



SUOMI—FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

[8] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 67571

C (45) Patentti myönnetty 10 04 1985
Patent meddelat

(51) Kv.kl. ³/Int.Cl. ³ C 12 P 1/04

(21) Patentihakemus — Patentansökan	801251
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	18.04.80
(23) Aikupäivä — Giltighetsdag	18.04.80
(41) Tulit julkeksi — Blivit offentlig	19.10.80
(44) Nähtävääkseen ja kuulutuksen pvm. — Ansökan utlagd och utskriften publicerad	31.12.84
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	18.04.79
Ranska-Frankrike(FR) 7909743	

- (71) Rhône-Poulenc Industries, 22 avenue Montaigne, F-75008 Paris,
Ranska-Frankrike(FR)
- (72) Jean Florent, Boulogne-Billancourt, Jean Lunel, Paris,
Denise Mancy née Courtillet, Charenton, Bernard Vuillemin, Yerres,
Ranska-Frankrike(FR)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Menetelmä uuden biologisesti aktiivisen aineen valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av ett nytt biologiskt aktivt ämne

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä uuden biologisesti aktiivisen aineen valmistamiseksi, jonka tunnusnumero on 41 200 RP ja joka on saatu erään uuden mikro-organismin *Micrococcus sedogenes* M 78 viljelmästä eristetyistä soluista.

Tämän keksinnön mukainen aine 41 200 RP, joka on saatu käsittelemällä lysotsyymillä *Micrococcus sedogenes* M 78-kannan eristettyjä soluja, saostamalla epäpuhtaudet kalsiumkloridilla, eliminoimalla proteiinit fenolilla käsittelemällä ja fraktioimalla sitten molekyyliseulalla, sisältää pääasiallisesti 11-18% aminohappoja (joista 5,5-7,5% alaniinia), 10-17% glukoosia, 10-17% aminosokereita ja alle 3% nukleiinihappoja.

Aine 41 200 RP eristetään yleensä vesipitoisuudessa, jolloin se on valkea amorfinen veteen liukeneva jauhe, joka sisältää hiiltä, vetyä, happea, typpeä, fosforia, rikkiä, klooria, natriumia ja kalsiumia. Alkuaineiden pitoisuudet (laskettu kuivana) ovat suunnilleen seuraavat:

C % = 45-47, H % = 7,1-7,6, O % = 35-38 (erotuksena),
N % = 4,0-5,7, P % = 0,9-1,2, Cl % = 0,1-0,4, S % = alle 0,5,
Na % = 2,0-3,0, Ca % = 0,9-1,9.

Aineen 41 200 RP valmistusmenetelmä käsittää oleellisesti *Micrococcus sedogenes* M 78-kannan viljelmistä eristettyjen solujen (jotka on mieluummin kuivattu ja käsitelty ennalta 30-60 min noin 120°C:ssa pH:n ollessa noin 3) vesisuspension käsittelyn lysotsyy-millä, raakatuotteen erottamisen suolan muodossa saadun suspension nestefaasista ja sen puhdistamisen saostamalla epäpuhtaudet useita kertoja peräkkäin kalsiumkloridilla ja käsittelemällä sitten fenolilla proteiinien poistamiseksi lähes kokonaan ja lopuksi fraktioimalla molekyyliseulalla ja ottamalla talteen, fraktio, jolla on suurin molekyylipaino, toisin sanoen molekyylipaino alueella 5×10^5 - 5×10^6 .

Lysotsyyymiä käytetään yleensä 2-20 mg yhtä grammaa käytettäviä kuivattuja soluja kohden. Käsittely tapahtuu vakio-pH:ssa, joka on noin 6,5-8, edullisesti noin 7, 1-3 tunnin aikana, mieluummin kahden tunnin aikana 37°C:n lämpötilassa koko ajan voimakkaasti sekoittaen.

Saadun suspension nestefaasi erotetaan yleensä sentrifugoimalla ja siihen liuenneet pienen molekyylipainon omaavat tuotteet eliminoidaan joko dialysoimalla käyttäen sopivan huokoista kalvoa tai sitten ultrasuodattamalla. Näin saatu raakatuote voidaan erottaa suolamuodossa lyofilisoimalla liuos. Tässä valmistusvaiheessa saatu tuote sisältää pääasiassa proteiineja, nukleiinihappoja, aminosokereita ja vähintään 5% polysakkarideja ja sen alkuainekoostumus on seuraavanlainen:

C % = 41,5-44,9, H % = 5,6-5,9, O % = 29,4-32,2, N % = 11,2-12,6, P % = 3,2-4,4, S % = 0,1-0,5, Cl % = 0,2-0,4 rikkiä sisältävät tuhkat % = 11,4-15,4.

Raakatuote puhdistetaan vesiliuoksena, jonka pitoisuus on 10-40 g/l, edullisesti 20 g/l, lisäämällä konsentroitua kalsiumkloridiliuosta, kunnes kalsiumkloridin pitoisuus on 5-50 g/l, edullisesti 10 g/l. Muodostunut saostuma erotetaan sentrifugoimalla ja näin saatu liuos dialysoidaan (tai ultrasuodatetaan) ja käsitellään sen jälkeen ioninvaihtohartsilla, joka sisältää sulfonihappo-ioneja alkalisisä muodossa. Saatu tuote, joka merkitään numerolla 32919 RP, voidaan erottaa vesiliuoksesta lyofilisoimalla.

67571

Tuote 32919 RP sisältää pääasiallisesti 24-33 % aminohappoja, 26-33 % nukleiinihappoja, 11 - 17,5 % aminosokereita (määritetty Elson-Morgan -menetelmällä ja tulokset ilmoitettu glukosaminina) ja 2,8 - 4,3 % polysakkarideja ja sen alkuainekoostumus on seuraavanlainen:

C % = 44-48, H % = 5,2 - 6,7, O % = 29-33, N % = 10,0 - 11,6, P % = 2,3 - 3,7, S % alle 0,5, Na % = 3,0 - 3,8, Ca % = 0,15 - 0,50.

Ainetta 32919 RP puhdistetaan edelleen menetellen seuraavalla tavalla:

Aineen 32919 RP vesiliuosta, jonka 32919 RP -pitoisuus on 10-50 g/l, edullisesti 25 g/l, pestään yhtä suurella tilavuudella fenolin ja veden seosta (joka mieluimmin sisältää 10 % vettä) 15-60 minuutin, edullisesti 30 minuutin ajan noin 65°C:n lämpötilassa. Jäähdytyksen jälkeen vesifaasi erotetaan ja sitä pestään klooripitoisella liuottimella, mieluimmin kloroformilla, kunnes liuennut fenoli on eliminoitunut, minkä jälkeen vesifaasi dialysoidaan tislattulla vedellä. Aktiivisen aineen sisältävä vesifaasi lyofilisoidaan.

