



SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[B] (11) KUULUTUSJULKAISU UTLÄGGNINGSSKRIFT

70925

C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 27 10 1986

(51) Kv.Ik.4/Int.Cl.4 C 12 P 7/42, C 07 C 59/43
C 07 D 309/30

(21) Patentihakemus — Patentansökning 823978

(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 19.11.82

(23) Alkupäivä — Giltighetsdag 19.11.82

(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 21.05.83

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 18.07.86

(86) Kv. hakemus — Int. ansökan

(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 20.11.81

Japani-Japan(JP) 186641/81 Toteennäytetty-Styrkt

(71) Sankyo Company Limited, 1-6, 3-Chome, Nihonbashi Honcho, Chuo-ku,
Tokyo, Japani-Japan(JP)

(72) Akira Terahara, Tokyo, Minoru Tanaka, Tokyo, Japani-Japan(JP)

(74) Forssén & Salomaa Oy

(54) Menetelmä 3-hydroksi-ML-236B-johdannaisien M-4 ja M-4' valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av 3-hydroxy-ML-236B-derivaten M-4 och M-4'

(57) Tiivistelmä

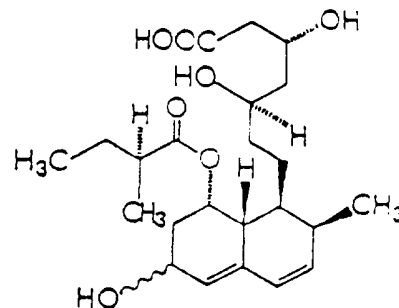
Kaavan (I):

yhdisteitä (missä  OH edustaa ryhmää  OH tai  OH), toisin sanoen (M-4)-karboksyylihappoa ja (M-4')-karboksyylihappoa, samoin kuin niiden farmaseuttisesti hyväksyttävissä suoloja ja estereitä sekä vastaavia suljetun renkaan omaavia laktoneja voidaan valmistaa saattamalla ML-236B-yhdiste kosketukseen suvun *Nocardia* mikro-organismien kanssa tai sen soluttoman, entsyymillä sisältävän uutteen kanssa, ja sitten, jos on tarpeen, viemällä saatu tuote yhteen tai useampaan seuraavista reaktioista: hydrolyysi, suolan muodostaminen, esteröinti ja laktonisointi. Saaduilla (M-4)- ja (M-4')-johdannaisilla on kyky inhiboida kolesterolin biosynteesiä ja ne ovat siksi arvokkaita terapiassa ja/tai veren runsasrasvaisuuden ja valtimonkoveutustaudin ennaltaehkäisyssä.

(57) Sammandrag

Föreningar med formeln (I)

(där  OH betecknar gruppen  OH eller  OH) med andra ord (M-4)-karboxylsyra och (M-4')-karboxylsyra, ävensom deras farmaceutiskt acceptabla salter och estrar samt motsvarande laktoner med sluten ring, kan framställas genom att sammanföra ML-236B-föreningen med en mikroorganism av släktet *Nocardia* eller ett cellfritt enzym innehållande extrakt av denna organism, och sedan vid behov föra den erhållna produkten till en eller flere av följande reaktioner: hydrolys, saltbildning, förestring och laktonisering. De erhållna (M-4)- och (M-4')-derivaten har förmåga att inhibera biosyntes av kolesterol och de är därför värdefulla vid terapi och/eller preventiv behandling av blodets hyperlipos och arteriosclerosis.



1 Menetelmä 3-hydroksi-ML-236B-johdannaisten M-4 ja M-4'
valmistamiseksi

Förfarande för framställning av 3-hydroxy-ML-236B-derivaten
M-4 och M-4'

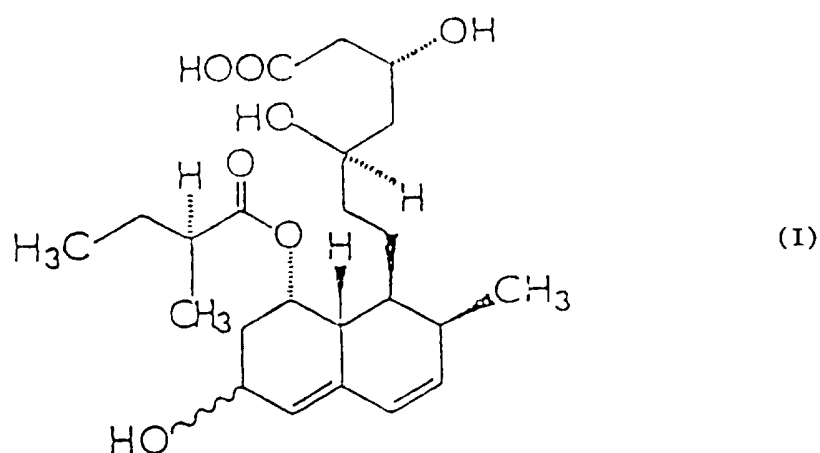
5

Tämä keksintö käsittää menetelmän kaavan (I) mukaisen lääkeaineena
käyttökelpoisen yhdisteen:

10

15

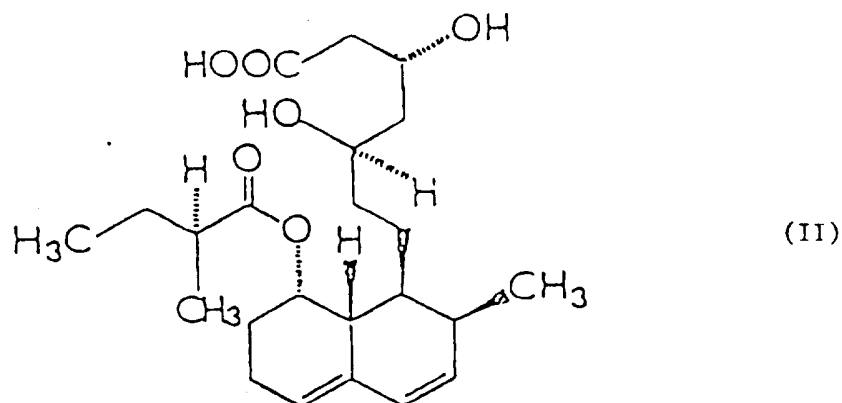
20



(missä ~~~~OH edustaa ryhmää ~~~~~~~OH~~ tai ~~~~~OH), sen farma-
seuttisesti hyväksyttävien suolojen ja esterien sekä vastaavien sulje-
tun renkaan omaavien laktonien valmistamiseksi, saattamalla yhdiste
25 ML-236B, joka on kaavan II mukainen

30

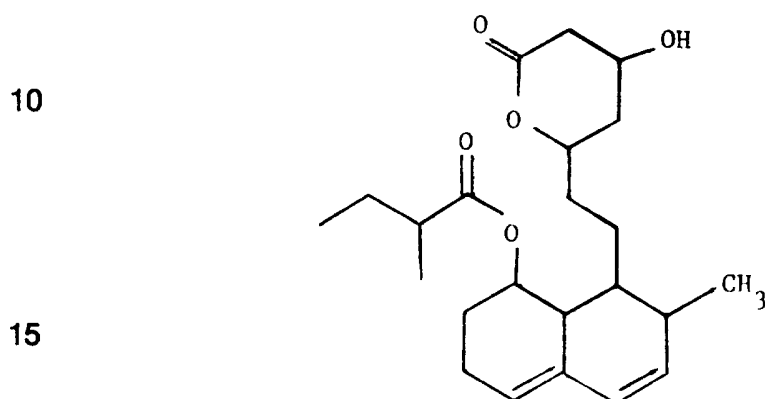
35



- 1 (ML-236B)-karboksyylihappo tai sen suola, kosketukseen hydroksylointient-syymin kanssa.

ML-236B, joka voi esiintyä happomuodossa ("ML-236B-karboksyylihappo")

- 5 tai laktonimuodossa ("ML-236B-laktoni"), on kuvattu GB patenttijul-kaisussa 1.453.425, ja, laktonimuodossaan, sillä on kaava:



- Myöhemmin GB patenttijulkaisussa 1.555.831 on kuvattu erilaisia
- 20 ML-236B:n suoloja ja estereitä. ML-236B:n ja sen suolojen ja estereiden havaittiin inhiboivan kolesterolin biosynteesiä kilpailemalla 3-hydroksi-3-metyyliglutaryylikoentsyymi-A:n reduktaasin kanssa, mikä on reaktio-nopeutta määräävä entsyymi kolesterolin biosynteesissä; näiden yhdistei-den havaittiin siten osoittavan erittäin merkittävää kykyä alentaa seeru-
25 min kolesterolitasoa.

- Myöhemmin tiettyjä 3-hydroksi-ML-236B:n johdannaisia eristettiin ML-236B-laktonin eläinten aineenvaihdunnan tuotteina, ja samanlaisia johdannaisia havaittiin tuotettavan ML-236B-laktonin ja -karboksyylihapon tai niiden
- 30 suolojen tai estereiden entsymaattisella hydroksyloinnilla, mikä oli saatu aikaan suvun Absidia, Cunninghamella, Syncephalastrum, Streptomyces, Mucor, Rhizopus, Zygorhynchus, Circinella, Actinomucor, Gongronella, Phycomyces, Mortierella, Pycnoporus ja Rhizoctonia mikro-organismeilla. A. Terahara ja M. Tanaka julkaisivat nämä menetelmät US-patentissa 4.346.227, jota
- 35 vastaava patenttihakemus jätettiin 5. heinäkuuta 1981, ja siten tuotettuja yhdisteitä kuvataan tuossa patenttihakemuksessa M-4:ksi, M-4':ksi, IsoM-4:-ksi ja IsoM-4':ksi. Näillä yhdisteillä havaittiin olevan kykyä inhiboida

1 kolesterolin biosynteesiä, mikä on vähintään verrannollinen itse
ML-236B:n inhibiointikyvyn kanssa ja mikä joissakin tapauksissa olennai-
sesti ylittää sen.

