

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 910756 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 910756

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 17/18
C12N 1/20
C12R 1:55

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 15.02.1991

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 15.02.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 21.08.1991

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

20.02.1990 US 482390

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Bristol-Myers Squibb Company, 345 Park Avenue, New York, NY 10154, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Schroeder, Daniel R., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Lam, Kin Sing, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Mattei, Jacqueline M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Hesler, Grace A., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Fermentaatiomenetelmä staurosporiinin valmistamiseksi

Fermentationsförfarande för framställning av staurosporin

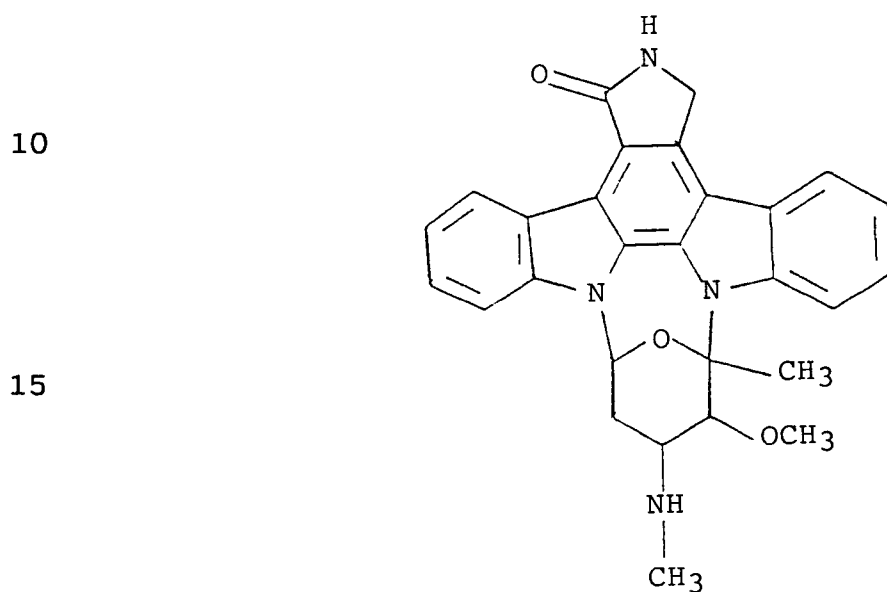
(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

53730 ATCC

Fermentaatiomenetelmä staurosporiinin valmistamiseksi

Tämä keksintö koskee uutta mikrobiologista menetelmää alkaloidiyhdisteen staurosporiinin valmistamiseksi.

5 Staurosporiini on tunnettu alkaloidiyhdiste, jolla on seuraavanlainen kaava



US-patentissa 4 107 297 esitellään staurosporiinin (josta käytetään viitteessä nimitystä AM-2282) valmistusfermentoimalla bakteeria.

25 Streptomyces staurosporeus uusi laji NRRL 11 184. Tietoja staurosporiinin molekyyli­rakenteesta on saatavissa julkaisusta J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1978 (1978) 800 - 801.

30 Staurosporiinilla tiedetään olevan mikrobeja tuhoava vaikutus (pääasiallisesti hiivoihin ja sieniin) ja sillä on myös selostettu olevan verenpainetta alentava vaikutus. US-patentissa 4 735 039 ilmoitetaan, että staurosporiinilla on myös hyönteisiä tuhoava vaikutus.

35 Tämä keksintö koskee uutta mikrobiologista menetelmää staurosporiinin valmistamiseksi. Uudessa menetelmässä viljellään staurosporiinia tuottavaa Streptomyces hygro-

scopicus -kantaa, edullisimmin *Streptomyces hygrosopicus* -kantaa C39280-450-9 (ATCC 53730) tai sen staurosporiinia tuottavaa mutanttia tai muunnosta, vesielatusaineessa, joka sisältää assimiloituvia hiilen ja typen lähteitä, vedenalaisissa aerobisissa olosuhteissa, kunnes mainittu organismi on tuottanut riittävän määrän staurosporiinia mainitussa kasvuliuksessa, ja sitten otetaan staurosporiini talteen mainitusta kasvuliuksesta.

Edullisimpana pidetty tämän keksinnön mukainen staurosporiinia tuottava organismi on uusi *Streptomyces hygrosopicus* -kanta, jota nimitetään tässä *Streptomyces hygrosopicus* -kannaksi C39280-450-9. Tämä kanta on eristetty maanäytteestä, joka on otettu Numazu-prefektuurissa Japanissa. Kannan C39280-450-9 biologisesti puhdas viljelmä on talletettu kokoelmaan the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, ja lisätty heidän pysyvään mikro-organismikokoelmaansa ATCC 53730:nä. Tätä viljelmää, nimitettynä C39280:ksi, säilytetään myös lepotilassa olevana viljelmänä lyofiiliputkissa ja kryogeenisissä pulloissa kokoelmassa the Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research and Development Division Culture Collection, 5 Research Parkway, Wallingford, Connecticut 06492.