Näin saatu tuote liuotetaan veteen, jonka pH on puskuroitu noin 7:ksi alkaliasetaatilla, esim. natriumasetaatilla. Näin saatu liuos fraktioidaan hyvin huokoisella molekyyliseulalla, jollaisia ovat esim. "Ultrigel Ac A 22", valmistaja Industrie Biologique Francaise, "Sepharose 4 B" tai "Sepharose CL 4B", valmistaja Société Pharmacia, ottaen talteen korkean molekyylipainon omaava fraktio. Aine 41 200 RP erotetaan sitten liuoksestaan lyofilisoidamalla, kun sitä ensin on dialysoitu kyllin pitkää demineralisoidulla vedellä.

Micrococcus sedogenes M 78-kantaa, jota viljelem     sopivissa olosuhteissa saadaan 41200 RP:n valmistuksessa käytetyt s  lut, on katsottava uudeksi Micrococcus-sukuun kuuluvaksi lajiksi.

Se on eristetty Brasiliasta toimitetusta maanäytteestä tavallisia mikro-organismien erist  mismenetelmi   k  ytt    . Tästä

kannasta on talletettu näyte osoitteeseen Northern Regional Research Laboratory, US Department of Agriculture, Peoria, Illinois (USA), missä se on rekisteröity 14. elokuuta 1968 numerolla NRRL B-3505.

Tällä laboratoriollla on valtuudet toimittaa kantaa kenelle tahansa, jolla on laillinen oikeus tutustua tähän asiakirjaan.

Tämän mikro-organismin ominaisuudet on määriteltä useilla identifioimis menetelmillä, joita on esitetty julkaisussa "Manual of Microbiological Methods" Society of American Bacteriologists, McGraw-Hill Book Company, New York (1957) sekä myös seuraavissa teoksissa: J. Dumas, "Bakteriologie Médicale", Editions Médicales Flammarion, Pariisi (1951); S. Lambin ja A. German, "Précis des Microbiologia", Collection des Précis de Pharmacie, Masson, Pariisi (1961); H. Cassagne, "Milieux de culture", Editions de la Tourelle, Pariisi (1961); Skerman, "Guida to the Identification of the Genera of Bacteria", The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1957).

Suvun määrittäminen on suoritettu käyttäen julkaisussa "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7. painos, The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1957) esitettyä identifiointikaaviota.

M 78 -kannan morfologisten ominaisuuksien tutkiminen suoritettiin staattisilla viljelmillä, joita oli kasvatettu 24 tuntia 26°C:ssa. Nämä viljelmät koostuivat Gram-positiivisista kokkien muotoisista happeja kestäättömistä liikkumattomista soluista, joiden läpimitta oli 1 - 1,3 μ m ja jotka olivat erillisiä tai kahden tai neljän solun ryhmissä tai 4-16 solun ketjuissa tai sitten 20-50 solun epäsäännöllisinä kasautumina. Itiöiden läsnäoloa ei havaittu.

Kaltevalla ravintoalustalla kasvatetut viljelmät näyttävät rasvamaiselta kerrokselta ja ovat sileitä tai hyvin vähän ryppyisiä, hajuttomia, eivät kromogeenisiä ja ovat rakenteeltaan löysiä. Petri-maljassa ravintoalustalla kasvatetut viljelmät muodostavat pyöreitä laidoiltaan säännöllisiä ja sileäpintaisia pesäkkeitä; pesäkkeet ovat litteitä tai hieman kuperia ja enemmän tai vähemmän himmeitä.

Glukoosia sisältävässä ravintopitoisessa lihaliemessä kasvatetut viljelmät ovat jonkin verran sameita, värittömiä, hajuttomia ja muodostavat hiutalemaista saostumaa.

Perunoiden pinnalla kasvatettuna M 78 -kanta muodostaa rasvaisen sileän heikosti kellertävän kerroksen mustuttamatta perunaa tai muodostamatta liukenevaa pigmenttiä.

Biokemiallisten ominaisuuksien tutkimus tehtiin 26°C:ssa kasvatetuilla viljelmillä. Saadut tulokset on koottu seuraavaan luetteloon:

Hengitystapa: pelkästään aerobinen.

Nitraattien ja nitriittien pelkistyskyky: positiivinen.

kromogeenisyys: negatiivinen.

Indolin tuotto: negatiivinen.

H₂S-tuotto: negatiivinen.

Gelatiinin nesteyttäminen: negatiivinen 21 vuorokauden aikana.

Kaseiinin hydrolyysi: positiivinen.

Metyylipunakoe: negatiivinen.

Asetyyli-metyyli-karbinolikoe (Voges-Proskauer -reaktio): negatiivinen.

Viljely kuoritusmaidossa: ei koaguloitumista, ei peptonisoitumista, väliaineen pH kohosi 6,1:stä 7,5:teen ensimmäisen ja 21 vuorokauden välisenä aikana.

Optimaalinen kasvulämpötila: 4°C - ei lainkaan kasvua; 22°C - hyvää kasvua; 26°C - erittäin hyvää kasvua; 30°C - hyvää kasvua; 37°C - keskinkertaista kasvua; 45°C - ei lainkaan kasvua.

Katalaasi: positiivinen.

Oksidaasi: negatiivinen.

Happojen muodostuminen seuraavista hiilihydraateista ja polyalkoholeista (aerobisesti ja anaerobisesti), osoitettu fenolipunan värinmuutoksella: glukoosi: negatiivinen; galaktoosi: negatiivinen; arabinoosi: negatiivinen; sakkaroosi: negatiivinen; laktoosi: negatiivinen; mannitoli: negatiivinen; glyseroli: negatiivinen.

Tärkkelyksen hydrolyysi: positiivinen.

Eskuliiniväliaine: ei mustumista.

Viljely väliaineessa, johon on lisätty suuria pitoisuuksia NaCl: 4 % NaCl: keskinkertaista kasvua; 10 % NaCl: ei lainkaan kasvua.

Urean käyttö ainoana typen lähteenä: negatiivinen.

Ureaasi: negatiivinen.

Kitiinin hydrolyysi: negatiivinen.

Viljely autotrofisessa väliaineessa (käyttäen (NH₄)₂SO₄ ainoana typpilähteenä): ei lainkaan kasvua; ei nitriittien muodostumista NH₄⁺-ionista.