5 ML-236B:llä ja sen johdannaisilla käsittäen M-4- ja M-4'-yhdisteet on
siten terapeutista merkitystä veren hyperlipemian hoitamisessa ja val-
timonkovetustaudin ennaltaehkäisyssä.

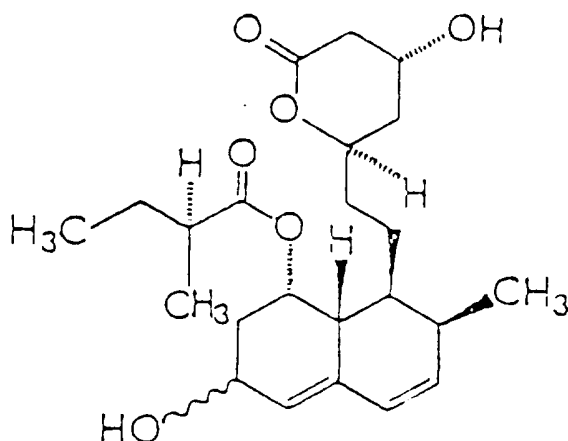
Tekniikan tasona mainitaan myös FI-patenttien 66.427 ja 67.231 sekä FI-
10 hakemuksen 802357 esittämät läheistä rakennetta olevat yhdisteet.

Me olemme nyt keksineet, että M-4:ä ja M-4':ä voidaan myös valmistaa
ML-236B:stä ja sen erilaisista johdannaisista käsittelemällä suvun
Nocardia mikro-organismissa tai sen soluttomalla, entsyymiä sisältävällä
15 uutteella. Suvun Nocardia mikro-organismien käytöllä on se etu verrat-
tuna US-patentissa 4.346.227 esitettyihin mikro-organismeihin nähden,
että substraattina käytettävää ML-236B-yhdistettä voi olla reaktioluok-
sesssa paljon suurempana konsentraationa kuin jos käytetään aiemman kal-
taisia mikro-organismeja. Tämä on kaikkein hämmästyttävintä, sillä
20 ML-236B-yhdisteiden on havaittu omaavan fungisidisia ja antibioottisia
ominaisuuksia.

Näin ollen tämä keksintö on tunnettu siitä, että hydroksylointientsyymi
on valmistettu suvun Nocardia mikro-organismissa; jos on tarpeellista,
25 altistamalla saatu tuote yhteen tai useampaan reaktioon, joka on hydro-
lyysi, suolan muodostus, esteröinti tai laktonisointi; ja eristämällä
tuote reaktioseoksesta.

Kaavan (I) yhdistettä, jossa  OH on  OH, kutsutaan
30 (M-4)-karboksyylihapoksi, ja vastaavat suolat ja esterit tunnetaan
(M-4)-karboksylaateina. Kaavan (I) yhdiste, missä  OH on
OH, lyhennetään (M-4')-karboksyylihapoksi, ja vastaavat suolat
ja esterit lyhennetään (M-4')-karboksylaateiksi.

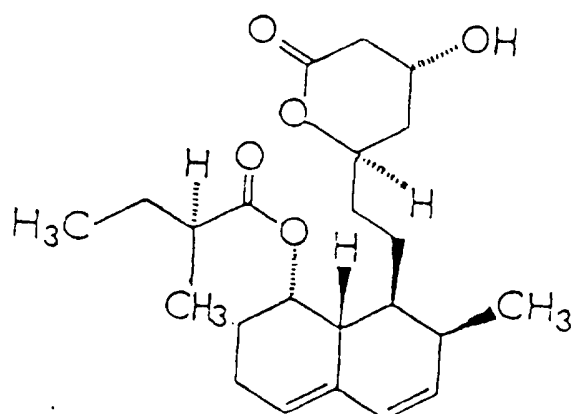
- 1 Suljetun renkaan omaavia laktoneja, jotka vastaavat kaavan (I) yhdisteitä, voidaan kuvata kaavalla (Ia):



15

missä OH edustaa ryhmää OH tai OH , ja ne tunnetaan vastaavasti (M-4)-laktonina ja (M-4')-laktonina.

- 16 Suljetun renkaan omaavaa laktonia, joka vastaa kaavan (II) ML-236B-
- 20 karboksyylihappoa, voidaan kuvata kaavalla (IIa):



35

ja se tunnetaan ML-236B-laktonina.

- 1 Suvun Nocardia parempina pidettyjä lajeja käytettäväksi tämän keksinnön menetelmässä ovat Nocardia autotrophica, Nocardia asteroides, Nocardia farcinica ja Nocardia coeliaca, erityisesti Nocardia autotrophica. Näistä lajeista seuraavia kantoja pidetään parempina:

5

Nocardia autotrophica FERM P-6181 (SANK 62781);
Nocardia autotrophica subsp. canberrica nov. FERM P-6182 (SANK 62881);
Nocardia autotrophica subsp. amethystina nov. FERM P-6183
 (SANK 62981);

- 10 Nocardia autotrophica IFO 12743 (SANK 91279);
Nocardia asteroides IFO 3424 (SANK 62065);
Nocardia farcinica ATCC 3318 (SANK 64265) ja
Nocardia coeliaca ATCC 17040 (SANK 63665).

- 15 Yllä mainituista suvuista Nocardia autotrophica IFO 12743, Nocardia asteroides IFO 3424, Nocardia farcinica ATCC 3318 ja Nocardia coeliaca ATCC 17040 tunnetaan kaikki lajeina, joita on vapaasti ja yleisesti saatavissa vastaavalta viljelmäkokoelmalta, so. the Institute for Fermentation, Osaka, Japani (IFO) tai the American Type
 20 Culture Collection, USA (ATCC), annetuilla talletusnumeroilla.

- Nocardia autotrophica kannat, joita merkitään talletusnumeroilla FERM P-6181, FERM P-6182 ja FERM P-6183, ovat kaikki tämän mikro-organismin uusia kantoja, jotka on hiljakkoin eristetty maa-aineksesta ja jotka on
 25 16. lokakuuta 1981 liitetty kokoelmaan Fermentation Research Institute:ssa, Ibaraki-Ken, Japani (FERM).

- Vastikään eristettyjen mikro-organismien morfologiset ja fysiologiset ominaisuudet määritettiin käyttäen tavanomaista väliainetta ja
 30 Shirlingin ja Gottlieb'in kuvaamia menetelmiä International Journal of Systematic Bacteriology 16, 313-340 (1966) yhdessä useiden lisätestien kanssa. Havaintoja viljelmästä tehtiin inkuboinnin jälkeen 28°C:ssa 2 viikkoa. Käytetyt värien nimet merkittiin "Guide to Colour Standard"-käsikirjan mukaan (Nippon Shikisai Kenkyusho:n, Tokio,
 35 Japani, julkaisema käsikirja). Viljelmien ominaisuuksia verrattiin aktinomysetaalien erilaisten tunnettujen Actinomycetes lajien ominaisuuksiin, joita Waksman kuvaa teoksessa "The Actinomycetes, Vol. 2", Shir-

- 1 ling ja Gottlieb julkaisussa "The ISP Report" ja joita kuvataan
 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8. painoksessa ja
 muussa viimeaikaisessa kirjallisuudessa, joka käsittelee suvun Nocar-
diaceae taksonomiaa. Uusia mikro-organismeja merkitään niiden FERM-
 5 talletusnumeroilla.

Taulukossa 1 on esitetty edellä mainittujen uusien mikro-organismien morfologisia ominaisuuksia.

10

TAULUKKO 1

15

20

25

	FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
Itiöketjun morfologia	RF	RF	RF
Haaroittuminen	vaatimaton	vaatimaton	vaatimaton
Fragmentoituminen	kyllä	kyllä	kyllä
Segmentoituneiden rihmojen (hyphae) pintarakenne (itiöt)	sileä, kiiltävä	sileä, kiiltävä	sileä, kiiltävä
Muut elimet	solmukoh- tia, pesä- kemäistä kasvustoa (tangles)	solmu- kohtia	ei

RF = Rectus Flexibilis

30

Kaikki uudet kannat osoittivat hyvää kasvua vaihtelevissa väliaineissa.

35

Kannalla FERM P-6181 oli valkoisia pintarihmastoja (aerial mycelia) vä-
 riltään kellanharmaasta vaalean kellanoranssiin kasvuston päällä. Tie-
 tyissä liuoksissa havaittiin vaalea, kellanruskea, liukoinen pigmentti,
 mutta vain vähäisessä määrin.

- 1 Kannalla FERM P-6182 oli ruskean valkoisesta vaalean kellanoranssiin värisiä pintarihmastoja harmahtavan kellanruskean kasvuston päällä. Mitään liukoista pigmenttiä ei havaittu.
- 5 Kannalla FERM P-6183 oli väriltään ruskean valkoisesta vaalean kellanoranssiin värinen kasvusto, ja violetinruskeita täpliä havaittiin, kun viljely edistyi. Rusehtavan harmaita pintarihmastoja oli mukana kaikkien väliaineiden päällä paitsi hiiva-mallas-väliaineella.
- 10 Viljelmien ominaisuudet 14. viljelypäivänä 28^oC:ssa eri väliaineissa on esitetty taulukossa 2. Taulukossa käytetyt lyhenteet ovat seuraavat:
G = kasvusto;
- 15 AM = pintarihmasto;
R = kääntöpuoli;
SP = liukoinen pigmentti.