Kannalle C39280-450-9 suoritettujen taksonomisten tutkimusten tulokset osoittavat, että kanta on uusi *Streptomyces hygrosopicus* -kanta. Kannalla C39280-450-9 on seuraavat ominaisuudet määritettynä käyttäen materiaaleja ja menetelmiä, joita ovat kuvanneet Shirling & Gottlieb (Int. J. Sept. Bacteriology 16 (1966) 313 - 340; *ibid.* 18 (1968) 69 - 189; *ibid.* 22 (1972) 265 - 394, Stanek & Roberts (Appl. Microbiol. 28 (1974) 226 - 231), K.P. Schaal (M. Goodfellow ja D.E. Minnikin toimittajat, Chemical Methods in Bacterial Systematics, Academic Press Inc., (1985) 359 - 381).

Morfologia

Kannan C39280-450-9 morfologisia ominaisuuksia ovat: 1) pirstoutumattomien, substraatti- ja ilmahuovastojen muodostaminen, 2) spiraalimaiset haarautuneista itiökannoista muodostuneiden artrosporien ketjut ilmahuovastossa, joissa itiöketjuissa on 2 - 6 kierrettä, 3) sileä itiökoristelu.

Viljely- ja fysiologisia ominaisuuksia

Viljelyominaisuuksista, jotka on havaittu deskriptiivisillä kasvualustoilla, on yhteenveto taulukossa 1. Hygroskooppiin muutos käy selvästi ilmi ISP-elatusaineessa n:o 4 ja muunnetussa Bennettin elatusaineessa. Liukenevaa perunatärkkelystä ja glukoosia käytetään kasvamiseen. Inositolin käyttö on kyseenalaista. Fysiologisista ominaisuuksista on yhteenveto taulukossa 2.

Soluseinän kemia

Kannan C39280-450-9 kokonaisten solujen hydrolysaattien analyysi paljasti LL-diaminopimeliinihapon, galaktoosin, riboosin ja mannoosin soluseinän komponenteiksi, minkä johdosta organismi on määriteltävä tyyppiä I olevan soluseinän omaavaksi. Fosfolipidianalyysi osoitti fosfatidyylietanoliiniin ja fosfatidyyliglyserolin läsnäolon määrittäen fosfolipidirakenteen PII:ksi.

Taulukko 1. Kannan C39280-450-9 viljelyominaisuuksia

<u>Agar-elatusaine</u>	<u>Kasvu</u>	<u>Kääntöpuolen väri</u>	<u>Ilmahuovasto</u>	<u>Pigmentti</u>
ISP 2	kohtalaista	väritön	kohtalainen	oksidikeltainen, 5C7
ISP 3	hyvää	väritön	runsas, vaaleanharmaa	ei mitään
ISP 4	kohtalaista	väritön	niukka, hygroskooppinen	ei mitään
ISP 5	heikkoa	väritön	ruskehtavan harmaa, 6F2	ei mitään
ISP 6	heikkoa	väritön	ei mitään	ei mitään
ISP 7	heikkoa	väritön	ei mitään	ei mitään
glukoosi-asparagiini	kohtalaista	kermanvärinen	ei mitään	ei mitään
Czapekin sakkaroosinitraatti	niukkaa	väritön	ei mitään	ei mitään
· · · ravintoaine	heikkoa	kellertävänvalkea, 3A2	ei mitään	ei mitään
· · · muunnettu Bennettin	kohtalaista	väritön	kohtalainen, hygroskooppinen	ei mitään
· · · laimea peruna-porkkana	heikkoa		kohtalainen harmaa ja valkea	ei mitään
· · · ATCC 5	kohtalaista	väritön	kohtalainen, harmaa	ei mitään
ATCC 172	kohtalaista	väritön	kohtalainen, valkea ja harmaa, 2B1	ei mitään
· · · peruna-dekstroosi	heikkoa	väritön	melkoinen; valkea ja harmaa	ei mitään
· · · tomaattimehu	hyvää	harmahtavan oranssi, 5B4	ei mitään	ei mitään
· · · trypsiini-soijapapu	heikkoa	kellertävänvalkea, 3A2	ei mitään	ei mitään
ksantiini	niukkaa	kellertävänvalkea, 3A2	ei mitään	ei mitään

Värien nimet ja numerot teoksesta A. Kornerup ja J.H. Wanschler, Reinhold Color Atlas, Reinhold Publishing Corporation, Kööpenhamina, Tanska, 1961.