Pridhamin menetelmän [Journal of Bacteriology, 56, 107-114, (1948)] periaatteiden mukaisesti M 78 -kanta pystyy käyttämään kes-

kinkertaisesti tai hyvin hiilen lähteenä seuraavia aineita: tärkkelys, etanoli, natriumasetaatti, natriumpropionaatti, meripihkahappo, maleiinihappo, natriumsitraatti, natriumpyruvaatti. Se ei pysty käyttämään tai käyttää vain heikosti seuraavia aineita: riboosi, arabinooosi, glukoosi, laktoosi, maltoosi, sakkarooosi, trehaloosi, glyseroli, mannitoli, inositoli, glutaarihappo, natriumtartraatti, galakturonihappo.

Ne typpilähteet, joita M 78 -kanta pystyy käyttämään hyväksi kasvussaan, on tutkittu tällä samalla Pridhamin menetelmällä käyttäen hiilen lähteenä natriumsitraattia ja korvaten perusväliaineen $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ useilla erilaisilla typpeä sisältävillä yhdisteillä. Näissä olosuhteissa kanta pystyy käyttämään joko hyvin tai keskinkertaisesti seuraavia yhdisteitä: NaNO_3 , NaNO_2 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, DL-asparagiini, sukkiini-imidi, glysiini, DL-alaniini, DL-asparagiinihappo, DL-(+) glutamiinihappo, L-(-) tyrosiini, DL-proliini. Seuraavat eivät ole käyttökelpoisia typen lähteinä: adeniini, urasiili, kreatiiniini, D-(+) glukosamiini, sarkosiini, L-(+) arginiini, DL-metioniini, beta-iini.

Tutkittaessa bakteerisoluja julkaisussa "Bergeys's Manual of Determinative Bacteriology", 7. painos, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1957, esitetyn identifioimiskaavion mukaan, kävi ilmi, että bakteerisolut eivät sisällä lainkaan fotosyntetisiä pigmenttejä, ne eivät pysty kasvamaan autotrofisessa väliaineessa, ne lisääntyvät jakautumalla, ovat pallomaisia, erillisiä, lyhyinä ketjuina tai epäsäännöllisinä kasautumina ja niissä ei ole trikomeja ja tämän perusteella kannan M 78 voidaan katsoa kuuluvan luokkaan Eubacteriales (Buchanan, 1971).

Toisaalta M 78 -bakteeri on pallomainen, Gram-positiivinen, pelkästään aerobinen, pelkistää nitraatit nitriiteiksi, ei pysty käyttämään anaerobisesti hiilihydraatteja eikä muodosta itiöitä: näiden ominaisuuksien perusteella sen voidaan katsoa kuuluvan heimon Micrococcaceae (Pridham, 1929).

Tämä heimo jakaantuu kuuteen sukuun, jotka puolestaan on jaettu kahteen ryhmään hengitystavan mukaan: tämän jaon perusteella M 78 -bakteeri voidaan luokitella ensimmäiseen ryhmään, joka käsittää suvut Micrococcus, Staphylococcus, Gaffkya ja Sarcina. Tämä ryhmä puolestaan jaetaan kahteen alaryhmään sen mukaan miten solut ovat

ryhmittyneet. Tutkitut solut eivät esiinny systemaattisesti tetraedrimalaisissa muodostelmissa tai kahdeksan solun paketeissa: tämän ominaisuuden perusteella M 78 -kanta on luokiteltava kuulumaan joko *Micrococcus*- tai *Staphylococcus*-sukuun.

Monien ominaispiirteiden perusteella ja etenkin siksi, että M 78 -kanta ei kykene käyttämään glukoosia anaerobisesti ja että se on pelkästään aerobinen, tämän kannan on katsottava kuuluvan *Micrococcus*-sukuun.

Jotta suvun määrittäminen olisi vieläkin tarkempi, suoritettiin lukuisia vertailukokeita *Staphylococcus aureus* 209 P:llä, *Neisseria catarrhalis* A 152:lla (IP), *Streptococcus faecalis* ATCC 8043:lla, *Streptococcus faecalis* ATCC 9790:llä ja näiden kokeiden perusteella pystyttiin eliminoimaan nämä kokkisolusuvut, joista eräät kuuluvat muuhun kuin *Micrococcaceae*-heimoon.

Micrococcus-sukuun kuuluvista 16 kuvatusista lajista lähimpänä M 78 -kantaa ovat seuraavat: *Micrococcus varians*, *Micrococcus caseolyticus* ja *Micrococcus colpogenes*.

M 78 -kanta eroaa selvästi *Micrococcus variansista* sikäli, ettei se muodosta happoja glukoosista, laktoosista, sakkaroosista, glyserolista, mannitolista eikä tee maitoa happameksi.

Se eroaa *Micrococcus caseolyticuksesta* siinä, ettei se nesteytä gelatiinia, ei peptonisoi maitoa, eikä tuota happoja glukoosista, laktoosista, mannitolista ja glyserolista.

M 78 -kanta eroaa niin ikään *Micrococcus colpogeneksesta* siinä, että oleellisesti siinä, että se ei kykene hydrolysoimaan kitiiiniä ja on lisäksi ureaasi-negatiivinen.

Tutkitulla bakteerikannalla on *Micrococcus*-suvun kuvattuihin lajeihin nähden niin selviä eroja, että sitä on pidettävä uutena lajina.

41200 RP:n valmistamiseen käytettyjen solujen valmistusmenetelmä käsittää *Micrococcus sedogenes* M 78-kannan viljelemisen väliaineessa sopivissa olosuhteissa ja viljelyn kuluessa lisääntyneiden solujen erottamisen.

Micrococcus sedogenes M 78:n viljeleminen voidaan suorittaa millä tahansa aerobisella viljelymenetelmällä alustalla tai sisällä ravintoväliaineessa, mutta jälkimmäinen on suositeltavampi mukavuussyistä. Tähän tarkoitukseen käytetään käymisteollisuudessa yleisessä käytössä olevia ympäys- ja käyttämismenetelmiä ja erilaisia laitteita.

Käymisväliaineen täytyy sisältää oleelliset assimiloituvan hiilen, typen, fosforin ja rikin lähteet, hivenaineita ja haluttaessa kasvua edistäviä aineita, ja kaikki nämä aineosat voidaan lisätä erillisinä tuotteina tai monimutkaisina seoksina, jollaisia ovat eri alkuperää olevat biologiset tuotteet.