20

25

30

35

TAULUKKO 2

	Väliaine		FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
5					
	Hiiva-	G	Erittäin hyvä,	Erittäin hyvä,	Erittäin hyvä,
	mallas-		vaalean kellan-	ruskea (6-4-1)	ruskean valkeasta
	agari		ruskea (6-7-9)		(2-9-8) harmah-
10	(ISP 2)				tavan punarus-
		AM	Runsas,	Runsas,	Jälkiä,
			valkoinen	rusehtavan	valkoinen
				valkoinen	
15		R	Kiilloton,	Ruskea (4-4-7)	Ruskean valkeasta
			kellanoranssi		(2-9-8) harmahta-
			(8-8-8)		van punaruskeaan
		SP	Kellanuskea	Ei lainkaan	(4-3-5)
20			(8-7-9)		Ei lainkaan
	Kaura-	G	Hyvä, vaalean	Erittäin hyvä,	Erittäin hyvä,
	jauho-		ruskea (2-8-9)	vaalean kellan-	tumman punaruskea
	agari			oranssi (2-9-9)	(4-3-4)
25	(ISP 3)				
		AM	Kohtalainen,	Runsas, vaalean	Kohtalainen, hju-
			valkea	kellanuskea	kan vaalean pu-
				(2-9-9)	nainen (2-8-4)
		R	Kellertävän	Vaalean kellan-	Ruskean violetti
30			ruskea (4-7-9)	ruskea (4-8-9)	(3-3-2)
		SP	Vaalean kellan-	Ei lainkaan	Ei lainkaan
			ruskea (4-8-9)		

1

TAULUKKO 2 (jatkuu)

5

10

15

20

25

30

35

Väliaine		FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
Tärkkelys/ epäorg. suola	G	Hyvä, keller- tävän harmaa (2-9-10)	Niukka, keller- tävän harmaa (1-9-10)	Erittäin hyvä, ruskean violetti (3-3-2)
- agari (ISP 4)	AM	Kohtalainen, valkoinen	Runsas, vaalean kellanoranssi (2-9-9)	Hyvä, kiiltävän ruskean harmaa (2-8-2)
	R	Vaalean keltai- nen (3-9-10)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)	Tumman punaruskea (4-3-4)
	SP	Ei lainkaan	Ei lainkaan	Ei lainkaan
Glyseriini/ asparagiini -agari (ISP 5)	G	Hyvä, vaalean ruskea (2-8-9)	Hyvä, harmahta- van kellan- ruskea (4-5-7)	Erittäin hyvä, vaalean ruskeasta (2-9-9) ruskean violettiin (3-3-2)
	AM	Runsas, valkoinen	Runsas, ruskean valkoinen (1-8-6)	Runsas, valkoinen
	R	Vaalean kellan- ruskea (6-8-9)	Ruskea (4-4-6)	Vaalean kellan- oranssista (2-9-9) harmahtavan puna- ruskeaan (4-3-6)
	SP	Vaalean kellan- ruskea (6-9-11)	Ei lainkaan	Ei lainkaan
Tyrosiini- agari (ISP 7)	G	Erittäin hyvä, vaalean keltai- sen oranssi (3-8-8)	Erittäin hyvä, harmahtavan kellanruskea (4-5-7)	Hyvä harmahtavan ruskea (4-6-6)
	AM	Runsas valkoinen	Runsas, ruskean valkoinen (2-9-7)	Jälkiä, valkoinen

TAULUKKO 2 (jatkuu)

	Väliaine	FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
5				
	R	Kellertävän harmaa (1-9-10)	Kirkkaan ruskea (6-5-7)	Vaalean kellan-oranssista (2-9-9) ruskeanviolettiin (3-3-2)
10	SP	Vaalean kellan-ruskea (6-7-9)	Ei lainkaan	Ei lainkaan
15	Sakkaroosi- G nitraatti- agari	Hyvä, vaalean kellanruskea (2-9-9)	Heikko, vaalean kellan-ruskea (2-9-9)	Heikko, vaalean kellan-oranssi (2-9-9)
	AM	Kohtalainen, valkoinen	Runsas, ruskean valkoisen (2-9-7)	Kohtalainen, valkoinen
	R	Kellertävän harmaa (1-9-10)	Ruskean valkoisen (1-9-6)	Vaalean kellan-oranssi (2-9-9)
20	SP	Ei lainkaan	Ei lainkaan	Ei lainkaan
25	Glukoosi/ G asparagiini- -agari	Erittäin hyvä, vaalean kellan-oranssi (2-9-9)	Hyvä, harmahtavan kellan-ruskea (4-5-7)	Erittäin hyvä, vaalean kellan-oranssista (2-9-9) ruskean violettiin (3-3-2)
	AM	Kohtalainen, valkoinen	Runsas, kiiltävän ruskean valkoinen (1-7-6)	Kohtalainen, valkoinen
30	R	Vaalean kellan-ruskea (4-8-9)	Harmahtavan punaruskea (4-3-6)	Vaalean kellan-oranssista (2-9-9) harmahtavan punaruskeaan (4-3-6)
35	SP	Vaalean kellan-ruskea (4-8-9)	Ei lainkaan	Ei lainkaan

1

TAULUKKO 2 (jatkuu)

	Väliaine	FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
5	Ravinto- agari	G Hyvä, keller- tävän harmaa (2-9-10)	Erittäin hyvä, vaalean kellan- ruskea (6-8-9)	Hyvä vaalean kel- lanoranssi (2-9-9)
10		AM Kohtalainen, valkoinen	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)	Jälkiä, valkoinen
		R Kellertävän harmaa (4-9-10)	Vaalean kellan- ruskea (6-8-9)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)
		SP Ei lainkaan	Ei lainkaan	Ei lainkaan
15	Vesi- agari	G Heikko, keller- tävän harmaa (1-9-10)	Heikko, väritön	Heikko, vaalean kellanoranssi (2-9-9)
20		AM Kohtalainen, valkoinen	Runsas, valkoinen	Kohtalainen, valkoinen
		R Kellertävän harmaa (1-9-10)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)
		SP Ei lainkaan	Ei lainkaan	Ei lainkaan
25	Peruna/ porkkana- uute -agari	G Heikko, keller- tävän harmaa (1-9-10)	Heikko, väritön	Heikko, vaalean kellanoranssi (2-9-9)
30		AM Kohtalainen valkoinen	Kohtalainen, valkoinen	Kohtalainen, valkoinen
		R Kellertävän harmaa (1-9-10)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)	Vaalean kellan- oranssi (2-9-9)
		SP Ei lainkaan	Ei lainkaan	Ei lainkaan

1 Uusien kantojen fysiologiset ominaisuudet on esitetty taulukossa 3. Tumman pigmentin muodostumiskoe tehtiin seuraavissa kolmessa väliaineessa:

- 5 Väliaine 1: Tryptoni-hiivauute-lihaliemi (ISP 1);
 Väliaine 2: Peptoni-hiivauute-rauta-agari (ISP 6);
 Väliaine 3: Tyrosiiniagari (ISP 7).

TAULUKKO 3

10

		FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
15	Nitraatin pelkistys	-	-	-
	Tärkkelyksen hydrolyysi	-	-	-
	Urean hajoaminen	+	-	+
	Lysotsyymien kestävyys	-	+	-
	Tumman pigmentin muodostus			
20	Väliaine 1	-	-	-
	Väliaine 2	-	-	-
	Väliaine 3	-	-	-
	Happojen tuottaminen			
	arabinoosista	+	-	+
25	ksyloosista	+	-	+
	raffinoosista	+	-	NG

- = negatiivinen;

30 + = positiivinen;

NG = ei kasvustoa.

Hiilihydraattien hyväksikäyttö uusilla kannoilla on esitetty taulukossa 4. Käytetty väliaine oli Pridham-Cottlieb-agaria (ISP 9), ja
 35 määrittäminen tehtiin viljelyn jälkeen 28°C:ssa 14 päivän ajan.

1

TAULUKKO 4

5		FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183
	D-glukoosi	+	+	+
	D-arabinoosi	+	-	+
	D-ksyloosi	+	-	+
10	D-fruktoosi	+	+	+
	L-ramnoosi	+	-	+
	Inositoli	+	+	+
	Sakkaroosi	+	-	-
	Raffinoosi	+	-	-
15	D-mannitoli	+	+	+
	Vertailu	-	-	-

+ = hyödynnetty;

20 + = hiukan hyödynnetty;

- = ei hyödynnetty.

Paperikromatografia-analyyseja tehtiin kunkin kolmen, uuden suvun hap-
 pohydrolyysituotteelle B. Beckerin et al. [Applied Microbiology, 13,
 25 236 (1965)] ja M.P. LeChevalier'n et al. [H. Prauset, "The Actino-
 mycetales", 311 (1970)] menetelmän mukaan. Meso-2,6-diaminopimeeli-
 happoa löydettiin soluseinistä, ja arabinoosia ja galaktoosia löydet-
 tiin koko solun sakkariinin aineosina, mikä siten varmistaa sen, että
 kullakin suvulla olivat solun osat tyyppiä IV-A.

30

Näiden taksonomisten tutkimusten tulokset osoittavat, että kaikki kan-
 nat kuuluvat sukuun Nocardia. Nocardian tunnetuista lajeista uusien
 kantojen ominaisuudet ovat lähimpänä Nocardia autotrophican ominaisuuks-
 35 ia International Journal of Systematic Bacteriology, 30, 337 (1980)
 paitsi ainoastaan niiden erojen kohdalla, jotka on esitetty taulukossa
 5. Taulukossa merkit ja lyhenteet ovat samoja kuin vastaavissa taulu-
 koissa 1-4 annetut.

