

NORGE

[B] (11) UTLEGNINGSSKRIFT Nr. 129051



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

(51) Int. Cl. C 12 d 13/06

(52) Kl. 6b-16/03

(21) Patentsøknad nr. 2 3834/69

(22) Inngitt 26.9.1969

(23) Løpedag 26.9.1969

(41) Søknaden alment tilgjengelig fra 31.3.1970

(44) Søknaden utlagt og
utlegningsskrift utgitt 18.2.1974

(30) Prioritet begjært fra: 27.9.1968 USA,
nr. 763408

-
- (71)(73) MERCK & CO., Inc.,
126 East Lincoln Avenue,
Rahway, N.J., USA.
- (72) Jerome Birnbaum, 64 Millay Road,
Morganville, N.J., USA.
- (74) Siv.ing. Erling Quande.
- (54) Fremgangsmåte ved fremstilling av
dobbelstrengt ribonucleinsyre.

Foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte ved fremstilling av dobbelstrengt ribonucleinsyre fremstilt av Escherichia coli-celler infisert med MU-9-mutanten av MS2-colifag.

I henhold til foreliggende oppfinnelse har det vist seg at produktiviteten av DS-RNA i forhold til mengden av E. coli kan økes. Dette betyr at en større mengde av DS-RNA kan fåes fra det samme antall E. coli-celler eller alternativt at den samme mengde DS-RNA frembringes av færre E. coli-celler enn det som tidligere var nødvendig. Dette har den ytterligere fordel at det letter isoleringen av DS-RNA på grunn av dens større konsentrasjon i dyrkningsmediet.

Ved utførelse av foreliggende oppfinnelse kan E. coli dyrkes i et hvilket som helst kjent kulturmedium som underholder dets

vekst, og representative for disse er medier inneholdende trypton og/eller maisstøpvæske. For å oppnå mere effektiv anvendelse av kulturmediet bør *E. coli* først tillates å oppnå en betraktelig vekst, nemlig over 5×10^7 celler pr. ml buljong, og fortrinnsvis 5×10^8 celler pr. ml, men et større antall celler kan anvendes. På dette tidspunkt tilsettes MU-9 slik at der er minst tre til tredve, men fortrinnsvis seks infiserende viruspartikler for hver enkelt bakterie. Dyrkningen fortsettes slik at *E. coli* blir fullt infisert.

Foreliggende oppfinnelse øker den spesifikke produktivitet (mg DS-RNA/g tørre celler) ved å inhibere veksten av *E. coli* (etter infeksjon med viruset) uten å påvirke mengden av produsert DS-RNA. Dette oppnåes ved å tilsette vekstinhiberende antibiotica til fermenteringsbuljongen på et spesielt tidspunkt etter infeksjonen. Den virkelige mekanisme for å øke den spesifikke produktivitet er å stanse veksten av *E. coli*-celler i tryptonmediet uten å påvirke syntesen av DS-RNA. Dessuten var der i maisstøpvæskemedium en direkte stimulering av DS-RNA-syntesen samtidig med en reduksjon i cellevekst.

De antibiotica som anvendes ved utførelse av foreliggende oppfinnelse, er slike som inhiberer proteinsyntese, og fortrinnsvis streptomycin, oxytetracyclin eller kloramfenicol. De tilsettes til dyrkningsmediet 45 til 120 minutter etter infisering. Antibioticumet anvendes i en mengde fra 5 til 200 microgram, fortrinnsvis 50 til 100 microgram, pr. ml dyrkningskultur. I alminnelighet bør antibioticumet tilsettes før 90 minutter etter infeksjonstidspunktet.

Skjønt de beste resultater sees å inntreffe hvis kulturmediet er maisstøpvæske, fåes også den økede spesifikke produktivitet ifølge oppfinnelsen med vanlig kjente kulturmedier som de som inneholder trypton. Den økede spesifikke produktivitet synes å være uavhengig av det spesielle kulturmedium, men det synes at med maisstøpvæske fåes den med eller uten vekstinhivering av *E. coli*-cellene. Med trypton og lignende medier fåes den økede spesifikke produktivitet bare når veksten av *E. coli* inhiberes.