Assimiloituvan hiilen lähteinä voidaan käyttää hiilihydraatteja, kuten dekstriinejä, tärkkelystä tai sitten muita hiiltä sisältäviä aineita, kuten alkoholeja (etanolia) tai tiettyjä orgaanisia happoja: maitohappoa tai sitruunahappoa. Tiettyt eläin- ja kasviöljyt, kuten laardiöljy ja soijaöljy voivat hyvin korvata nämä erilaiset hiilen lähteet tai niitä voidaan käyttää näiden ohella.

Sopivia assimiloituvan typen lähteitä on erittäin paljon. Ne voivat olla yksinkertaisia kemiallisia yhdisteitä, kuten epäorgaanisia ja orgaanisia ammoniumsuoloja tai tiettyjä aminohappoja. Voidaan myös käyttää tyyppä proteiinimuodossa sisältäviä lähteitä, kuten kaseiinia, laktalbumiinia, gluteenia ja niiden hydrolysaatteja, soija-, maapähkinä- ja kalajauhoa liha- ja hiivauutetta, alkoholia viljasta tislattaessa jääviä liukenevia jätteitä, (distiller's solubles) maissin liuotusnestettä (corn-steep).

Rikkiä ja fosforia on yleensä riittävästi edellä mainituissa monimutkaisissa aineissa. Niitä voidaan kuitenkin yhtä hyvin lisätä sulfaatteina ja fosfaatteina.

Joillakin lisätyistä epäorgaanisista aineosista voi olla puskuroiva tai neutraloiva vaikutus, kuten alkalimetalli ja maa-alkalimetallien fosfaateilla tai kalsiumin ja magnesiumin karbonaateilla. Eräät muut saavat aikaan *Micrococcus sedogenes* M 78:n kehittymiselle välttämättömän ionitasapainon, kuten alkalimetallien ja maa-alkalimetallien kloridit ja sulfaatit tai sinkin, koboltin, kuparin tai mangaanin suolat.

Väliaineen pH:n on oltava käymisen alussa 6,0 - 7,8 ja mieluiten 6,5 - 7,5. Optimaalinen käymislämpötila on 25-30°C, mutta tyydyttävään tulokseen päästään, kunhan lämpötila on 20-35°C.

Käymisen ilmastus voi vaihdella varsin laajoissa rajoissa. On kuitenkin todettu, että 0,3 - 3 litraa ilmaa yhtä litraa kohden lientä yhden minuutin aikana on erityisen sopiva ilmastus. Maksimisaantoon päästään 8-20 tunnin viljelyn jälkeen yleensä 15 tunnin viljelyn jälkeen, mutta tämä aika riippuu oleellisesti käytetystä väliaineesta.

Käymisväliaineen pH viljelyn päättyessä on yleensä 7,3 - 8,8 ja on suositeltavaa, että se olisi 8,0 - 8,4.

Micrococcus sedogenes M 78 -mikro-organismi erotetaan sitten käymisväliaineesta suodattamalla tai sentrifugoimalla ja on edullista tehdä se vasta, kun väliaineen pH on säädetty arvoon 3 lisäämällä jotakin epäorgaanista happoa, kuten kloorivetyhappoa.

Näin saatua solujen raakatuotetta voidaan käyttää sellaiseen myöhemmissä toimenpiteissä tai sille voidaan suorittaa vedenpoisto lyofilisoimalla tai pesemällä alkoholilla tai asetonilla ja kuivata se sitten alennetussa paineessa, jolloin saadaan kuivia puhdistettuja soluja. Voi olla erityisen edullista kuumentaa saadut solut 120-130°C:seen 30-60 minuutiksi ennen niiden myöhempää käyttöä.

Tämän keksinnön mukaisella uudella aineella 41200 RP on huomattavia käyttökelpoisia biologisia ominaisuuksia.

Suonensisäisesti, ihonalaisesti, intraperitoneaalisesti tai intranasaalisti hiirille annettuna keksinnön mukainen aine lisää merkittäväällä tavalla niiden kykyä vastustaa infektioita, joita niille on aiheutettu normaalisti tappavilla annoksilla tarttuvia bakteerikantoja, kuten *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, tai viruksia, kuten enkefalomyokardiitin, maksatulehduksen, influenssan (hiirille sovellettuja ihmisillä esiintyviä viruksia, tyypit A₀ ja A₂) ja herpesen aiheuttavat virukset sekä arbovirus Semliki-Forest. Vastustuskyky säilyy 96 tuntia käsittelyn jälkeen.

Parenteraalisesti hiirille annettuna tuote voimistaa selvästi retikulo-endotelialaisen järjestelmän fagosyyttistä kykyä ja lisää pernassa vasta-aineita tuottavien lymfosyyttien määrää. Sillä on viivästyneitä yliherkkyyssreaktioita ja tiettyjen antigeenien vasta-aineiden tuottoa stimuloiva vaikutus.

Tällä tuotteella on kasvaimen hylkimistä suosiva vaikutus hiirissä, joihin on istutettu kasvainsoluja (kuten sarkooman 180 soluja), sillä se aiheuttaa nekroottisen reaktion kasvaimen pinnassa.

Eräissä olosuhteissa keksinnön mukainen tuote lisää pernan T-lymfosyyttien lukumäärää ja/tai niiden sytolyyttistä vaikutusta allogeenisia kasvainsoluja vastaan.

Eläimillä (hiirillä) suoritettujen kokeiden ja käytettyjen antamistapojen mukaan aktiiviset vaikuttavat annokset ovat välillä

0,03 - 3 mg/kg ja mieluummin 0,3 - 1 mg/kg. Yleensä yksi ainoa käsitteily riittää saamaan aikaan halutun vaikutuksen vähintään 48 tunnin ajaksi.

Suonensisäisesti annettuna 41200 RP:n 50-%:isesti tappava annos (DL_{50}) on hiirillä noin 23 mg/kg.

Seuraavassa:

proteiinit on ilmoitettu aminohappoanalyysin mukaan,

glukoosi on määritetty antronimenetelmällä,

fosfori on määritetty molybdaattimenetelmällä mineralisoinnin jälkeen,

nukleiinihappojen pitoisuus on määritetty niiden absorbanssin perusteella aaltopituudella 258 nm,

aminosokerit on määritetty Elson-Morganin menetelmällä ja ilmaistu glukosamiinina tai sitten määrittämällä ninhydriinillä hydrolyysin ja erottamisen jälkeen Biotronic LC 6000 E-automaattista analysaattoria käyttäen.

Seuraavat esimerkit osoittavat miten keksintö voidaan käytännössä toteuttaa.