1

TAULUKKO 5

5	Koe	FERM P-6181	FERM P-6182	FERM P-6183	<u>Nocardia</u> <u>autotrophica</u>
10	Kasvuston AM värit	valkoinen	valkoisesta vaalean kellan- oranssiin	valkoi- koisesta rusehta- van har- maaseen	valkoisesta vaalean keltaiseen
15	G	kellertävän harmaasta vaalean kel- lan oranssiin	harmahtavan kellan- ruskea	ruskean violetti	vaalean kel- taisesta kellertävän harmaaseen
	Urean hajoaminen	+	-	+	+
20	Kestävyys lysotsyymille	-	+	-	-
25	Happojen tuotto: arabinoosista ksyloosista raffinoosista	+	-	+	+
		+	-	+	+
		+	-	NC	-
30	Hyväksikäyttö: arabinoosi ksyloosi ramnoosi sakkarooosi raffinoosi	+	-	+	+
		+	-	+	+
		+	-	+	+
		+	-	-	+
		+	-	-	+

35 Kanta FERM P-6181 ja Nocardia autotrophica muistuttivat toisiaan morfo-
logisilta, kasvustollisilta ja fysiologisilta ominaisuuksiltaan, ja
siten pääteltiin, että tämä kanta kuului lajiin Nocardia autotrophica.

- 1 Kanta FERM P-6182 poikkesi Nocardia autotrophicasta urean hajottamisessa, kestävyudessa lysotsyymeille, happojen tuottamisessa hiilihydraateista ja hiilihydraattien hyväksikäytössä. Kuitenkaan nämä erot eivät ole riittäviä, jotta kanta FERM P-6182 tulisi käsittää uudeksi lajiksi;
- 5 sen tähden sitä pidetään Nocardia autotrophican uutena alalajina. Vastaavasti tämä kanta nimettiin Nocardia autotrophica subsp. canberrica subsp. nov.:ksi.

- Subsp. FERM P-6183 poikkesi Nocardia autotrophicasta kasvustonsa värissä
- 10 ja ramnoosin, sakkaroosin ja raffinoosin hyväksikäytössä. Samoin nämä erot eivät olleet riittäviä, jotta tämä kanta tulisi käsittää uudeksi lajiksi, ja siksi sitä pidetään Nocardia autotrophican alalajina. Se on nimetty Nocardia autotrophica subsp. amethystina subsp. nov.:ksi.

- 15 Suvun Nocardia erilaisista mikro-organismeista, joita voidaan käyttää keksinnön menetelmässä, me erityisesti pidämme parempana käyttää näitä kolmea uutta kantaa, toisin sanoen Nocardia autotrophica FERM P-6181, Nocardia autotrophica subsp. canberrica FERM P-6182 tai Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183.

- 20 Tämän keksinnön entsymaattinen hydroksylointiprosessi voidaan suorittaa saattamalla ML-236B-yhdiste kosketukseen sukuun Nocardia kuuluvan mikro-organismin kanssa tai sen soluttoman, entsyymiä sisältävän uutteen kanssa.

- 25 Tämän keksinnön prosessi suoritetaan mieluummin jollakin kolmesta tavasta:

- 30 (a) lisäämällä lähtöyhdistettä ML-236B viljelmän väliaineeseen muuntavan mikro-organismin viljelyn aikana, ja sitten jatkamalla viljelyä;

- (b) kokoamalla muuntavan mikro-organismin viljelmää, ja saattamalla kerätyt solut kosketukseen lähtöyhdisteen ML-236B kanssa; tai

- 35 (c) valmistamalla solutonta, entsyymiä sisältävää uutetta muuntavan mikro-organismin soluista, ja yhdistämällä tämä uute lähtöyhdisteen ML-236B kanssa.

- 1 Suvun Nocardia muuntavan mikro-organismin viljely voi tapahtua tavanomaisella tavalla tavanomaisessa viljelmän väliaineessa, joka sisältää ravintoaineita, jotka sellaisten mikro-organismien kanssa käytettäväksi hyvin tunnetaan. Siten, niinkuin hyvin tiedetään, sellainen
- 5 viljelmän väliaine sisältää assimiloituvan hiilen ja assimiloituvan typen lähteen ja usein epäorgaanisia suoloja. Esimerkit assimiloituvan hiilen lähteistä käsittävät glukoosin, sakkaroosin, tärkkelyksen, glyseriinin, hirssigelatiinin, melassit ja soijapapu öljyn. Esimerkit assimiloituvan typen lähteistä käsittävät soijapavun kuiva-aineen
- 10 (mikä käsittää karkeat ja hienot soijapapujauhot), vehnänalkion, liha-uutteet, peptonin, maissinliotusveden, kuivatun hiivan ja ammoniumsuolat, kuten ammoniumsulfaatin. Jos on tarpeen, voidaan myös epäorgaanisia suoloja, kuten natriumkloridia, kaliumkloridia, kalsiumkarbonaattia tai fosfaatteja, sisällyttää mukaan.

15

- Myös, jos halutaan, voidaan käyttää muita lisäaineita, jotka kykenevät edistämään hydroksylointientsyymien tuotantoa, sopivina kombinaatioina. Erityinen viljelytekniikka ei ole kriittinen keksinnön menetelmälle, ja mitä tahansa tavanomaisesti mikro-organismien viljelyyn käytettyä
- 20 tekniikkaa voidaan käyttää yhtäläisesti tämän keksinnön kanssa. Yleensä tietenkin käytettävä tekniikka valitaan ottamalla huomioon teollisen tehokkuus. Siten liuosviljelyä pidetään parempana, ja syväviljelymenetelmä on mukavin teolliselta näkökannalta.

- 25 Viljely suoritetaan tavallisesti aerobisissa olosuhteissa ja alueella 20-37°C olevassa lämpötilassa, vielä mieluummin 26-28°C:ssa.

- Menetelmä (a) toteutetaan lisäämällä lähtöyhdistettä ML-236B viljelyväliaineeseen viljelyn kuluessa. Viljelyn aikana täsmällinen kohta, jolloin lähtöyhdisteitä lisätään, vaihtelee riippuen viljelyvälineestä, väliaineseoksesta, viljelyväliaineen lämpötilasta ja muista tekijöistä, mutta se on mieluummin sinä aikana, jolloin mikro-organismin hydroksylointikapasiteetti alkaa lisääntyä, ja tämä on tavallisesti 2 tai
- 30 3 päivää mikro-organismin viljelyn aloittamisen jälkeen. Lisättävän
- 35 ML-236B-yhdisteen määrä on mieluummin 0,01-5,0 paino-% väliaineesta, vielä mieluummin 0,05-0,5, esim. 0,05-0,1, paino-%. ML-236B-yhdisteen lisäämisen jälkeen viljelyä jatketaan aerobisesti tavallisesti lämpö-

1 tilassa, joka on yllä esitettyjen rajojen sisällä. Viljelyä jatketaan tavallisesti 3-5 päivän ajan ML-236B-yhdisteen lisäämisen jälkeen.

Menetelmässä (b) mikro-organismin viljely tapahtuu ensin olosuhteissa, joissa saavutetaan maksimi hydroksylointikapasiteetissa; tämä kapasiteetti saavuttaa tavallisesti maksimin 4-5 päivän välillä viljelyn aloittamisen jälkeen, vaikka tämä ajanjakso on vaihteleva riippuen väliaineen luonteesta ja lämpötilasta, mikro-organismin lajista ja muista tekijöistä. Viljelmän hydroksylointikapasiteettia voidaan tark-
10 kailla ottamalla näytteitä viljelmästä sopivin väliajoin, määrittämällä näytteiden hydroksylointikapasiteetti sauttamalla ne kosketukseen ML-236B-yhdisteen kanssa vakio-olosuhteissa ja määrittämällä saatujen yhdisteiden M-4 ja M-4' määrä sekä merkitsemällä tämä kapasiteetti ajan suhteen kaaviona. Kun hydroksylointikapasiteetti on saavuttanut maksi-
15 mipisteensä, viljely lopetetaan, ja mikrobisolut kerätään. Tämä voi tapahtua sentrifugoimalla, suodattamalla tai samankaltaisilla erottelumenetelmillä. Siten kerätyt viljeltävän mikro-organismin kokonaiset solut mieluummin pestään sitten sopivalla pesuliuoksella, kuten fysiologisella suolaliuoksella tai sopivalla puskuriliuoksella.

20

Suvun Nocardia mikro-organismin kerättyjen solujen saattaminen yhteen yhdisteen ML-236B kanssa suoritetaan yleensä vesiliuoksessa, esimerkiksi fosfaattipuskuriliuoksessa pH-arvossa 5-9. Reaktiolämpötila on mieluummin rajojen 20-45°C sisällä, vielä mieluummin 25-30°C. ML-236B-
25 yhdisteen konsentraatio reaktioliuoksessa on mieluummin alueen 0,01-5,0 paino-% sisällä. Aika, joka sallitaan reaktiolle, on mieluummin 1-5 päivää, vaikka tämä voi vaihdella riippuen ML-236B-yhdisteen konsentraatiosta reaktioseoksessa, reaktiolämpötilasta, mikro-organismin hydroksylointikapasiteetista (mikä voi tietenkin vaihdella lajista
30 lajiin ja mikä myös, kuten yllä kerrottiin, riippuu viljelyajasta) ja muista tekijöistä.

