stura S., Zucchetti M., Riva A., Morazzoni P., Donati M. B., Bombardeli E., D'incalci M., Giavazzi R.: Cancer Res. 60, 842 (2000).
10. Figgitt D. P., Wiseman L. R.: Drugs 59, 621 (2000).
11. Miller V. A., Kris M. G.: Semin. Oncol. 27, 3 (2000).
12. Yang L. X., Wang H. J., Holton R. A.: Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 46, 159 (2000).
13. Bajorin D. F.: Oncology 14, 43 (2000).
14. <http://www.bristol-myers-squibb.cz>, stiahnuté 8.2.2008.
15. Vadgama J. V., Wu Y., Shen D., Hsia S., Block J.: Anticancer. Res. 20, 1391 (2000).
16. Küpeli E., Erdemoglu N., Yesilada E., Sener B.: J. Ethnopharmacol. 89, 265 (2003).
17. Fuchs D. A., Johnson, R. K.: Cancer Treat. Rep. 62, 1219 (1978).
18. Kingston D. G. I.: J. Nat. Prod. 63, 726 (2000).
19. Wang M., Cornett B., Nettles J., Liotta D. C., Snyder J. P.: J. Org. Chem. 65, 1059 (2000).
20. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.: *Molecular Biology of The Cells*. New York & London, Garland Publishing, Inc. 1983.
21. Sharma S., Ganesh T., Kingston D. G. I., Bane S.: Anal. Biochem. 360, 56 (2007).
22. Shimoda K., Hamada H., Hamada H.: Tetrahedron Lett. 49, 601 (2008).
23. Shaffer S. A., Baker-Lee C., Kennedy J., Shun Lai M., de Vries P., Buhler K., Singer J. W.: Cancer Chemother. Pharmacol. 59, 37 (2007).
24. Ojima I., Das M.: J. Nat. Prod. 72, 554 (2009).
25. Ojima I., Chen J., Sun L., Borella C. P., Wang T., Miller M. L., Lin S., Geng X., Kuznetsova L., Qu C., Gallager D., Zhao X., Zanardi I., Xia S., Horwitz S. B., Mallen-St Clair J., Guerriero J. L., Bar-Sagi D., Veith J. M., Pera P., Bernacki R. J.: J. Med. Chem. 51, 3203 (2008).

26. Patil Y., Sadhukha T., Ma L., Panyam J.: *J. Controlled Release* 136, 21 (2009).
27. Guo W., Johnson J. L., Khan S., Ahmad A., Ahmad I.: *Anal. Biochem.* 336, 213 (2005).
28. Shikanov A., Vaisman B., Shikanov S., Domb A. J.: *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v tisku. DOI: 10.1002/jbm.a.32429 (2009).
29. Jennewein S., Wildung M. R., Chau M., Walker K., Croteau R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 9149 (2004).
30. Croteau R., Ketchum R. E. B., Long R. M., Wildung K. R., Wildung M. R.: *Phytochem. Rev.* 5, 75 (2006).
31. Williams D. C., Wildung M. R., Jin A. Q., Dalal D., Oliver J. S., Coates R. M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 137 (2000).
32. Chau M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 427, 48 (2004).
33. Fang J., Ewald D.: *Protein Expression Purif.* 35, 17 (2004).
34. Nims E., Dubois C. P., Roberts S. C., Walker E. L.: *Metab. Eng.* 8, 385 (2006).
35. Strobel G., Yang X., Sears J., Kramer R., Sidhu R. S., Hess W. M.: *Microbiology* 142, 435 (1996).
36. van Rozendaal E. L., Lelyveld G. P., van Beck T. A.: *Phytochemistry* 53, 383 (2000).
37. Bala S., Uniyal G. C., Chattopadhyay S. K., Tripathi V., Sashidhara K. V., Kulshrestha M., Sharma R. P., Jain S. P., Kukreja A. K., Kumar S.: *J. Chromatogr.* 858, 239 (1999).
38. Zaks A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 130 (2001).
39. Shen Y., Lo K. L., Lin C. L., Chakraborty R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 4493 (2003).
40. Ketchum R. E. B., Croteau R.: *Biotechnol. Bioeng.* 62, 97 (1998).
41. Ganesh T., Norris A., Sharma S., Bane S., Alcaraz A. A., Snyder, J. P., Kingstona D. G. I.: *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3447 (2006).
42. Fett-Neto A. G., Zhang W. Y., DiCosmo F.: *Biotechnol. Bioeng.* 44, 966 (1994).
43. Zhong J. J.: *J. Biosci. Bioeng.* 94, 591(2002).
44. Stierle A., Strobel G., Stierle D.: *Science* 260, 214 (1993).
45. Noh M. J., Yang J. G., Kim K. S., Yoon Y. M., Kang K. A., Shim S. B., Park H. J.: *Biotechnol. Bioeng.* 64, 620 (1999).
46. Strobel G., Daisy B.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 491.
47. Guo B. H., Kai G. Y., Jin H. B., Tang K. X.: *Afr. J. Biotechnol.* 5, 15 (2006).
48. Yuan J., Jian-Nan B., Bing Y., Xu-Dong Z.: *Chin. J. Biotechnol.* 22, 1 (2006).
49. Miao Z., Wang Y., Yu X., Guo B., Tang K.: *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 45, 92 (2009).
50. Li Y. C., Tao W. Y., Cheng L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 233 (2009).
51. Gangadevi V., Muthumary J.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 52, 9 (2009).
52. Zhao K., Ping W., Zhang L., Liu J., Lin Y., Jin T., Zhou D.: *Sci. China C. Life Sci.* 51, 222 (2008).
53. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Biosci. Bioeng.* 106, 103 (2008).
54. Chakravarthi B. V., Das P., Surendranath K., Karande A. A., Jayabaskaran C.: *J. Biosci.* 33, 259 (2008).
55. Kumaran R. S., Muthumary J., Hur B. K.: *J. Microbiol.* 47, 40 (2009).
56. Gangadevi V., Muthumary J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 52, 2 (2009).
57. Gangadevi V., Murugan M., Muthumary J.: *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 24, 1433 (2008).
58. Sun D., Ran X., Wang J.: *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 48, 589 (2008).

M. Maruna, M. Šturdíková, and P. Ondřejíčková
(Institute of Biotechnology and Food Science, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava): **Natural Anticancer Taxane Compounds**

Paclitaxel is a valuable plant drug produced by *Taxus* species, showing anticancer activity in various cancer types. Its action consists in preventing depolymerization of tubulin in cell division. Unfortunately, its isolation from the bark of slow-growing yew trees is limited. Although paclitaxel has been totally synthesized, its production currently depends, completely or in part, on supply of *Taxus* sp. Plant cell cultures, endophytic and epiphytic microorganisms as well as chemical and biotechnological synthesis are currently investigated for the production of taxanes (paclitaxel and docetaxel).