Esimerkki 1

(A) - Solujen valmistaminen

Pantiin 170 litran käymisastiaan seuraavat ainekset:

peptoni	1 200 g
lihauute	600 g
soijaöljy	1 200 cm ³

vesijohtovettä, kunnes tilavuus on 110 l.

pH säädettiin 6,90:ksi lisäämällä 10 N natriumhydroksidia, minkä jälkeen väliaine steriloitiin antamalla 122°C:sen vesihöyryn kuplia siihen 40 minuutin ajan. Jäähdytyksen jälkeen liemen tilavuus oli tiivistyneen vesihöyryn vuoksi noussut 120 litraksi; väliaineen pH oli 6,70. Liemeen ympätettiin 200 ml Micrococcus sedogenes M 78 -kantaa erlenmeyerpullosta samalla ravistellen sitä välillä.

Viljelmää kasvatettiin 27°C:ssa 14 tunnin ajan koko ajan sekoittaen ja ilmastaen sitä steriloidulla ilmalla; näin se saatiin sopivaksi tuotantoviljelmän ymppäämiseen.

Tuotantoviljely tapahtui 800 litran käymisastiassa, johon oli lisätty seuraavat aineet:

L-maitohappoa	4 kg
soijaöljyä	2 litraa
ammoniumsulfaattia	2,4 kg
natriumkloridia	2 kg
monokaliumfosfaattia	0,4 kg
magnesiumsulfaattia, 7 H ₂ O	0,8 kg
kuparisulfaattia, 5 H ₂ O	0,02 kg
sinkkisulfaattia, 7 H ₂ O	0,012 kg
kobolttikloridia, 6 H ₂ O	0,008 kg
vesijohtovettä tarvittava määrä	370 litraan

Väliaineen pH säädettiin 7,10:ksi lisäämällä 2 930 ml 10N natriumhydroksidia, minkä jälkeen liemi steriloitiin antamalla 122°C:sen vesihöyryn kuplia siihen 40 minuutin ajan. Steriloinnin aikana tiivistyneen vesihöyryn takia liemen tilavuus oli jäähtymisen jälkeen 400 litraa; sen pH, joka oli 4,20, säädettiin 6,60:ksi lisäämällä 2 100 ml natriumhydroksidin 5N vesiliuosta.

Ympäys suoritettiin sitten 40 litralla edellä kuvatulla tavalla 170 litran käymisastiassa valmistettua ympäysviljelmää. Viljelmää kasvatettiin 27°C:ssa 16 tunnin ajan sekoittaen sitä 205 kierrosta minuutissa pyörivällä turpiinilla ja ilmastaen steriilillä ilmalla 15 m³ tunnissa.

Toimenpiteen päättyessä viljelmän pH oli 8,20 ja liemen tilavuus oli 440 litraa.

Näin saatu mäski jäähdytettiin +4°C:seen ja sen pH säädettiin arvoon 3 lisäämällä 4 litraa 5N kloorivetyhappoa. Solut erotettiin sentrifugoimalla 4 000 kierrosta minuutissa (2 900 g).

Soluja sekoitettiin sitten 80 litrassa -10°C:sta etanolia. 15 minuutin ajan, minkä jälkeen ne erotettiin sentrifugoimalla ja kuivattiin 35°C:ssa alennetussa paineessa (5 mm/Hg) 15 tuntia.

Näin saatiin 1 500 g kuivia soluja.

(B) - 32919 RP:n valmistaminen

Suspendoitiin 1 kg edellä kohdassa A kuvatulla tavalla valmistettuja soluja 40 litraan steriloitua tislattua vettä ruostumattomasta teräksestä valmistetussa reaktioastiassa, joka oli varustettu kaksinkertaisella, kiertävän veden avulla termostoidulla vaijalla ja tehokkaalla sekoittimella. pH säädettiin arvoon 7,0 lisäämällä 10N natriumhydroksidia.

Sitten lisättiin 2 g lysotsyymiä ja sekoitettiin kaksi tuntia 37°C:ssa sääten pH ajoittain uudelleen arvoon 7,0 lisäämällä 5N natriumhydroksidia.

Seos sentrifugoitiin sitten Sharples M16-laitteella (kaksi peräkkäistä suoritusta, 17 000 kierrosta minuutissa, virtaus 30 litraa tunnissa). Supernatantti (37 l) ultrasuodatettiin (UFP 20-laite, varustettu IRIS 3042-akryylikalvolla) kierrättäen retentantti uudelleen ja lisäten kolme kertaa 40 litraa demineralisoitua +4°C:seen jäähdytettyä vettä.

Näin koottiin 7 litraa konsentroitua retentanttia, josta pienet molekyylit oli poistettu (molekyyllipaino alle 25 000 daltonia). Sen pH säädettiin uudelleen arvoon 7 5N natriumhydroksidiliuoksella, minkä jälkeen tämä liuos lyofilisoitiin.

Näin saatiin 147 g raakatuotetta.

Liuotettiin 31 g tätä tuotetta 1 550 ml:aan demineralisoitua vettä noin 20°C:sta ja sekoitettiin 30 minuuttia; sitten lisättiin viiden minuutin aikana koko ajan sekoittaen 31 ml vesiliuosta, joka sisälsi 668 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; sekoitusta jatkettiin vielä 30 minuuttia. Muodostunut saostuma poistettiin sentrifugoimalla laboratoriotarkoituksiin tarkoitettulla Sharples-laitteella nopeudella 40 000 kierrosta minuutissa virtaaman ollessa 5 litraa tunnissa. Supernatanttia dialysoitiin selluloosakalvolla kolmen vuorokauden ajan +4°C:ssa käyttäen kolme kertaa 40 litraa demineralisoitua vettä.

Retentanttia käsiteltiin sitten pyöreässä kolvissa 310 ml :lla sulfoni-ioneja sisältävää natriummuodossa olevaa DOWEX 50 X2-polystyreenihartsia sekoittaen tunnin ajan; hartsi suodatettiin ja pestiin suodattimella 310 ml :lla vettä.

Pesuedet yhdistettiin suodokseen ja yhdistelmä lyofilisoitiin.

Näin saatiin 17 g suolamuodossa olevaa 32919 RP:tä, jonka ominaisuudet olivat seuraavat:

ulkonäkö: valkea jauhe,

koostumus: vettä (Fischer) % = 15,7; kuivana: proteiineja % (aminohappoina) = 24,6; polysakkarideja % = 3,9.