Soluton, entsyymiä sisältävä uute, jota käytetään menetelmässä (c), voidaan saada hajoittamalla koko mikro-organismin solut, jotka on saatu niin kuin kuvattiin menetelmän (b) yhteydessä, fysikaalisin tai kemiallisin keinoin, esimerkiksi jauhamalla tai ultraäänikäsittelyllä hajoitetun solumassan aikaansaamiseksi tai käsittelemällä pinta-aktiivi-

- 1 sella aineella tai entsyymillä soluliuoksen tuottamiseksi. Lopullinen soluton uute yhdistetään sitten lähtöyhdisteen ML-236B kanssa samoissa olosuhteissa, kuten kuvattiin yllä menetelmän (b) yhteydessä.
- 5 Muuntoreaktion loppuunsaattamisen jälkeen millä tahansa yllä mainitulla menetelmällä voidaan haluttu yhdiste suoraan eristää, erottaa tai puhdistaa tavanomaisin keinoin. Esimerkiksi erottaminen ja puhdistaminen voidaan suorittaa suodattamalla reaktioseos, uuttamalla saatu suodos veteen liukenemattomalla orgaanisella liuottimella (kuten etyyli-
- 10 lisulfaatilla), tislamalla liuotin uutteesta, viemällä saatu raakatuote kromatografiapylvääseen (esimerkiksi silikageeli tai aluminiumoksidit) ja eluoimalla pylvästä sopivalla eluentilla.

- 15 Milloin mikro-organismeilla muunnettu yhdiste M-4 tai M-4' ei ole tuon yhdisteen haluttu muoto, voidaan konversioreaktion tuote sitten saattaa yhteen tai useampaan jatkoreaktioon, kuten hydrolyysiin, suolan muodostamisreaktioon, esteröintiin tai laktonisointiin, tavanomaisilla menetelmillä, kuten tässä jäljempänä kuvataan. Sellaisten lisäreaktiot voidaan sovittaa yllä kuvattujen erottelu- ja puhdistusvaiheita
- 20 ennen, niiden jälkeen tai niiden aikana, mieluummin näiden vaiheiden aikana.

- Keksinnön menetelmässä aktiivisella hydroksylointientsyymillä ei ole itsessään vaikutusta ML-236B-yhdisteen karboksyyliyhdisteen, ja siten,
- 25 kun muut tekijät ovat samat, ML-236B-laktoni antaisi (M-4)- ja/tai (M-4')-laktonia, ML-236B-karboksyylihappo antaisi (M-4)- ja/tai (M-4')-karboksyylihappoa ja ML-236B-karboksyylihapon suola tai esterit antaisi (M-4)- ja/tai (M-4')-karboksyylihapon samaa suolaa tai esterit. Kuitenkin tähän voidaan vaikuttaa muilla tekijöillä, erityisesti reaktio-
- 30 seoksen pH-arvolla, tavalla, mikä on ennustettavissa tavallisilla kemian laeilla. Lähtöyhdiste ML-236B voi olla kaavan (II) vapaa ML-236B-karboksyylihappo, sen vastaava kaavan (IIa) laktoni tai suola (esim. metalli-, aminohappo- tai amiinin suola) tai sen esterit (erityisesti alkyyliesterit).

- 35 Parempina pidettyjä metallisuoloja ovat suolat alkalimetallien kanssa, kuten natrium tai kalium, suolat maa-alkalimetallien kanssa, kuten

- 1 kalsium, tai suolat muiden metallien kanssa, kuten magnesium, alumiini, rauta, sinkki, kupari, nikkeli tai koboltti, joista alkalimetalli-, maa-alkalimetalli-, magnesium- ja aluminiumsuoloja pidetään parempina, ja natrium-, kalsium- ja aluminiumsuoloja pidetään parhaimpina.

5

Parempina pidettyjä aminohappoja aminohapon suolojen muodostamiseksi ovat emäksiset aminohapot, kuten arginiini, lysiini, histidiini, α, β -diaminobutyryihappo tai ornitiini.

- 10 Parempina pidetyt amiinit amiinisuolojen muodostamiseksi käsittävät t-oktyyliamiinin, dibentsyyliamiinin, diklooriheksyyliamiinin, morfoliinin, D-fenyyliiglysiinin alkyylesterit ja D-glukoosiamiinin.

ML-236B-esterit ovat mieluummin alkyylestereitä, kuten metyyli-,

- 15 etyyli-, propyyli-, isopropyyli-, butyyli-, isobutyyli- tai pentyyli-estereitä, joista metyyliesteriä pidetään parempana. Kuitenkin voidaan käyttää muita estereitä, jos halutaan.

ML-236B:n lähtömateriaaleista pidetään erityisesti parempana alkali-

- 20 metallisuoloja, esim. natrium- tai kaliumsuoloja, natriumsuolaa pidetäessä parhaimpana, sillä me olemme havainneet, että se antaa yhdisteen ML-236B parhaan muuntumisen toivotuksi M-4- tai M-4'-yhdisteeksi.

Milloin tämän keksinnön entsymaattisella hydroksylointimenetelmällä

- 25 saatu tuote on kaavan (I) karboksyylihapon suola, voidaan itse vapaa karboksyylihappo saada säätämällä suodoksen pH arvoon 4 tai alemmas, mieluummin arvoon 3-4. Mitä tahansa orgaanista happoa tai mineraalihappoa voidaan käyttää ottamalla huomioon, ettei sillä ole mitään haittavaikutuksia haluttuun yhdisteeseen. Esimerkit monista hapoista,
- 30 jotka ovat sopivia, käsittävät trifluorietikkahapon, etikkahapon, kloorivetyhapon ja rikkihapon. Tämä karboksyylihappo voi itse olla haluttu tuote, tai se voidaan saattaa, ja mieluummin saatetaan, jatko-
- reaktioihin, kuten jäljempänä kuvataan, valinnan mukaan sellaisten käsittelyjen jälkeen kuin uuttaminen, pesu ja dehydraatio.

35

Kaavan (I) karboksyylihappojen metallisuoloja voidaan saada saattamalla valitun metallin hydroksidia, karbonaattia tai samankaltaista reaktii-

- 1 vista yhdistettä vesiliuoksessa kosketukseen kaavan (I) karboksyyliha-
pon kanssa. Käytettävä vesiliuos on mieluummin vettä tai se voi olla
veden ja orgaanisen liuottimen seos, mieluummin alkoholin (kuten meta-
noli tai etanoli), ketonin (kuten asetoni), alifaattisen hiilivedyn
5 (kuten heksaani) tai esterin (kuten etyyliasetaatti). Erityisesti me
pidämme parempana käyttää hydrofiilisen orgaanisen liuottimen ja veden
seosta. Sellaisten reaktioiden annetaan tapahtua tavallisesti ympäristön
lämpötilassa, mutta ne voivat tapahtua, jos halutaan, kuumentamalla.
- 10 Kaavan (I) karboksyylihappojen amiinisuoloja voidaan saada saattamalla
kosketukseen amiini vesiliuoksessa kaavan (I) karboksyylihapon kanssa.
Sopivat vesiliuokset käsittävät veden ja veden seokset alkoholien (kuten
metanoli tai etanoli), eettereiden (kuten tetrahydrofuraani), nitrii-
lien (kuten asetonitrili) tai ketonien (kuten asetoni) kanssa; me eri-
15 tyisesti pidämme parempana käyttää vesipitoista asetonia liuottimena
tätä reaktiota varten. Reaktio suoritetaan mieluummin pH:ssa 7-8,5 ja
mieluummin ympäristön lämpötilassa tai sen alapuolella, vielä mieluummin
lämpötilassa 5-10°C. Reaktio menee heti loppuun. Vaihtoehtoisesti kaa-
van (I) karboksyylihapon metallisuola (joka on voitu saada niin kuin
20 yllä kuvattiin) voidaan liuottaa vesiliuokseen, minkä jälkeen lisätään
halutun amiinin mineraalihapon suolaa (esimerkiksi kloorivetyhapon
suolaa) käyttäen samoja reaktio-olosuhteita kuin jos amiini itse rea-
goisi kaavan (I) karboksyylihapon kanssa, ja haluttu tuote saadaan
sitten suolanvaihtoreaktiolla.
- 25 Kaavan (I) karboksyylihappojen aminohapon suoloja voidaan saada saat-
tamalla vesiliuoksessa oleva aminohappo kosketukseen kaavan (I) karbok-
syylihapon kanssa. Sopivat vesipitoiset liuottimet käsittävät veden ja
veden seokset alkoholien (kuten metanoli tai etanoli) tai eetterien
30 (kuten tetrahydrofuraani) kanssa. Reaktio suoritetaan mieluummin kuu-
mentamalla, esimerkiksi lämpötilassa 50-60°C.
- Kaavan (I) karboksyylihappojen estereitä, mieluummin alkyylestereitä,
voidaan saada saattamalla kaavan (I) karboksyylihappo kosketukseen sopi-
35 van alkoholin kanssa. Me pidämme parempana suorittaa tämä reaktio hap-
pokatalyytin kanssa, esimerkiksi mineraalihapon (kuten suolahappo tai

- 1 rikkihappo), Lewis'n hapon (esimerkiksi boriumtrifluoridi) tai ionin-
vaihtohartsin kanssa.

- Tähän reaktioon käytettävä liuotin ei ole kriittinen, kun otetaan huo-
5 mioon, ettei se vaikuta reaktiota haittaavasti; sopivat liuottimet käs-
sittävät bentseenin, kloroformin ja eetterit. Vaihtoehtoisesti voidaan
haluttu tuote saada saattamalla kaavan (I) karboksyylihappo kosketukseen
diatsoalkaanin kanssa, missä alkaaniosa voi olla substituoitu tai subs-
tituoimaton. Tämä reaktio toteutetaan tavallisesti saattamalla koske-
10 tukseen happo diatsoalkaanin eetteripitoisen liuoksen kanssa. Seuraavana
vaihtoehtona voidaan esterä saada liittämällä kaavan (I) karboksyyli-
hapon metallisuola halogenidin, mieluummin alkyylihalogenidin, kanssa
sopivassa liuottimessa; parempina pidetyt liuottimet käsittävät dimetyy-
liformamidin, tetrahydrofuraanin, dimetyylisulfoksidin ja asetonin.
15 Kaikki reaktiot esterien tuottamiseksi suoritetaan mieluummin lähes ym-
päristön lämpötilassa, vaikka jos reaktiomenetelmän luonne vaatii, voi-
daan reaktiot suorittaa kuumentamalla.