En ytterligere fordel som oppnåes ved antibioticumtilsetningen, er at den nedsetter sannsynligheten for tilbakeføring av

mutanten MU-9 til MS2. Ved de tidligere metoder for DS-RNA-fermentering ble noe av mutantviruset MU-9 tilbakedannet til villtypen av virus MS2. Denne tilbakeføring er uønsket da den kan føre til lyse av *E. coli*-cellene og bevirke tap av noe DS-RNA i mediet. Anvendelsen av et antibioticum i både trypton- og maisstøpvæskemediene forhindrer utviklingen av uønskede MS2-fag. Anvendelsen av antibioticumet har således den ytterligere fordel at den nedsetter utviklingen av revertanter.

Eksempel I

E. coli ble dyrket og opprettholdt på trypton-agar av følgende sammensetning i g/l vann: trypton 10, gjærekstrakt 1,0, dextrose 1,0, natriumklorid 8,0, calciumklorid 0,22 og agar 15. Inoculumceller ble fremstilt ved dyrkning i 16 timer ved 37°C i det samme medium uten agar. Disse celler ble anvendt for å inoculere flere identiske satser av tryptonkulturmediet og inkubert ved 37°C på en roterende rysteanordning for å lufte de voksende celler. Da celletettheten nådde 5×10^8 -celler pr. ml buljong, ble MU-9 virus tilsatt slik at der var 6 infiserende viruspartikler for hver enkelt bakterie. Inkuberingen ble så fortsatt ved 37°C.

På forskjellige tidspunkter etter infeksjon ble kloramfenicol tilsatt (unntagen til kontrollsatsen), og 300 minutter etter infeksjon ble hver sats analysert på DS-RNA i forhold til tørrvekten av *E. coli*-cellene. Resultatene fremgår av tabell 1.

129051

4

Tabell 1

Virkning av kloramfenicol på veksten
og den dobbelstrengede RNA-syntese av
E. coli infisert med MU-9-bakteriofag.

Tilsetningstid for kloramfeni- col efter in- feksjon	Kloramfenicol tilsatt i en mengde av 50 µg/l					
	Vekst		Dobbelstrengt RNA			
	(tørrvekt)					
	mg/ml	% av kontroll	mg/l	% av kontroll	mg/g	% av kontroll
Ikke tilsatt (kontroll)	0,52	100	49,5	100	95,2	100
0	0,14	27	3,80	8	27,2	29
15 min.	0,18	35	4,45	9	24,8	26
30 "	0,21	40	4,42	9	21,1	22
45 "	0,27	52	37,9	77	140	147
60 "	0,34	65	50,0	101	147	154
90 "	0,41	79	49,5	100	120	126
120 "	0,45	87	47,5	96	106	111

Kloramfenicol tilsatt i en mengde av 100 µg/ml						
Ikke tilsatt (Kontroll)	0,64	100	28,2	100	44,1	100
0	0,26	41	2,07	7	7,95	18
15 "	0,28	44	2,86	10	10,0	23
30 "	0,37	58	13,0	46	35,3	80
45 "	0,42	66	25,2	90	60,0	136
60 "	0,45	70	25,9	92	57,6	131
90 "	0,50	78	29,0	103	58,1	132

Tabell 1 viser at når antibioticumet ble tilsatt 0 - 30 minutter etter infeksjon var der en betydelig inhibering av vekst, men der inntrådte også en alvorlig inhibering av DS-RNA-syntesen. Når antibioticumet ble tilsatt 45 - 60 minutter etter infeksjon, ble veksten fremdeles inhibert, men DS-RNA-syntesen (mg/l) var upåvirket. Den spesifikke produktivitet (mg/g tørre celler) øket imidlertid 45 - 54% i et forsøk og 31 - 36% i det annet. I tryptonbuljong var den samlede DS-RNA som ble dannet (mg/l) i kolbene tilsatt antibioticumet ekvivalent innen forsøksfeilen med den fremstilt av ubehandlede kontrollceller. Dette viser at antibioticumet øket spesifikke produktivitet i tryptonbuljongen men inhiberte veksten uten å påvirke DS-RNA-syntesen.