Alkuaineanalyysi:

C % = 46,30 H % = 5,84 O % (erotuksena = 30,71),

N % = 10,04 P % = 3,11 S % alle 0,5

Na % = 3,70 Ca % = 0,30

(C) - 32919 RP:n puhdistaminen

Liuotettiin 25 g esimerkin (B) olosuhteissa saatua ainetta 32919 RP 1 litraan demineralisoitua vettä 2 litran reaktorissa, joka oli varustettu sekoittimella ja lämpötilan säätämislaitteella; lisättiin 1 litra fenolin ja veden seosta (109 cm^3 vettä/1 kg fenolia). Seos kuumennettiin 65°C :seen sekoittaen koko ajan voimakkaasti. Sekoitusta jatkettiin vielä 30 minuuttia tässä samassa lämpötilassa. Sen jälkeen reaktioastia jäähdytettiin nopeasti jäähauteella noin 25°C :seen ja erotettiin faasit sentrifugoimalla 30 minuuttia laboratorioskäyttöön tarkoitettulla jäähdytetyllä laitteella (3 300 $\overline{\text{g}}$, JOUAN, tyyppi K 63 F, kapasiteetti 4 litraa).

Näin saatiin 450 ml vesifaasia.

Fenolifaasia ja välifaasia uutettiin uudelleen 1 litralla demineralisoitua vettä 30 minuutin ajan 65°C :ssa; edellä kuvatun mukaisen jäähdytyksen ja sentrifugoinnin jälkeen saatiin jälleen $1\,470 \text{ cm}^3$ vesifaasia.

Vesifaasit yhdistettiin. Fenoli poistettiin pesemällä kaksi kertaa peräkkäin 2 litralla kloroformia. Vesifaaseja kirkastettiin sitten sentrifugoimalla niitä 30 minuuttia (3 300 $\overline{\text{g}}$). Näin saatiin $1\,800 \text{ cm}^3$ vesifaasia.

Tätä kirkastettua vesifaasia dialysoitiin neljä vuorokautta $+4^\circ\text{C}$:ssa 40 litraa demineralisoitua vettä vastaan 3 kertaa. Retentantti lyofilisoitiin ja saatiin näin 14,5 g valkeaa amorfista jauhetta.

Liuotettiin 8 g tätä jauhetta 400 ml:aan steriiliä 0,1M natriumasetatipuskuriliuosta, jonka pH on 7 (liuotettiin 136,09 g analyysikelpoista natriumasetattia 0,9 litraan demineralisoitua vettä, minkä jälkeen pH säädettiin arvoon 7,0 lisäämällä etikkahappoa ($d = 1,048$) ja täydennettiin litraksi; sterilointi suoritettiin kuumentamalla liuos 45 minuutiksi 122°C :seen; tämä liuos laimennettiin suhteessa 1/10 steriilillä demineralisoidulla vedellä juuri ennen käyttöä).

Saatu liuos kaadettiin SEPHAROSE CL 4B ^(R) -patsaaseen (läpimitta: 13,5 cm, korkeus: 65 cm), joka oli sijoitettu kylmään tilaan ($+4^\circ\text{C}$) ja täytetty steriilillä natriumasetatipuskurilla, jonka pH oli 7. Eluointi suoritettiin tällä samalla puskurilla virtauksen ollessa 1,33 litraa tunnissa ja mitattiin jatkuvasti absorbanssi aallonpituudella 230 nm 0,1 cm paksusta eluaattikerroksesta.

Koottiin ensiksi 3,13 litran fraktio, joka hylättiin. Seuraava fraktio (1,22 litraa), joka antoi absorbanssipiikin 230 nm:lla, pantiin NOJAX^(R)-regeneroitua selluloosaa olevaan putkeen ja dielysoitiin +4°C:ssa kolmen vuorokauden ajan käyttäen kolme kertaa 40 litraa demineralisoitua vettä ja lyofilisoitiin sitten retentantti (1 300 ml). Saatu kiinteä aine liuotettiin 93 ml:aan demineralisoitua vettä ja liuosta dialysoitiin käyttäen samaa kalvoa kuin edellä 48 tuntia +4°C:ssa 20 litraa demineralisoitua vettä vastaan 2 kertaa. Retentantti lyofilisoitiin.

Näin saatiin 1,3 g ainetta 41200 RP, jonka ominaisuudet ovat seuraavanlaiset:

Ulkonäkö: valkea amorfinen jauhe.

UV-spektri: spektri on esitetty kuviossa 1.

IR-spektri: (ajettu aineen ja KBr:n seoksesta puristetulla tabletilla). Spektri on esitetty kuviossa 2, josta käyvät ilmi abskissalta toisaalta aaltopituudet mikroneina (ylempi asteikko) ja toisaalta aaltoluvut cm^{-1} :na (alempi asteikko) ja ordinaatalta transmissioprosentit.

Seuraavasta taulukosta käyvät ilmi aineen 41200 RP tärkeimmät infrapuna-absorptiovyöt ilmaistuna aaltolukuina (cm^{-1}):

3 420 cm^{-1} tF (jossa H_2O)	1 440 cm^{-1} ép.	900 cm^{-1} f
3 280 cm^{-1} ép.	1 405 cm^{-1} ép.	875 cm^{-1} f
3 090 cm^{-1} ép.	1 375 cm^{-1} F	800 cm^{-1} m
2 970 cm^{-1} ép.	1 335 cm^{-1} ép.	775 cm^{-1} f
2 950 cm^{-1} ép.	1 310 cm^{-1} m	720 cm^{-1} ép.
2 920 cm^{-1} F	1 230 cm^{-1} m	630 cm^{-1} ép.
2 845 cm^{-1} m	1 210 cm^{-1} ép.	560 cm^{-1} F (jossa
2 680 cm^{-1} ép.	1 160 cm^{-1} F	520 cm^{-1} ép. H_2O)
2 100 cm^{-1} tf	1 115 cm^{-1} F	480 cm^{-1} ép.
1 730 cm^{-1} ép.	1 060 cm^{-1} tF	450 cm^{-1} ép.
1 645 cm^{-1} tF	1 025 cm^{-1} ép.	400 cm^{-1} ép.
1 545 cm^{-1} F	945 cm^{-1} m	365 cm^{-1} ép.
1 460 cm^{-1} ép.		

tF = hyvin voimakas

f = heikko

F = voimakas

tf = hyvin heikko

m = keskimääräinen

ép = käännepiste

Koostumus: vettä (Fischer) % = 3,8; kuivana: aminohappoja %: 12,3 (josta 7 % alaniinia); glukoosia %: 11,95; nukleiinihappoja %: alle 1,3 (UV-spektrin mukaan); aminosokereita % : 16,3.

Alkuaineanalyysi: C % = 45,58 H % = 7,47 N % = 4,85
O % = 37 P % = 1,17 Cl % = 0,25 Na % = 2,36 Ca % = 1,33
S % = alle 0,5.