5 Taulukko 2. Kannan C39280-450-9 fysiologisia ominaisuuksia

	kasvulämpötila	10 °C - 37 °C
	pH:n sieto	5,5 - 9
	NaCl:n sieto	1 % - 8 %
	gelatiinin nesteytys	+
10	tärkkelyksen hydrolyysi	+
	ureaasi	+
	maidon koagulointi	-
	peptonointi	+
	nitraatin pelkistys	-
15	lysotsyymi	-

20 Kannan C39280-450-9 morfologiset ominaisuudet ja solun kemia luokittelevat sen Streptomyces-lajiksi. Jatko-
luokittelun Streptomyces hygrosopicus -lajiksi vahvistavat organismin spiraalimaisten itiöketjujen ryhmittymisen ja myöhemmät hygroskoopiset ominaisuudet.

On selvää, että staurosporiinin tuottamiseksi tämän keksinnön mukaan ei tarkoiteta rajoituttavan yllä kuvattuun erityiseen edullisena pidettyyn kantaan. Erityisesti halutaan ja on tarkoitus sisällyttää keksinnön piiriin 25 muita staurosporiinia tuottavia Streptomyces hygrosopicus-kantoja, erityisesti talletetun kannan muunnoksia tai mutantteja, jotka on tuotettu käyttäen tunnettuja menetelmiä kuten säteilyttämistä röntgensäteillä tai ultraviolettivalolla, käsittelyä typpisinapeilla, faageille altistamista ja vastaavia.

Staurosporiinin valmistus

35 Staurosporiinia voidaan valmistaa tämän keksinnön mukaan viljelemällä staurosporiinia tuottavaa Streptomyces hygrosopicus -kantaa, edullisesti Streptomyces hygrosco-

picus -kantaa, jolla on kannan C39280-450-9 (ATCC 53730) identifiointiominaisuudet, tai sen mutanttia tai muunnosta, tavanomaisessa vesielatusaineessa. Organismia kasvatetaan elatusaineessa, joka sisältää tunnettuja ravintolähteitä actinomyces-bakteereja varten, s.o. assimiloituvia hiilen ja typen lähteitä sekä valinnaisia epäorgaanisia suoloja ja muita tunnettuja kasvutekijöitä. On edullista käyttää vedenalaisia aerobisia olosuhteita suurten määrien antibioottia tuottamiseksi, vaikka rajoitettujen määrien tuottamista varten voidaan myös käyttää pintaviljelmiä ja pulloja. Yleiset menetelmät, joita käytetään muiden actinomyces-bakteerien viljelyyn, sopivat käytettäväksi tässä keksinnössä.

Elatusaineen tulisi sisältää sopivan hiilen lähteen kuten sakkaroosia, laktoosia, glukoosia, ramnoosia, fruktoosia, glyserolia tai liukoista tärkkelystä. Tulisi myös käyttää assimiloituvaa typen lähdettä kuten kalajauhoa, peptonia, maapähkinäjauhoa, puuvillansiemenjauhoa tai maissinliotusliuosta. Elatusaineeseen voidaan myös sisällyttää epäorgaanisia ravintosuoloja tarjoamaan natrium-, kalium-, ammonium-, kalsium-, fosfaatti-, sulfaatti-, kloridi-, bromidi-, nitraatti-, karbonaatti- ja vastaavia ioneja.

Staurosporiinin tuottaminen voidaan toteuttaa missä tahansa lämpötilassa, joka osaltaan vaikuttaa tuottavan organismin tyydyttävään kasvuun, esim. 10 ° - 37 °C:ssa, ja suoritetaan sopivasti lämpötilassa noin 28 °C. Fermentaatio voidaan suorittaa pulloissa tai tilavuudeltaan erilaisissa laboratorio- tai teollisuusfermentoreissa. Kun on määrä käyttää säiliöfermentaatiota, on toivottavaa tuottaa vegetatiivinen istutusmateriaali ravintoliemessä istuttamalla pieneen tilavuusmäärään viljelyainetta tuottavan organismin vinopinta- tai lyofilisoitua viljelmää. Sen jälkeen kun on tällä tavalla saatu elinkykyinen ja aktiivinen istutusmateriaali, se siirretään aseptisesti fermentaatio-

