

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 922125 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 922125

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P 17/12

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 11.05.1992

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 11.05.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 22.12.1992

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

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

21.06.1991 CH 1843/91

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Lonza A.G., Gampel/Wallis, 4002 Basel, SVEITSI, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Kiener, Andreas, Switzerland, SVEITSI, (CH)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Mikrobiologinen menetelmä 5-hydroksipyratsiinikarboksylihapon valmistamiseksi

Mikrobiologiskt förfarande för framställning av 5-hydroxipyrazinkarboxylsyra

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

2783 DSM

4746 DSM

Mikrobiologinen menetelmä 5-hydroksipyratsiinikarboksyyli- hapon valmistamiseksi

5 Keksintö koskee uutta menetelmää 5-hydroksipyrat-
siinikarboksyylihapon ja/tai sen suolojen valmistamiseksi
pyratsiinikarboksyylihaposta ja/tai sen suoloista nikotiini-
happoa ja/tai sen suoloja hyväksi käyttävien mikro-orga-
nismien avulla.

10 Nikotiinihapolla, pyratsiinikarboksyylihapolla ja
5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapolla tarkoitetaan seu-
raavassa myös niiden suoloja, kuten esimerkiksi alkalime-
talli- ja ammoniumsuoloja.

15 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihappoa voidaan käyt-
tää esimerkiksi välituotteena lääkeaineiden valmistukses-
sa, kuten esimerkiksi selllaisten pyratsiininukleosidiana-
logien valmistuksessa, joilla on sytostaattinen vaikutus
[M. Bobek, J. Heterocyclic Chem. 28 (1991) 1131].

20 On tunnettua, että 5-hydroksipyratsiinikarboksyyli-
happoa muodostuu koirien ja ihmisten aineenvaihdunnassa
pyratsiiniamidista pyratsiinikarboksyylihapon kautta [J.
Pharmac. Exp. Ther. 180 (1972), nro 2, 411 - 434].

25 On esitetty 5-vaiheinen menetelmä 5-hydroksipyrat-
siinikarboksyylihapon valmistamiseksi esimerkiksi furfu-
ryyliglyoksaalista [J. Heterocyclic Chem. 19 (1982) 402].
Sen puutteena on kuitenkin se, että sitä ei voida soveltaa
suuressa mittakaavassa.

30 Mikrobiologista menetelmää 5-hydroksipyratsiinikar-
boksyylihapon valmistamiseksi ei ole tähän saakka vielä
tunnettu.

35 Tämän keksinnön päämääränä oli tarjota käytettäväk-
si yksinkertainen, taloudellinen ja ekologisesti hyväksyt-
tävä menetelmä 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapon val-
mistamiseksi.

 Tähän päämäärään päästiin uuden, patenttivaatimuk-
sen 1 mukaisen menetelmän avulla.

Keksinnön mukaisesti on ehdotettu, että substraattina käytettävä pyratsiinikarboksyylihappo muunnetaan sellaisten mikro-organismien avulla, jotka kasvavat käyttäen ainoana hiilen, typen ja energian lähteenään nikotiinihappoa, 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapoksi, joka akkumuloituu kasvualustaan.

Menetelmään soveltuvat periaatteessa kaikki sellaiset mikro-organismit, jotka hajottavat nikotiinihappoa 6-hydroksinikotiinihapon kautta. Näitä mikro-organismeja voidaan eristää tavanomaisin mikrobiologisin tekniikoin esimerkiksi vedenpuhdistuslaitoksista, joissa käytetään kasvualustana nikotiinihappoa. Voidaan esimerkiksi käyttää sellaisia sukuja kuin Pseudomonas, Achromobacter, Bacillus, Azorhizobium, Sarcina ja Mycobacterium, joita on kuvattu jo EP-hakemusjulkaisussa 152 948. Muuntaminen voidaan toteuttaa sekä näiden mikro-organismien seoksilla että eristetyillä puhtailla mikro-organismeilla, sekä steriileillä että epästeriileillä.

Tarkoituksenmukaisuussyistä menetelmä toteutetaan mikro-organismilajilla

Pseudomonas acidovorans DSM 4746,
Achromobacter xylosoxydans DSM 2402,
Achromobacter xylosoxydans DSM 2783,
Pseudomonas putida NCIB 10 521,
Pseudomonas putida NCIB 8176

tai niistä polveutuvilla lajeilla tai niiden mutanteilla, edullisesti Pseudomonas acidovorans DSM 4746 -lajilla.