- Kaavan (I) karboksyylihappojen laktoneja voidaan saada saattamalla
20 kaavan (I) karboksyylihappo kosketukseen katalyyttisen määrän kanssa hap-
poa, joka voi olla orgaaninen tai epäorgaaninen. Me pidämme parempana
käyttää sellaisia orgaanisia ja mineraalihappoja kuin trifluorietikka-
happo, suolahappo ja rikkihappo. Tämä reaktio suoritetaan mieluummin
suunnilleen ympäristön lämpötilassa.

25

Esimerkit yhdisteiden M-4 ja M-4' suoloista ja estereistä, jotka on
valmistettu keksinnön menetelmällä, sisältävät yllä annetut ML-236B:n
suolat ja esterit käytettäväksi lähtöaineena.

- 30 Siten saadut johdannaiset M-4 ja M-4' voidaan eristää, erotella tai
puhdistaa tavanomaisilla keinoilla, esimerkiksi adsorptiolla kantaja-
aineelle (kuten aktiivihiili tai silikageeli) tai ioninvaihtokromato-
grafiolla tai geelisuodatuksella Sephadex-pylväällä (tavaramerkki) tai
uuttamalla orgaanisella liuottimella, kuten eetterillä, etyyliasetaa-
35 tilla tai kloroformilla; jos halutaan, ja sitä tavallisesti pidetään
parempana, voidaan käyttää näiden tekniikkojen yhdistelmää.

- 1 Isomeerit M-4 ja M-4' voidaan erotella toisistaan joko konversioreaktion loppuunsaattamisen jälkeen tai missä tahansa sopivassa kohdassa reaktioiden aikana tai yllä kuvattujen erottelu- tai puhdistusprosessien aikana.

5

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavilla esimerkeillä.

Esimerkki 1

- 10 Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183:n soluja ympätettiin vinopintaviljelmältää platinasilmukan avulla jokaiseen kahteenkymmeneen 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joista jokainen sisälsi 100 ml viljelyliuosta, jolla oli seuraava kokoonpano (prosentit ovat paino/tilavuus):

15

Glukoosi	1,0%
Peptoni	0,2%
Lihausute	0,1%
Hiivauute	0,1%

20

Maissinliotusvesi	0,3%
Vesijohtovesi	lopun

(pH:ta ei säädetty)

25

Viljelmää ravisteltiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä kahden päivän ajan, missä ajassa lisättiin natrium-(ML-236B)-karboksylaattia loppukonsentraatioon 0,05% (paino/tilavuus) asti. Inkubointia jatkettiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä seuraavat 5 päivää.

30

Viljelyn loppuun saattamisen jälkeen reaktioseos suodatettiin, ja suodoksen pH säädettiin arvoon 3 lisäämällä trifluorietikkahappoa. Happamaksi tehty suodos uutettiin sitten kolme kertaa kullakin kerralla 1 litran kanssa etyyliasetaattia, mikä antoi uutteen, jotka sisälsivät (M-4)- ja (M-4')-karboksyylihapon seosta. Otettiin näytteitä näistä tuotteista, ja niihin käytettiin ohutkerroskromatografiaa silikaageelilevyllä Art 5715 (valmistanut Merck / Co. Inc.), kehitettiin 50:50:3-tilavuussuhteessa bentseenin, asetonin ja etikkahapon seosta. (M-4)-karboksyylihapon R_f-arvo oli 0,45, ja (M-4')-karboksyylihapon

35

1 Rf-arvo oli 0,46.

- Koko loppu-uute pestiin kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, minkä jälkeen lisättiin ekvivalentti moolimäärä diatsometaanin eetteripitoista liuosta huoneenlämpötilassa. Seoksen annettiin seistä 30 minuuttia, minkä jälkeen se haihdutettiin kuivaksi alipaineessa. Jäännös laitettiin Lobarin kolonniin (Si 60, valmistanut Merck / Co. Inc., koko A), mitä sitten eluoitiin 1:1 tilavuussuhteisella seoksella bentseeniä ja etyyliasetaattia. Saatiin erotellut fraktiot, jotka sisälsivät metyyli-
- 10 (M-4)-karboksylaattia ja metyyli-(M-4')-karboksylaattia. Nämä fraktiot konsentroitiin haihduttamalla alipaineessa, mikä antoi 320 g metyyli-(M-4)-karboksylaattia ja 11 mg metyyli-(M-4')-karboksylaattia, molemmat värittömien öljyjen muodossa.
- 15 Korvaamalla diatsometaanin yllä kuvatussa menettelyssä muilla sopivilla diatsoalkaaneilla voidaan saada muita (M-4)-karboksyylihapon ja (M-4')-karboksyylihapon estereitä.

Metyyli-(M-4)-karboksylaatin fysikaalisia ominaisuuksia

20 kuvataan seuraavaksi.

Ydinmagneettinen resonanssispektri (deuteriumkloroformissa käyttäen tetrametyylisilaaania sisäisenä standardina, 200 MHz:ssa),

δ ppm:

25

0,88 (3H, tripletti, $J = 7,3$ Hz);

0,89 (3H, dupletti, $J = 6,5$ Hz);

1,12 (3H, dupletti, $J = 6,8$ Hz);

1,1-1,7 (10H, multipletti);

30

2,34 (1H, sekstetti, $J = 7$ Hz);

2,3-2,5 (2H, multipletti);

2,49 (2H, dupletti, $J = 6,4$ Hz);

2,58 (1H, multipletti);

3,72 (3H, singletti);

35

3,78 (1H, multipletti);

4,25 (1H, kvintetti, $J = 7$ Hz);

4,40 (1H, multipletti);

70925

- 1 5,42 (1H, multiplletti);
 5,56 (1H, multiplletti);
 5,90 (1H, dupletti dupleteista, $J = 9,8$ ja $5,6$ Hz);
 5,99 (1H, dupletti, $J = 9,8$ Hz).

5

Massaspektri: Silyloinnin jälkeen N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluori-
asetamidilla tehtiin mittaus käyttäen D-300 -tyyppistä laitetta, jonka
on valmistanut Nihon Electronics Co.

- 10 M/e : 654 (M^+), 552, 462, 372, 290, 272, 233, 231.

Ultraviolettiabsorptiospektri (etanoli) $\lambda_{\max}$ nm:
230,1, 237,3, 246,4.

- 15 Infrapuna-absorptiospektri (ohut kalvo) $\nu_{\max}$ cm^{-1} :
3400, 2950, 1730.

Ohutkerroskromatografia: Silikageelilevyllä Art 5715, valmistanut
Merck / Co. Inc., käyttäen 1:1 tilavuussuhteessa bentseenin ja aseto-
20 nin seosta kehitysliuoksena.

R_f-arvo: 0,88.

Seuraavaksi kuvataan metyyli-(M-4')-karboksylaatin fysikaalisia
ominaisuuksia.

25

Ydinmagneettinen resonanssispektri (deuteriumkloroformissa käyttäen
tetrametyylisilaania sisäisenä standardina, 60 MHz:ssa)
 δ ppm:

- 30 3,70 (3H, singletti);
 5,50 (1H, leveä singletti);
 5,75 (1H, leveä singletti);
 5,90 (1H, kvartettti);
 6,01 (1H, dupletti).

35

Ultraviolettiabsorptiospektri (metanoli) $\lambda_{\max}$ nm:
230, 238, 246.

- 1 Infrapuna-absorptiospektri (ohut kalvo) $\nu_{\max}$ cm^{-1} :
3400, 1730.

- Massaspektri: Silyloinnin jälkeen N,O-bis(trimetyylisilyyli)trifluori-
5 asetamidilla tehtiin mittaus käyttäen D-300-tyyppistä laitetta, jonka on valmistanut Nihon Electronic Co.
M/e: 654 (M^+).

Alkuaineanalyysi:

- 10 Laskettu $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$:lle: C, 65,73%; H, 8,73%.
Löydetty: C, 65,55%; H 8,79%.

Esimerkki 2

- 15 Esimerkissä 1 kuvattu menettelytapa toistettiin, mikä antoi 1,9 litraa konversioreaktion seosta. Tämän seoksen pH asetettiin sitten arvoon 3,0 lisäämällä trifluorietikkahappoa, minkä jälkeen seosta uutettiin kolme kertaa, kullakin kerralla 1 litralla etyyliasetaattia, mikä antoi fraktion, joka sisälsi sekä (M-4)-karboksyylihappoa että (M-4')-
20 karboksyylihappoa.

- Tämä uute pestiin sitten kyllästetyllä natriumkloridiliuoksella, minkä jälkeen se kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla. Sitten lisättiin katalyyttinen määrä trifluorietikkahappoa laktonisoinnin aikaan-
25 saamiseksi. Saatu seos pestiin sitten 5%:lla (paino/tilavuus) natriumvetykarbonaatin vesiliuoksella, minkä jälkeen se kuivattiin vedettömällä natriumsulfaatilla, ja sitten se haihdutettiin kuivaksi, mikä antoi laktonifraktion.

- 30 Tämä laktonifraktio laitettiin Lobarin kolonniin (Si 60, valmistanut Merck / Co. Inc., koko A) ja eluoitiin 7:3 tilavuussuhteisella bentseenin ja asetonin seoksella, mikä antoi erotetut fraktiot, jotka sisälsivät (M-4)-laktonia ja (M-4')-laktonia. Nämä fraktiot uudelleenkitetyttiin erikseen etyyliasetaatilla, mikä antoi 270 mg (M-4)-laktonia ja
35 8 mg (M-4')-laktonia.