säiliöön, johon on pantu tuottoelatusainetta staurosporin suuressa mittakaavassa tapahtuvaa tuottamista varten. Elatusaine, jossa vegetatiivinen istutusmateriaali valmistetaan, voi olla sama tai erilainen kuin se, jota käytetään säiliössä, kunhan se on sellaista, että aikaansaadaan tuottavan organismin hyvä kasvu. Sekoitusta fermentaation aikana voidaan aikaansaada mekaanisen juoksupyörän avulla. Tarvittaessa voidaan lisätä vaahdonestoaineita kuten laardiöljyä tai silikoniöljyä. Antibiootin tuotantoa voidaan tarkkailla korkeapainenestekromatografia (HPLC) -analyysin tai tavanomaisen biologisen määrittelyn avulla.

Sen jälkeen kun on aikaansaatava optimaalinen liemen väkevyys, staurosporiini voidaan ottaa talteen kasvuliuksesta käyttämällä tavanomaista uuttamista ja kromatografiatekniikkoja kuten on kuvattu alla esimerkissä 4.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän avulla saatu staurosporiini osoittaa kirjallisuudessa kuvattujen tunnetun antibiootin ominaisuuksien kanssa identtisiä ominaisuuksia.

Seuraavat esimerkit on esitetty ainoastaan tämän keksinnön valaisemiseksi eikä niiden ole tarkoitettu rajoittavan keksinnön piiriä missään suhteessa.

Esimerkki 1

Kannan C39280-450-9 kylmäsäilytysviljelmän valmistus

Kantaa C39280-450-9 säilytettiin kylmäsäilytysviljelmänä varastoituna -80 °C:een Revco- ultra-alhaisen lämpötilan jäädyttimeen. Kylmäsäilytysviljelmän valmistamiseksi kantaa C39280-450-9 siirrettiin koeputkiin ISP-elatusainetta n:o 4 (Difco) sisältäville agarvinopinnoille.

Agarvinopintaa inkuboitiin 28 °C:ssa 14 päivän ajan. Vegetatiivinen viljelmä valmistettiin siirtämällä pintakasvu vinopintaviljelmästä 500 ml:n erlenmeyerpulloon, joka sisälsi 100 ml seuraavan koostumuksen omaavaa steriiliä kasvatusliuosta

	glukoosi	20 g
	peptoni	5 g
	kalajauhouute	5 g
	hiivauute	3 g
5	CaCO ₃	4 g

deionoitu vesi riittävästi 1 litraan saakka

Tätä kasvavaa viljelmää inkuboitiin 28 °C:ssa 72 tunnin ajan kiertosekoituslaitteessa, jonka nopeudeksi oli säädetty 230 kierrosta minuutissa. Vegetatiivinen viljelmä sekoitettiin yhtä suuren tilavuusmäärän kanssa kylmäsuojaliuosta, jonka koostumus oli

	sakkaroosi	100 g
	glyseroli	200 g

deionoitu vesi riittävästi 1 litraan saakka

Viiden ml:n annoksia tätä seosta siirrettiin steriileihin kryogeenisiin putkiin (Nunc) ja jäädytettiin hiilihappojää-asetonihauteessa. Jäädytettyjä vegetatiivisia viljelmiä säilytettiin sitten -80 °C:ssa Revco- ultralhaisen lämpötilan jäädyttimessä.

20 Esimerkki 2

Kannan C39280-450-9 vegetatiivisen viljelmän valmistus

Vegetatiivinen viljelmä valmistettiin siirtämällä 5 ml kylmäsäilytysviljelmää 500 ml:n erlenmeyerpulloon, joka sisälsi 100 ml steriiliä kasvatusliuosta, jonka koostumus oli sama kuin esimerkissä 1 kuvatun kasvatusliuoksen. Kasvavaa viljelmää inkuboitiin 28 °C:ssa 72 tunnin ajan kiertosekoituslaitteessa, jonka nopeudeksi oli säädetty 250 kierrosta/min.

25 Esimerkki 3

Staurosporiinin fermentaatiotuottaminen ravistelupulloviljelmässä

Neljä ml esimerkin 2 menetelmän mukaan valmistettua vegetatiivista viljelmää istutettiin 500 ml:n erlenmeyerpulloihin, joista kukin sisälsi 100 seuraavan koostumuksen omaavaa tuotantoelatusainetta:

35

glukoosi 30 g
ravintosoija (Nutrisoy) 15 g
CaCO₃ 4 g

deionoitu vesi riittävästi 1 litraan saakka

5 Tuotantoviljelmää inkuboitiin 28 °C:ssa kiertosekoituslaitteessa, jonka nopeudeksi oli säädetty 250 kierrosta/min. Staurosporiinin tuotantoa tarkkailtiin HPLC-analyysin avulla. Suuruudeltaan 130 µg/ml oleva optimituotto saavutettiin 6 päivän fermentoinnin kuluttua.