Elektroforeesi: Barbitaalilla pH 8,6:een puskuroidussa 1-%:isessa agarosigeelissä jännitteellä 6 V/cm 41200 RP vaeltaa kohti anodia nopeudella noin 11 mm/tunnissa. (Tuote saadaan näkyviin Schiffin reagenssilla jaksoittaisen hapetuksen jälkeen tai Soudan B-mustalla.)

Esimerkki 2

Meneteltiin, kuten esimerkissä 1(A). 16 tunnin viljelyn jälkeen mäski jäähdytettiin 4°C:seen ja sen pH säädettiin arvoon 3 liisäämällä kloorivetyhappoa. Solut erotettiin sentrifugoimalla 4 000 kierrosta minuutissa. Hapan solukakku kuumennettiin sitten autoklaavissa 45 minuutiksi 122°C:seen. Jäähdytyksen jälkeen solut pestiin etanolilla ja kuivattiin.

Menetellen sitten samoin kuin esimerkissä 1(B) ja 1(C) ja käyttäen samoja ainemääriä, saatiin 0,55 g ainetta 41200 RP valkeana amorfisena jauheena, jolla oli seuraavat ominaisuudet:

Koostumus: vettä (Fischer) % = 6; kuivana: aminohappoja %: 17,7 (josta alaniinia 7,2 %); glukoosia %: 10,5; nukleiinihappoja %: alle 3; aminosokereita : 15,2.

Alkuaineanalyysi: C % = 46,90 H % = 7,32 N % = 5,38
O % = 35 P % = 1,08 Cl % = 0,18 Na % = 2,26 Ca % = 1,83
S % = alle 0,5.

Tämän tuotteen IR-spektri on identtinen esimerkissä 1 saadun IR-spektrin kanssa.

Patenttivaatimus

Menetelmä uuden biologisesti aktiivisen aineen valmistamiseksi, jota merkitään numerolla 41 200 RP ja joka on eristetty soluista, jotka on saatu viljelemällä *Micrococcus sedogenes* M 78 -bakteerikantaa väliaineessa, joka sisältää oleellisesti assimiloituvien hiilen, typen ja rikin lähteitä sekä mineraalisuoloja, jolloin 41 200 RP on amorfinen jauhe, joka vedettömässä olotilassa koostuu 11-18%:sta aminohappoja, 10-17%:sta glukoosia, 10-17%:sta aminosokereita ja alle 3%:sta nukleiinihappoja ja jonka alkuainekoostumus on suunnilleen seuraava:

C % = 45-47, H % = 7,1-7,6, O % = 35-38, N % = 4,0-5,7, P % = 0,9-1,2, Cl % = 0,1-0,4, S % = alle 0,5, Na % = 2,0-3,0, Ca % = 0,9 - 1,9.

ja jonka UV-spektri on esitetty kuviossa 1 ja IR -spektri kuviossa 2 ja jonka liukoisuus veteen on noin 20 mg/ml ja jolla on immuno-stimuloivia ominaisuuksia, t u n n e t t u siitä, että

a) *Micrococcus sedogenes* M 78 -kannan (NRRL B - 3505) solujen vesisuspensiota käsitellään lysotsyymillä vakio pH-arvossa 6,5-8, 1-3 tunnin ajan lämpötilassa noin 37°C,

b) raakatuote erotetaan suolana saadun suspension nestefaa-sista ja puhdistetaan kalsiumkloridilla sellaisen aineen saamiseksi, jota merkitään numerolla 32 919 RP, ja

c) aine 32 919 RP puhdistetaan käsittelemällä sen vesiliuosta fenolilla, minkä jälkeen fraktioidaan molekyyliseulalla ja otetaan talteen korkean molekyylipainon omaava fraktio ja tästä eristetään aine 41 200 RP.

Patentkrav

Förfarande för framställning av ett nytt biologiskt aktivt ämne, vilket betecknas med nummer 41 200 RP och vilket isolerats ur celler erhållna genom att odla bakteriestammen *Micrococcus sedo-genes* M 78 i ett medium innehållande källor av väsentligen assimilerbart kol, kväve och svavel samt mineralsalter, varvid 41 200 RP är ett amorft pulver, vilket i vattenfritt tillstånd består av 11-18% aminosyror, 10-17% glukos, 10-17% aminosocker och under 3% nukleinsyror och vars grundämnessammansättning är ungefär följande: C % = 45-47, H % = 7,1-7,6, O % = 35-38, N % = 4,0-5,7, P % = 0,9-1,2, Cl % = 0,1-0,4, S % = alle 0,5, Na % = 2,0-3,0, Ca % = 0,9-1,9 och vars UV-spektrum anförts i figur 1 och IR-spektrum i figur 2 och vars löslighet i vatten är cirka 20 mg/ml och vilket har immunostimulerande egenskaper, k ä n n e t e c k n a t därav, att

a) en vattensuspension av celler av bakteriestammen *Micrococcus* M 78 (NRRL B- 3505) behandlas med lysozym vid ett konstant pH-värde av 6,5-8 under en tid av 1-3 timmar vid en temperatur av cirka 37°C,