Seuraavaksi esitetään (M-4)-laktonin fysikaalisia ominaisuuksia.

- 1 Ydinmagneettinen resonanssispektri (deuteriumkloroformissa käyttäen tetrametyylisilaania sisäisenä standardina, 100 MHz:ssa)

δ ppm:

- 5 4,38 (1H, multipletti);
4,41 (1H, multipletti);
4,62 (1H, multipletti);
5,41 (1H, multipletti);
5,58 (1H, multipletti);
10 5,90 (1H, kvartetti);
6,01 (1H, dupletti).

Ultraviolettiabsorptiospektri (metanoli) $\lambda_{\max}$ nm:
230, 236,7, 244,6.

15

Infrapuna-absorptiospektri (ohut kalvo) $\nu_{\max}$ cm^{-1} :
3400, 2950, 1725.

Ohutkerroskromatografia: Silikageelilevyllä Art 5715, valmistanut

- 20 Merck / Co. Inc., käyttäen 50:50:3 tilavuussuhteessa bentseenin, asetonin ja etikkahapon seosta kehitysliuoksena.

Rf-arvo: 0,62.

Seuraavaksi kuvataan (M-4')-laktonin fysikaalisia ominaisuuksia.

25

Ydinmagneettinen resonanssispektri (deuteriumkloroformissa käyttäen tetrametyylisilaania sisäisenä standardina, 100 MHz:ssa)

δ ppm:

- 30 4,25 (1H, multipletti);
4,60 (1H, multipletti);
5,50 (1H, multipletti);
5,75 (1H, multipletti);
5,90 (1H, kvartetti);
35 6,01 (1H, dupletti).

1 Ultraviolettiabsorptiospektri (metanoli) $\lambda_{\max}$ nm:
230, 237, 245.

Infrapuna-absorptiospektri (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} :
5 3500, 1720.

Massaspektri: M/e 406 (M^+), 304, 286.

Optinen kiertokyky:

10 $[\alpha]_D^{22} = +310,9^\circ$ ($c = 0,66$, metanoli).

Sulamispiste: 141-143°C.

Alkuaineanalyysi:

15 Laskettu $C_{23}H_{34}O_6$:lle: C, 67,95%; H, 8,43%.
Löydetty: C, 68,05%; H, 8,37%.

Ohutkerroskromatografia: Silikageelilevyllä Art 5715, valmistanut
Merck / Co. Inc., käyttäen 1:1 tilavuussuhteessa bentseenin ja aseto-
20 nin seosta kehitysluoksena.
Rf-arvo: 0,64.

Esimerkki 3

25 Esimerkissä 1 kuvattu menettelytapa toistettiin uuttamiseen asti, ja
tämä mukaan lukien, kolmella etyyliasetaatierällä, mikä antoi uutteen,
joka sisälsi sekä (M-4)-karboksyylihappoa että (M-4')-karboksyylihappoa.

Tämä uute siirrettiin sitten välittömästi 5%:een (paino/tilavuus) nat-
riumvetykarbonaatin vesiliuokseen, ja seoksen pH asetettiin arvoon 7,0
30 lisäämällä 2N kloorivetyhappoa. Seos adsorboitiin sitten Diaion HP-20-
kolonniin (valmistanut Mitsubishi Chemical Industries). Kolonnia pestiin
vedellä ja sitten eluoiitiin 50 tilavuus-%:lla vesipitoisella asetonilla,
mikä antoi fraktion, joka sisälsi natrium-(M-4)-karboksylaattia. Tämä
35 pakastekuivattiin, mikä antoi 200 mg natrium-(M-4)-karboksylaattia.

- 1 Seuraavaksi on kuvattu natrium-(M-4)-karboksylaatin fysikaalisia ominaisuuksia.

Ydinmagneettinen resonanssispektri (deuteriummetanolissa käyttäen tetra-

- 5 metyylisilaania sisäisenä standardina, 200 MHz:ssa)

δ ppm:

- 0,91 (3H, tripletti, $J = 7,5$ Hz);
 0,92 (3H, dupletti, $J = 7$ Hz);
 10 1,12 (3H, dupletti, $J = 7$ Hz);
 1,1-1,8 (10H, multipletti);
 2,25 (1H, dupletti dupleteista, $J = 15 / 7,6$ Hz);
 2,34 (1H, dupletti dupleteista, $J = 15 / 5,5$ Hz);
 2,2-2,4 (3H, multipletti);
 15 2,48 (1H, multipletti);
 3,68 (1H, multipletti);
 4,07 (1H, multipletti);
 4,28 (1H, multipletti);
 5,36 (1H, multipletti);
 20 5,48 (1H, dupletti dupleteista, $J = 3 / 2$ Hz);
 5,88 (1H, dupletti dupleteista, $J = 9,6 / 5,3$ Hz);
 5,98 (1H, dupletti, $J = 9,8$ Hz).

Ultraviolettiabsorptiospektri (metanoli) $\lambda_{\max}$ nm:

- 25 230,0, 237,2, 245,0.

Infrapuna-absorptiospektri (KBr) $\nu_{\max}$ cm^{-1} :

3400, 2900, 1725, 1580.

- 30 Ohutkerroskromatografia: Silikageelilevyllä Art 5715, valmistanut Merck / Co. Inc., käyttäen 50:50:3 tilavuussuhteessa bentseenin, asetonin ja etyyliasetaatin seosta kehitysluoksena.

Rf-arvo: 0,45.

1 Esimerkki 4

Esimerkeissä 1-3 kuvatut menettelytavat toistettiin, mutta käyttäen kantaa Nocardia autotrophica FERM P-6181 kannan Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183 tilalla; saatiin: 150 mg metyyli-(M-4)-karboksylaattia; 37 mg metyyli-(M-4')-karboksylaattia; 140 mg (M-4)-laktonia; 30 mg (M-4')-laktonia; ja 110 mg natrium-(M-4)-karboksylaattia. Kussakin tapauksessa tuotteiden ominaisuudet olivat samat esimerkeissä 1-3 saatujen vastaavien yhdisteiden kanssa.

10

Esimerkki 5

Silmukallinen viljelmää Nocardia autotrophica subsp. canberrica FERM P-6182 ympättiin kuhunkin kahteenkymmeneen 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joista jokainen sisälsi 100 ml liuosta, jolla oli seuraava kokoonpano (prosentit ovat paino/tilavuus):

	Glyseriiniä	0,5%
	Sakkaroosia	2,0%
20	Soijapapujauhoja	1,0%
	Puristettua hiivaa	1,0%
	Maissinliotusvettä	0,5%
	Kobolttikloridia	0,001%
	Vesijohtovettä	lopun
25		(pH 7,0)

Viljelmän ravistelua jatkettiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä 2 päivää, missä ajassa lisättiin natrium-(ML-236B)-karboksylaattia lopulliseen konsentraatioon 0,05% (paino/tilavuus) asti. Viljelyä jatkettiin sitten 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä seuraavat 5 päivää. Konversioreaktion seos suodatettiin sitten, ja suodoksen pH asetettiin arvoon 3,0 lisäämällä kloorivetyhappoa. Seos uutettiin sitten kolme kertaa, kullakin kerralla 1 litralla etyyliasetaattia, mikä antoi uutteen, joka sisälsi sekä (M-4)-karboksyylihappoa että (M-4')-karboksyylihappoa, joiden osoitettiin ohutkerroskromatografialla olevan identtisiä esimerkin 1 vastaavien tuotteiden kanssa.

35

- 1 Tätä uutetta käsiteltiin sitten edelleen, kuten esimerkissä 1 kuvattiin, mikä antoi 180 mg metyyli-(M-4)-karboksylaattia ja 110 mg metyyli-(M-4')-karboksylaattia.

5 Esimerkki 6

- Esimerkissä 5 kuvattu menettelytapa toistettiin (M-4)-karboksyylihap-
poa ja (M-4')-karboksyylihappoa sisältävän uutteen valmistukseen asti,
ja käsittäen myös valmistuksen. Tätä uutetta käsiteltiin sitten niin
10 kuin esimerkissä 2 kuvattiin, mikä antoi 170 mg (M-4)-laktonia ja
90 mg (M-4')-laktonia.

Esimerkki 7

- 15 Silmukallinen viljelmä Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM
P-6183 ympättiin kymmeneen 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joista jokainen
sisälsi 100 ml liuosta, jolla oli seuraava kokoonpano (prosentit ovat
paino/tilavuus):

- | | | |
|----|----------------|----------------------|
| 20 | Glukoosia | 1,0% |
| | Peptonia | 0,2% |
| | Lihausutetta | 0,1% |
| | Hiivautetta | 0,1% |
| | Vesijohtovettä | lopun |
| 25 | | (pH:ta ei säädetty). |

- Viljelmää ravisteltiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä 5 päivän ajan,
minkä jälkeen kaikki mikrobisolut kerättiin erottamalla sentrifuugil-
la. Kerätyt solut pestiin 0,1 M fosfaattipuskuriliuoksella (pH 7,0),
30 ja sitten ne jälleen kerättiin ja suspendoitiin 900 ml:aan 0,1 M fos-
faattipuskuriliuosta. Tähän suspensioon lisättiin natrium-(ML-236B)-
karboksylaattia konsentraatioksi 0,5 g/100 ml, ja sitten seosta in-
kuboitiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä 5 päivää. Tämän ajan päätyttyä
konversioseos suodatettiin, ja sen pH asetettiin arvoon 3,0 lisäämäl-
35 lä kloorivetyhappoa. Seos uutettiin sitten kolme kertaa, kullakin ker-
ralla 1 litralla etyyliasetaatilla, mikä antoi uutetta, joka sisälsi
(M-4)-karboksyylihappoa ja (M-4')-karboksyylihappoa, jotka tunnistet-

- 1 tiin ohutkerroskromatografisesti ja joiden osoitettiin olevan samoja
kuin esimerkin 1 vastaavat tuotteet.