10 Esimerkki 4

Staurosporiinin eristäminen ja puhdistaminen

Esimerkin 3 yleisen menetelmän mukaan saatu täydellinen liemi (10 l) suodatettiin käyttäen Dicalite-suodatuksen apuainetta. Sen jälkeen kun huovastoa oli sekoitettu tetrahydrofuraanissa (THF) (2 litraa) yhden tunnin ajan, se suodatettiin ja huuhdottiin lisämäärällä asetonia (1 litra). Suodos väkevöitiin alennetussa paineessa vesikerrokseksi, tilavuutta suurennettiin suolavedellä (1 litra) ja vesikerrosta uutettiin kloroformilla (1 litra, 2x), jolloin saatiin 45 g raakaa uutetta.

20 Seokseen CHCl₃-CH₃OH-THF (1:1:1 tilavuus/tilavuus) liukenevat aineet raa'asta utteesta absorboitiin 16 g:aan silikageeliä (Lichroprep Si 60 40 - 63 µm, EM Science) ja lisättiin 150 ml:n VLC (tyhjänestekromatografia) -suppiloon, joka sisälsi lisäksi 54 g silikageeliä. Käytettiin heksaani - THF-porrasgradienttia. Puolittain puhdistettu staurosporiini eluoitui seoksella heksaani-THF (1:4 tilavuus/tilavuus). Yhdistetyt fraktiot painoivat kolme grammaa.

30 Lisäpuhdistamista suoritettiin käyttäen Sephadex LH-20:ta. Etufraktio liuotettiin seokseen CHCl₃-CH₃OH-THF (1:1:1 tilavuus/tilavuus) ja lisättiin pylvääseen, joka oli tasapainotettu seoksella THF-CHCl₃ (2:1 tilavuus/tilavuus). Virtausnopeus oli 1,3 ml/min. Staurosporiini eluoitui tilavuudessa kolme neljäsosaa pakatun kolonnin tila-

35

vuudesta (1,4 g). Tämä materiaali lisättiin toiseen LH-20-pylvääseen, joka oli tasapainotettu THF:lla. Staurosporiini (1,16 g) eluoitui yhdessä pakatun kolonnin tilavuudessa.

- 5 Yllä olevan menetelmän avulla saatu staurosporiini oli kaikissa suhteissa ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, UV, IR, massaspekttri, HPLC RP- C_{18}) täydelleen yhtäläinen staurosporiinista julkaistujen fysikaalis-kemiallisten tietojen kanssa.

4
7
4

4
4

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä staurosporiinin tuottamiseksi, t u n-
n e t t u siitä, että viljellään staurosporiinia tuotta-
5 vaa Streptomyces hygrosopicus -kanta vesielatusaineessa
vedenalaisissa aerobisissa olosuhteissa, kunnes mainittu
organismi on tuottanut riittävän määrän staurosporiinia
mainitussa kasvuliuksessa, ja otetaan staurosporiini tal-
teen kasvuliuksesta oleellisesti vapaana samanaikaisesti
10 tuotetuista aineista.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n-
n e t t u siitä, että organismi on Streptomyces hygrosco-
picus -kanta C39280-450-9 (ATCC 53730) tai sen staurospo-
riinia tuottava mutantti tai muunnos.

15

K
B
S
S
SS
S
S
S
S
S
S

PATENTTIHAK.NRO	LUOKKA	TUTKIJA	TUTKIMUSTUL. SAATU								
910756	C12P	M	EP	US							
TUTKITUT LUOKAT	TUTKITUT MAAT							TUTK. KESK. *)			
	FI	SE	NO	DK	CH	DE	WO	EP	GB	US	
C12P 17/18	X	X	X	X							
C12N 1/20	X	X	X	X							
PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!									
1) US-A-4 107 297	A61K 35/00										
2)											
3)											
4)											
5)											
6)											
7)											
8)											
9)											
<p>*) TUTKIMUS KESKEYTETTY ESTEEN LÖYTYMISEN TAKIA</p> <p style="text-align: right;">KÄÄNNÄ!</p>											

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,
HAKUSANAT YM.)

Chemical Abstracts 106 (1987) 43722m

HELSINKI

13.10.94

PÄIVÄYS

Mina Lindholm

ALLEKIRJOITUS