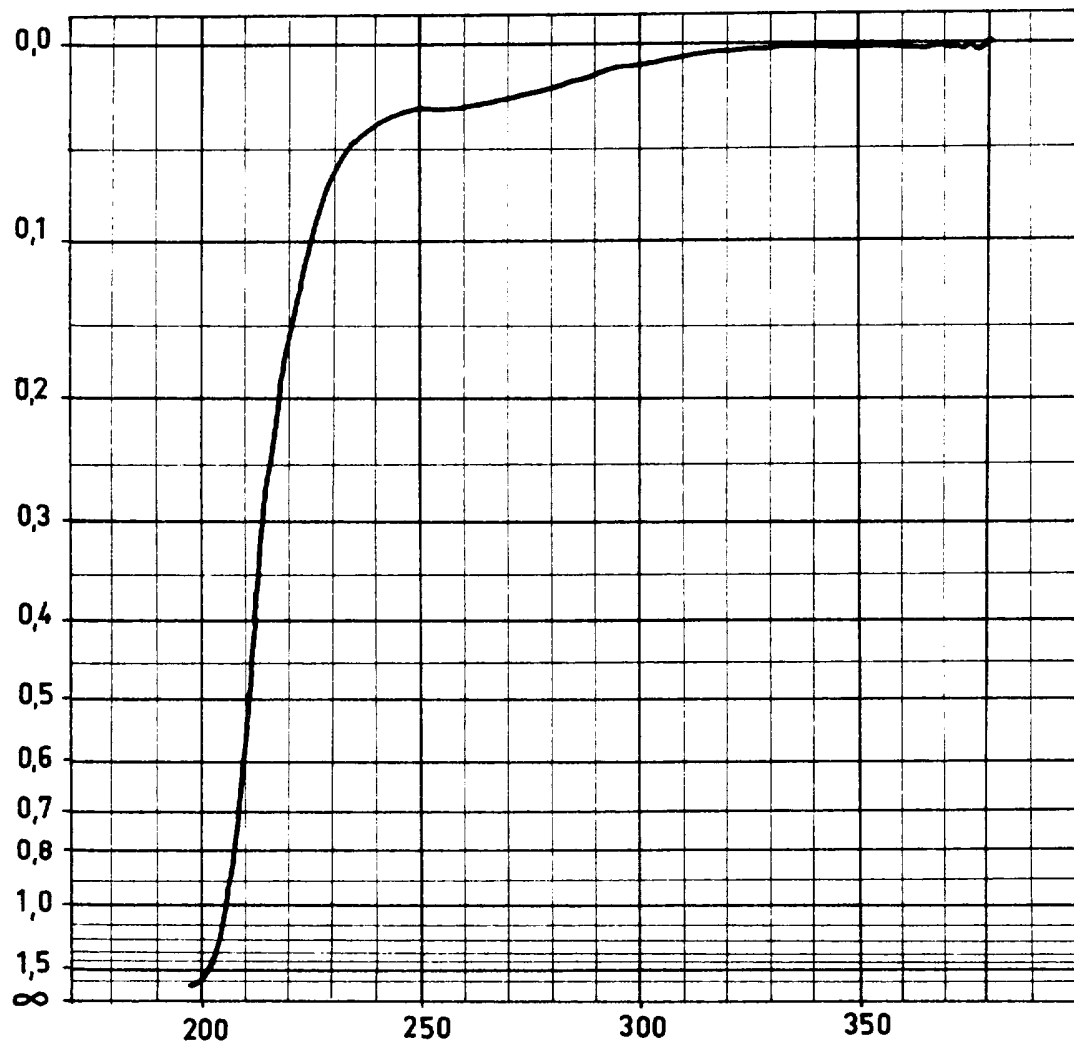
b) råprodukten separeras i form av ett salt från vätskefasen av den erhållna suspensionen och renas med kalsiumklorid för erhållande av ett ämne, vilket betecknas med nummer 32 919 RP, och

c) ämnet 32 919 RP renas genom att behandla dess vattenlösning med fenol, varefter fraktioneras med en molekylsikt och fraktionen med hög molekylvikt tillvaratages och från denna isoleras ämnet 41 200 RP.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

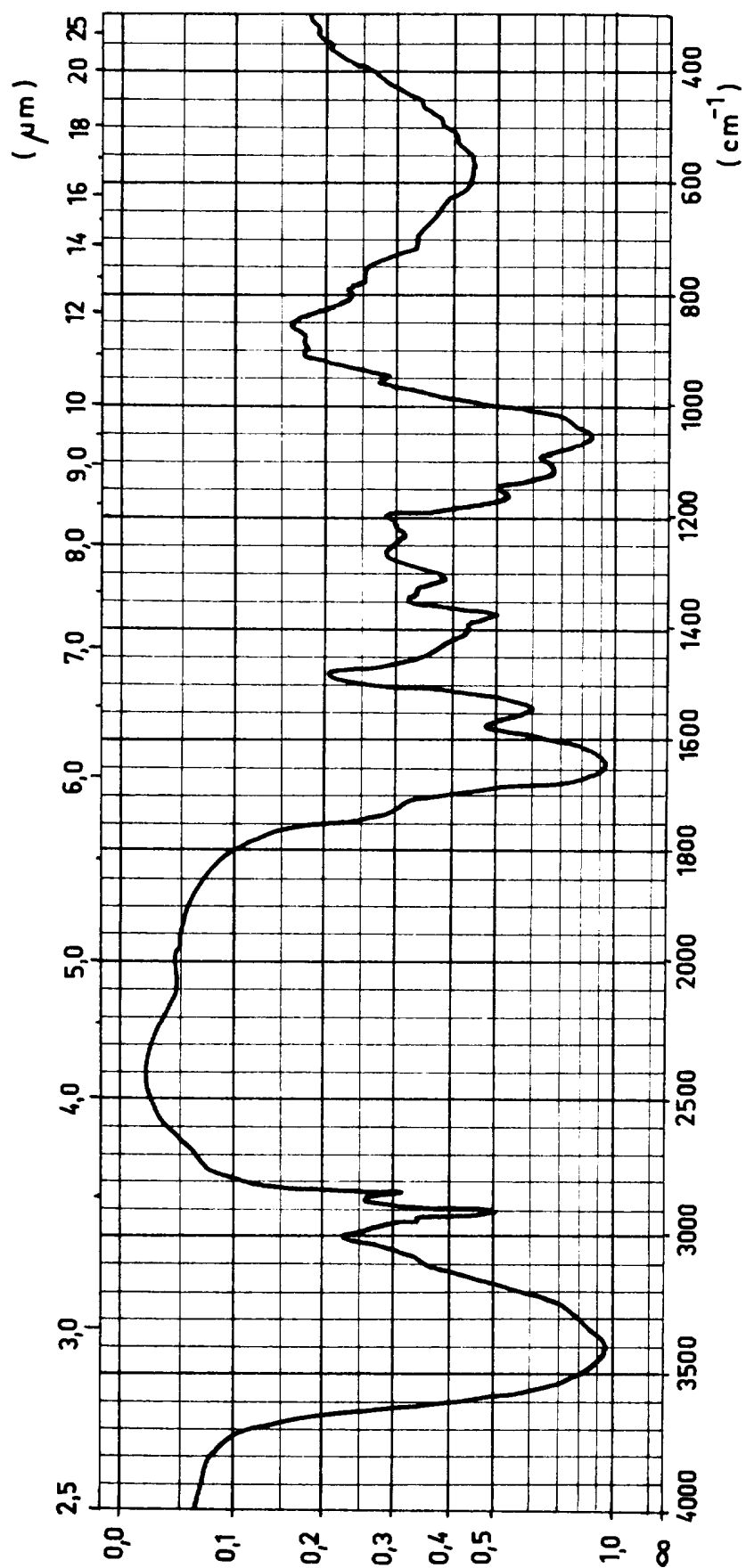
—

67571



KUV. 1

67571



KUV. 2