

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012136449/10, 19.01.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
26.01.2010 JP 2010-014727

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2014 Бюл. № 7

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 27.08.2012(86) Заявка РСТ:
JP 2011/050851 (19.01.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/093185 (04.08.2011)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО
"Юридическая фирма Городиский и Партнеры"

(71) Заявитель(и):

МЕЙДЗИ СЕЙКА ФАРМА КО., ЛТД. (JP)

(72) Автор(ы):

АНДЗАИ Хироюки (JP),
ЯМАМОТО Кентаро (JP),
ОЯМА Кадзухико (JP),
ЦУТИДА Марико (JP),
ГОТО Кимихико (JP),
МИТОМИ Масааки (JP)(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИРИПИРОПЕНА**

(57) Формула изобретения

1. Способ получения пирипиропена А, характеризующийся культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один полинуклеотид из (I)-(III) ниже или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с пирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен О:

(I) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей из (a)-(d) ниже:

(a) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:266,

(b) нуклеотидная последовательность, способная в жестких условиях гибридизоваться с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:266, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:266,

(c) нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:266, в которой один или более нуклеотидов удалены, замещены, вставлены или добавлены, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:266, и

(d) нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:266 и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:266;

(II) выделенный полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:267-275, или по существу эквивалентную ей аминокислотную последовательность;

(III) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей из (1)-(4) ниже:

(1) нуклеотидная последовательность из (a)-(i) ниже:

(a) нуклеотидная последовательность от положения 3342 до положения 5158 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(b) нуклеотидная последовательность от положения 5382 до положения 12777 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(c) нуклеотидная последовательность от положения 13266 до положения 15144 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(d) нуклеотидная последовательность от положения 16220 до положения 18018 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(e) нуклеотидная последовательность от положения 18506 до положения 19296 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(f) нуклеотидная последовательность от положения 19779 до положения 21389 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(g) нуклеотидная последовательность от положения 21793 до положения 22877 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(h) нуклеотидная последовательность от положения 23205 до положения 24773 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266, и

(i) нуклеотидная последовательность от положения 25824 до положения 27178 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266;

(2) нуклеотидная последовательность, способная гибридизоваться с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности из (1), в жестких условиях и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью;

(3) нуклеотидная последовательность полинуклеотида с нуклеотидной последовательностью из (1), в которой один или более нуклеотидов удалены, замещены, вставлены или добавлены, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью; и

(4) нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью из (1) и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью.

2. Способ получения пирипиropена А по п.1, характеризующий культивированием микроорганизма, содержащего один или более векторов, выбранных из группы, состоящей из плазмид рСС1-PP1, рPP2, рPP3, рPP6, рPP7 и рPP9, с пирипиropеном Е и выделением пирипиropена А через пирипиropен О.

3. Способ получения пирипиropена А по п.1, характеризующий культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один полинуклеотид из (IV)-(V) ниже или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с пирипиropеном Е и выделением пирипиropена А через пирипиropен О:

(IV) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей, кодирующих, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:269, 270 и 275, или по существу эквивалентную ей аминокислотную последовательность;

(V) полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей из (1)-(4) ниже:

(1) нуклеотидная последовательность из (a)-(c) ниже:

(a) нуклеотидная последовательность от положения 13266 до положения 15144 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(b) нуклеотидная последовательность от положения 16220 до положения 18018 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266, и

(c) нуклеотидная последовательность от положения 25824 до положения 27178 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266;

(2) нуклеотидная последовательность, способная гибридизоваться с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности из (1), в жестких условиях и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью;

(3) нуклеотидная последовательность полинуклеотида с нуклеотидной последовательностью из (1), в которой один или более нуклеотидов удалены, замещены, вставлены или добавлены, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью;

(4) нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью из (1) и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью.

4. Способ получения пирипиропена А по п.2, характеризуемый культивированием микроорганизма, содержащего плазмиды рРР2, рРР3 и рРР9, с пирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен О.

5. Способ получения пирипиропена А, характеризуемый культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один из указанных полинуклеотидов из (I)-(III) по п.1 или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с деацетилпирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен Е и пирипиропен О.

6. Способ получения пирипиропена А по п.5, характеризуемый культивированием микроорганизма, содержащего один или более векторов, выбранных из группы, состоящей из плазмид рСС1-РР1, рРР2, рРР3, рРР6, рРР7 и рРР9, с деацетилпирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен Е и пирипиропен О.

7. Способ получения пирипиропена А по п.5, характеризуемый культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один из указанных полинуклеотидов из (VI) и (VII) ниже или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с деацетилпирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен Е и пирипиропен О:

(VI) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:269, 270, 274 и 275, или по существу эквивалентную ей аминокислотную последовательность;

(VII) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей из (1)-(4) ниже:

(1) нуклеотидная последовательность из (a)-(d) ниже:

(a) нуклеотидная последовательность от положения 13266 до положения 15144 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(b) нуклеотидная последовательность от положения 16220 до положения 18018 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(с) нуклеотидная последовательность от положения 23205 до положения 24773 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266, и

(d) нуклеотидная последовательность от положения 25824 до положения 27178 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266;

(2) нуклеотидная последовательность, способная гибридизоваться с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности из (1), в жестких условиях и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью;

(3) нуклеотидная последовательность полинуклеотида с нуклеотидной последовательностью из (1), в которой один или более нуклеотидов удалены, замещены, вставлены или добавлены, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью;

(4) нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью из (1) и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому каждой нуклеотидной последовательностью.