Eksempel II

Frengangsmåten i eksempel I ble fulgt under anvendelse av oxytetracyclin og lignende resultater ble erholdt som vist i tabell 2.

Tabell 2

Virkning av oxytetracyclin på vekst og dobbelstrenget RNA-syntese av E. coli infisert med MU-9 bakteriofag.

Tilsetningstid for oxytetra- cyclin efter infeksjon	Oxytetracyclin tilsatt i en mengde av 50 µg/ml					
	Vekst (tørrvekt)		Dobbelstrenget RNA			
	mg/ml	% av kontroll	mg/l	% av kontroll	mg/g celler	% av kontroll
Ikke tilsatt (Kontroll)	0,54	100	39,7	100	73,5	100
0	0,20	37	0,7	2	4,0	5
15 min.	0,28	52	4,2	11	15,0	20
30 "	0,36	67	25,1	6	69,8	95
45 "	0,42	78	39,7	100	90,0	122
60 "	0,45	83	49,0	123	109	148
90 "	0,44	81	40,0	100	90,9	123
120 "	0,43	80	35,5	89	85,0	115

Eksempel III

Frengangsmåten i eksempel I ble utført under anvendelse av streptomycin. Lignende resultater ble erholdt som vist av tabell 3.

Tabell 3

Virkning av streptomycin på vekst og dobbelstrenget RNA-syntese av E. coli infisert med MU-9 bakteriofag.

Tilsetningstid for strepto- mycin efter infeksjon	Streptomycin tilsatt i en mengde av 50 µg/ml					
	Vekst (tørrvekt)		Dobbelstrenget RNA			
	mg/ml	% av kontroll	mg/l	% av kontroll	mg/g celler	% av kontroll
Ikke tilsatt (Kontroll)	0,67	100	41,4	100	61,8	100
0	0,23	34	2,52	6	9,0	15
15 min.	0,34	51	3,10	8	9,1	15
30 "	0,35	52	6,52	16	18,7	30
45 "	0,46	69	27,6	67	60,0	97
60 "	0,52	78	46,2	112	89,0	145
90 "	0,56	84	42,7	103	76,4	122
120 "	0,56	84	42,7	103	76,4	122

Eksempel IV

E. coli ble tilsatt til hver av flere identiske satser av maisstøpvæske fremstilt som følger:

Rå maisstøpvæske ble fortynnet med et like stort volum vann, og fast natriumhydroxyd ble tilsatt inntil en pH på 7 var oppnådd. Denne oppløsning ble oppvarmet i 1 time ved 100°C, avkjølt, sentrifugert for å fjerne uoppløselig materiale, fortynnet 10 ganger med vann, oppvarmet til kokning, avkjølt og igjen sentrifugert for å fjerne eventuelt ytterligere uoppløselig materiale. Den endelige overstående væske ble anvendt som dyrkningsmedium for E. coli. E. coli-cellene ble inokulert i dette medium og ble inkubert ved 37°C under rystning.

På det tidspunkt da 1,28 mg (tørrvekt) celler pr. ml av kulturen var oppnådd, ble MU-9 bakteriofag tilsatt for å gi seks infiserende viruspartikler pr. bakterie, og inkuberingen ble fortsatt. På forskjellige tidspunkter etter infeksjonen ble streptomycin tilsatt (unntatt til kontrollsatsen), og etter 300 minutter etter infeksjon ble hver sats bestemt på DS-RNA i forhold til tørrvekten av E. coli-cellene. Resultatene fremgår av tabell 4.

Tabell 4

Virkning av streptomycin på vekst og dobbelstrengt RNA-syntese av E. coli infisert med MU-9 bakteriofag.