Esimerkki 8

5

Esimerkissä 2 kuvattu menettelytapa toistettiin, paitsi että käytettiin taulukossa 6 lueteltuja mikro-organismeja; saadun (M-4)-laktonin määrä on sellainen kuin taulukossa esitetään.

10

TAULUKKO 6

Mikro-organismi	(M-4)-laktonin määrä (mg)
<u>Nocardia farcinica</u> ATCC 3318	7
<u>Nocardia coeliaca</u> ATCC 17040	5
<u>Nocardia autotrophica</u> IFO 12743	10
<u>Nocardia asteroides</u> IFO 3424	15

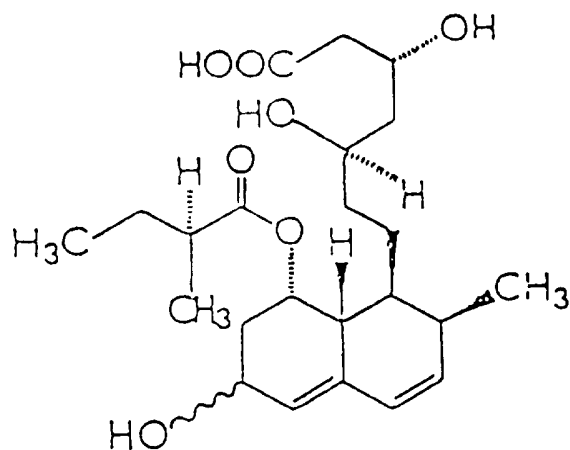
20

Esimerkki 9

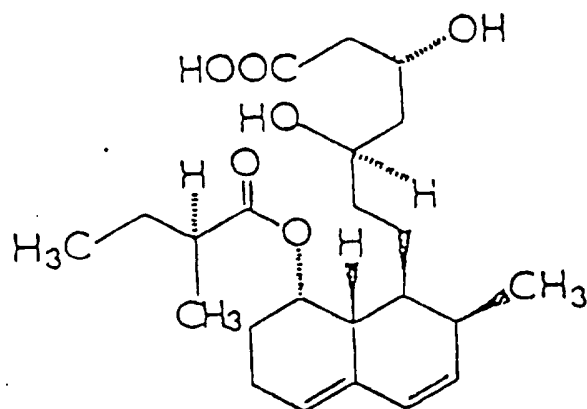
- Soluja Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183 ympätettiin vinopintaviljelmältä platinasilmukalla jokaiseen kahteenkymmeneen
25 500 ml:n Erlenmeyer-pulloon, joista jokainen sisälsi 100 ml viljely-
liuosta, jolla on esimerkissä 7 annettu kokoonpano. Viljelmää ravistel-
tiin sitten 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä 2 päivän ajan, missä ajassa
lisättiin natrium-(ML-236B)-karboksylaattia loppukonsentraatioksi
0,4% (paino/tilavuus). Inkubointia jatkettiin 26°C:ssa ja 220 r.p.m:ssä
30 seuraavat 5 päivää. Esimerkissä 2 kuvattu menettelytapa toistettiin
sitten, mikä antoi 2,9 g (M-4)-laktonia.

1 Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kaavan (I) mukaisen lääkeaineena käyttökelpoisen yhdisteen:



(missä $\sim$ OH edustaa ryhmää $\blacktriangle$ OH tai $\{\{\{\{\{\{\$ OH), sen farma-
seuttisesti hyväksyttävien suolojen ja esterien sekä vastaavien sulje-
tun renkaan omaavien laktonien valmistamiseksi, saattamalla yhdiste
ML-236B, joka on kaavan II mukainen



1 (ML-236B)-karboksyylihapo tai sen suola, kosketukseen hydroksylointient-
syymin kanssa, t u n n e t t u siitä, että hydroksylointientsyymi on
tuotettu suvun Nocardia mikro-organismeilla; jos on tarpeen, viemällä
saatu tuote yhteen tai useampaan reaktioon, joka on suolan muodostus,
5 esteröinti tai laktonisointi; ja eristämällä tuote reaktioseoksesta.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että kyseinen ML-236B-yhdiste saatetaan kosketukseen hydroksylointientsyymi
kanssa viljelemällä suvun Nocardia mikro-organismeja liuoksessa, joka
10 sisältää ML-236B-yhdistettä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että suvun Nocardia mikro-organismin kokonaiset solut saatetaan kosketuk-
seen ML-236B-yhdisteen kanssa.

15 4. Patenttivaatimuksen 1,2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että mainittu mikro-organismi on Nocardia auto-
trophica, Nocardia asteroides, Nocardia farcinica tai Nocardia
coeliaca.

20 5. Patenttivaatimuksen 1,2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u
siitä, että kyseinen mikro-organismi on:

Nocardia autotrophica FERM P-6181

25 Nocardia autotrophica subsp. canberrica FERM P-6182

Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183

Nocardia autotrophica IFO 12743

Nocardia asteroides IFO 3424

Nocardia farcinica ATCC 3318 ja

30 Nocardia coeliaca ATCC 17040.

6. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista 1-5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste M-4, missä  OH,
edustaa ryhmää  OH.

- 1 7. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista 1-5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan yhdiste M-4', missä $\text{R}_1\text{R}_2\text{OH}$,
edustaa ryhmää $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$.
- 5 8. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista 1-7 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että valmistetaan kaavan (1) mukaisen yhdisteen
natriumsuola.

10

15

20

25

30

35

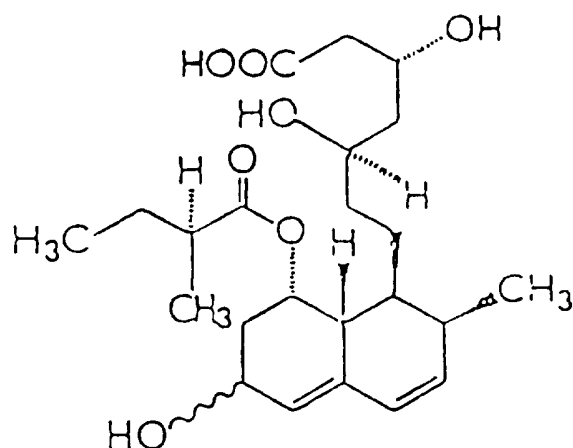
1 Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en som läkemedel användbar förening med formeln (I)

5

10

15



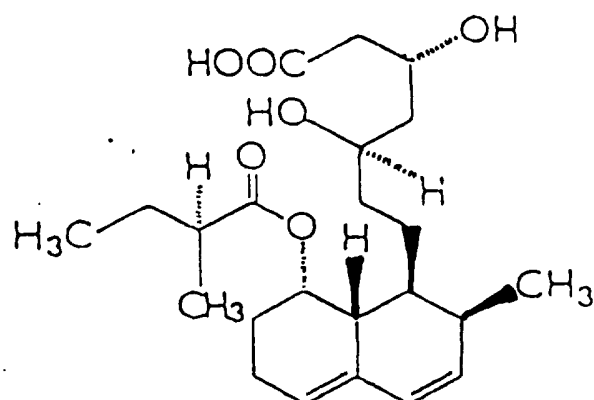
(I)

20 (där $\sim$ OH representerar gruppen $\blacktriangle$ OH eller $\{\}\{\}\{\}\{\}\{\}$ OH), dess farmaceutiskt acceptabla salter och estrar samt motsvarande laktoner med sluten ring, genom att bringa föreningen ML-236B som är en (ML-236B)-karboxylsyra enligt formeln II

25

30

35



(II)

eller dess salt i kontakt med ett hydroxyleringsenzym, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att hydroxyleringsenzymet har producerats med en
mikroorganism av släktet Nocardia; vid behov genom att föra den erhållna
produkten till en eller flere reaktioner som utgörs av saltbildning,
förestring eller laktonisering, och genom att separera produkten ur
reaktionsblandningen.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav,
att ifrågavarande ML-236B-förening bringas i kontakt med hydroxyleringsenzymet
genom att odla mikroorganismen av släktet Nocardia i en lösning som
innehåller denna ML-236B-förening.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav,
att hela celler av mikroorganismen av släktet Nocardia bringas i kontakt
med denna ML-236B-förening.

4. Förfarande enligt patentkravet 1,2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t
därav, att nämnda mikroorganism är Nocardia autotrophica, Nocardia
asteroides, Nocardia farcinica eller Nocardia coeliaca.

5. Förfarande enligt patentkravet 1,2 eller 3, k ä n n e t e c k n a t
därav, att ifrågavarande mikroorganism är:

Nocardia autotrophica FERM P-6181

Nocardia autotrophica subsp. canberrica FERM P-6182

Nocardia autotrophica subsp. amethystina FERM P-6183

Nocardia autotrophica IFO 12743

Nocardia asteroides IFO 3424

Nocardia farcinica ATCC 3318 och

Nocardia coeliaca ATCC 17040.

6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven 1-5, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att man framställer en förening M-4, där 
OH betecknar gruppen  OH.

1 7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven 1-5, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att man framställer en förening M-4', där *OH*
OH betecknar gruppen ---OH .

5 8. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven 1-7, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att man framställer natriumsaltet av föreningen
med formeln (I).

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

10 Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia:-Offentliga finska patentansök-
ningar: 811762, 802357.
Patenttijulkaisuja-Patentskrifter Suomi-Finland(FI) 66 427 (C 12 P 17/06),
67 231 (C 12 P 7/26).

15

20

25

30

35