8. Способ получения пирипиропена А по п.6, характеризующий культивированием микроорганизма, содержащего плазмиды рРР2, рРР3, рРР7 и рРР9, с деацетилпирипиропеном Е и выделением пирипиропена А через пирипиропен Е и пирипиропен О.

9. Способ получения 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она, характеризующий культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один из указанных полинуклеотидов из (I)-(III) по п.1 или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с 4-оксо-6-(3-пиридил)-α-пироном и выделением 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она.

10. Способ получения 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она по п.9, характеризующий культивированием микроорганизма, содержащего один или более векторов, выбранных из группы, состоящей из плазмид рСС1-РР1, рРР2, рРР3, рРР6, рРР7 и рРР9, с 4-оксо-6-(3-пиридил)-α-пироном и выделением 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она.

11. Способ получения 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она по п.9, характеризующий культивированием микроорганизма, в который введен, по меньшей мере, один полинуклеотид из (VIII) и (IX) ниже или содержащий его/их рекомбинантный вектор, с 4-оксо-6-(3-пиридил)-α-пироном и выделением 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2Е,6Е)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она:

(VIII) выделенный полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотную последовательность SEQ ID NO:273 или по существу эквивалентную ей аминокислотную последовательность;

(IX) полинуклеотид, имеющий, по меньшей мере, одну нуклеотидную последовательность, выбранную из нуклеотидных последовательностей из (1)-(4) ниже:

(1) нуклеотидная последовательность от положения 21793 до положения 22877 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266;

(2) нуклеотидная последовательность, способная гибридизоваться с последовательностью, комплементарной нуклеотидной последовательности из (1), в жестких условиях и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью;

(3) нуклеотидная последовательность полинуклеотида с нуклеотидной последовательностью из (1), в которой один или более нуклеотидов удалены, замещены, вставлены или добавлены, и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью;

(4) нуклеотидная последовательность, по меньшей мере, на 90% идентичная полинуклеотиду с нуклеотидной последовательностью из (1) и кодирующая белок, по существу эквивалентный белку, кодируемому нуклеотидной последовательностью.

12. Способ получения 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2E,6E)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она по п.11, характеризующий культивированием микроорганизма, содержащего плазмиду рРР6, с 4-оксо-6-(3-пиридил)- α -пироном и выделением 4-гидрокси-6-(пиридин-3-ил)-3-((2E,6E)-3,7,11-триметилдодека-2,6,10-триенил)-2Н-пиран-2-она.

13. По меньшей мере один выделенный полинуклеотид из (I)-(III) по п.1.

14. Выделенный полинуклеотид по п.13, который выбран из следующих (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) и (h):

(a) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:266,

(b) полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 269, 270, 273, 274 и 275,

(c) полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу эквивалентную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 269, и кодирующий полипептид, обладающий гидроксилазной активностью,

(d) полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу эквивалентную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 270, и кодирующий полипептид, обладающий гидроксилазной активностью,

(e) полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу эквивалентную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 273, и кодирующий полипептид, обладающий пренилтрансферазной активностью,

(f) полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу эквивалентную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 274, и кодирующий полипептид, обладающий ацетилазной активностью,

(g) полинуклеотид, имеющий аминокислотную последовательность, по существу эквивалентную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 275, и кодирующий полипептид, обладающий ацетилазной активностью, и

(h) выделенный полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, выбранную из следующих (i), (ii), (iii), (iv) и (v):

(i) нуклеотидная последовательность от положения 13266 до положения 15144 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(ii) нуклеотидная последовательность от положения 16220 до положения 18018 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(iii) нуклеотидная последовательность от положения 21793 до положения 22877 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266,

(iv) нуклеотидная последовательность от положения 23205 до положения 24773 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266, и

(v) нуклеотидная последовательность от положения 25824 до положения 27178 нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO:266.

15. Полинуклеотид по п.14, где аминокислотные последовательности полипептидов, кодируемых полинуклеотидами из указанных (c), (d), (e), (f) и (g) по п.14, на 90% или более идентичны аминокислотным последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 269, 270, 273, 274 и 275, соответственно.

16. Рекомбинантный вектор, выбранный из группы, состоящей из плазмид рРР6,

рРР7 и рРР9.

17. Трансформант, содержащий один или более векторов, выбранных из группы, состоящей из плазмид рРР6, рРР7 и рРР9.

18. Применение указанного рекомбинантного вектора по п.16 для получения пирипиropена А и/или получения его промежуточного соединения.

19. Применение указанного трансформанта по п.17 получения пирипиropена А и/или получения его промежуточного соединения.

RU 201213649 A

RU 201213649 A