Tilsetningstid for streptomycin etter infeksjon	Streptomycin tilsatt i en mengde av 100 µg/ml					
	Vekst (tørrvekt)			Dobbelstrengt RNA		
	mg/ml	% av kontroll	mg/l	% av kontroll	mg/g celler	% av kontroll
Ikke tilsatt (Kontroll)	2,66	100	127	100	47,8	100
0	1,22	46	0	0	0	0
15 min.	2,21	83	0	0	0	0
30 "	2,60	98	0	0	0	0
45 "	1,79	67	7,8	6	4,4	10
60 "	2,24	84	14,9	12	6,7	14
90 "	2,56	96	187	147	73,5	153
120 "	2,72	102	193	152	70,9	148

Som i tryptonmediet inhiberte tilsetningen av antibioticumet tidlig i infeksjonen veksten og DS-RNA-syntesen. Tilsatt 90 - 120 minutter senere var der en 48 - 53% økning i spesifikk produktivitet (mg/g). I tabell 4 skyldtes imidlertid økningen en direkte virkning av streptomycin på DS-RNA-syntesen og ikke på vekten da tørrvekten av cellene ved høstning var lik den for kontrollprøvene.

Eksempel V

For å bestemme den relative virkning av forskjellige mengder streptomycin ble fremgangsmåten i eksempel IV utført ved å tilsette streptomycinet til identiske satser i alle tilfelle 90 minutter etter infisering. Resultatene av de varierende mengder streptomycin på DS-RNA-produksjonen er vist i tabell 5.

Tabell 5

Virkning av streptomycin på vekst og dobbelstrengt RNA-syntese av E. coli infisert med MU-9 bakteriofag.

Streptomycin tilsatt 90 min- utter etter infisering (µg/ml)	Vekst (tørrvekt)		Dobbelstrengt RNA			
	mg/l	% av kontroll	mg/l	% av kontroll	mg/g celler	% av kontroll
0	4,16	100	108	100	25,9	100
10	3,24	78	129	119	40,0	154
50	2,75	66	146	135	53,3	210
100	2,72	65	150	139	55,2	213

Tabell 5 viser at der var en inhibering av veksten samtidig med en direkte stimulering av DS-RNA-syntesen (mg/l). Resultatet var en 110 - 113% økning i spesifikk produktivitet for infiserte kulturer som fikk henholdsvis 50 og 100 µg/ml streptomycin. I maisstøpmediet øker således antibioticumet produktiviteten ved enten å senke veksten etter infeksjon eller ved direkte å stimulere syntesen av DS-RNA.

Eksempel VI

Fremgangsmåten i eksempel IV ble utført for å bestemme om en tidlig høstningstid var mulig. Den ble duplisert og høstet 180 minutter og 300 minutter etter infeksjon, og resultatene er vist i tabell 6.

129051

8

Tabell 6

Virkningen av streptomycin og høstnings-
tiden på dobbelstrenget RNA-syntese av
E. coli infisert med MU-9 bakteriofag.

Høstningstid etter infeksjon	Streptomycin tilsatt 90 min. etter infeksjon µg/ml	Dobbelstrenget RNA			
		mg/l	% av kontroll	mg/g celler	% av kontroll
180 min.	100	242	109	96,9	136
180 "	0 (kontroll)	223	100	71,0	100
300 min.	100	208	118	93,0	141
300 "	0	177	100	65,8	100

Tabell 6 viser at der er ingen grunn til å vente 300 minutter før høstning, idet 180 minutter etter infeksjon synes å gi noe bedre resultater. I dette forsøk var der bare en liten (9 - 18%) direkte stimulering på DS-RNA-syntesen og en 36 - 41% økning i spesifikk produktivitet. En høstningstid på 180 minutter synes bedre enn 300 minutter fordi den samlede mengde DS-RNA dannet (mg/l) var høyere på dette tidligere tidspunkt.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte ved fremstilling av dobbelstrenget ribonucleinsyre hvor Escherichia coli dyrkes i et næringsmedium, idet der under veksten infiseres med MU-9-mutanten av MS2 colifag, k a r a k t e r i s e r t v e d at der 45 - 120 minutter etter infeksjonen tilsettes et antibioticum av den type som inhiberer syntese av protein.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at der som antibioticum anvendes kloramfenicol, oxytetracyclin eller streptomycin.

(56) Anførte publikasjoner: Ingen.