Pseudomonas acidovorans DSM 4746 -lajin mikro-organismit talletettiin kokoelmaan Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig, 25. heinäkuuta 1988.

Myös lajeihin Achromobacter xylosoxydans DSM 2402 ja DSM 2783 kuuluvat mikro-organismit on talletettu edellä mainittuun instituuttiin, ja niitä on kuvattu jo EP-hakemusjulkaisussa 152 948.

Lajeihin Pseudomonas putida NCIB 10 521 ja NCIB 8176 kuuluvat mikro-organismilajit on talletettu kokoelmaan National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, 135 Abbey Road, Aberdeen AB98DC, Skotlanti.

Ennen varsinaista muuntamista toteutetaan tavallisesti sekä mikro-organismien viljely että indusointi nikotiinihapolla.

Viljely ja indusointi tehdään edullisesti käyttäen ainoana hiilen, typen ja energian lähteenä nikotiinihappoa.

Mikro-organismit voidaan sitten korjata talteen ennen substraatin (pyratsiinikarboksyylihapon) lisääystä ja suspendoida uudelleen tuoreeseen kasvualustaan tai substraatti (pyratsiinikarboksyylihappo) voidaan lisätä suoraan alkuperäisessä kasvualustassa oleviin mikro-organismeihin. Varsinaista prosessia varten solususpension optinen tiheys aallonpituudella 650 nm on tarkoituksenmukaista säätää sitten alueella 1 - 100, edullisesti alueelle 10 - 30.

Kasvualustoina, sekä viljelyssä että varsinaisessa muuntamisessa, voidaan käyttää alalla tavanomaisia alustoja. Edullisesti käytetään alustaa, jonka koostumus on esitetty taulukossa 1.

Substraatti (pyratsiinikarboksyylihappo) voidaan lisätä yhdellä kertaa tai sitä voidaan lisätä jatkuvatoimisesti.

Substraatin lisäys on tarkoituksenmukaista tehdä niin, että substraatin pitoisuus ei kohoa suuremmaksi kuin 20 paino-%, edullisesti suuremmaksi kuin 5 paino-%. Pyratsiinikarboksyylihapon ja/tai sen suolojen muuntaminen 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapoksi ja/tai sen suoloiksi toteutetaan tavallisesti lepotilassa olevilla soluilla.

Muuntaminen on tarkoituksenmukaista toteuttaa aerobisissa olosuhteissa pH:ssa 4 - 10, edullisesti pH:ssa 6 - 8.

Lämpötilan on tarkoituksenmukaista olla 10 °C:n ja 60 °C:n välillä, edullisesti alueella 15 - 45 °C.

Tavanomaisen reaktioajan jälkeen, joka on 4 - 100 tuntia, tuote voidaan saostaa lisäämällä soluja sisältämättömään liuokseen happoa ja saada talteen ammattimiehelle tutuin eristysmenetelmin. 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapon natriumsuolan tapauksessa tuote saostuu jo muuntamisen aikana.

Esimerkki 1

10 Pseudomonas acidovorans DSM 4746 -lajia viljeltiin fermenttorissa mineraalisuola-alustassa (taulukko 1), johon lisättiin jatkuvatoimisesti natriumnikotinaattia (0,6 g/l/h), pH:ssa 7,0 ja lämpötilassa 30 °C, kunnes saavutettiin optinen tiheys (aallonpituudella 650 nm) 10.

15 Solut erotettiin sitten sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 2 litraan liuosta, joka sisälsi 1 moolin (146 g) pyratsiinikarboksyylihapon natriumsuolaa (pH 7,0). Optinen tiheys aallonpituudella 650 nm oli silloin 20. 16 tunnin inkubointiajan jälkeen, joka inkubointi tehtiin aerobisis-

20 sa olosuhteissa pH:ssa 7,0 ja lämpötilassa 30 °C, ei UV-spektroskopian avulla kyetty enää havaitsemaan lainkaan lähtöainetta. Osa muodostuneesta 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapon natriumsuolasta kiteytyi jo näissä koeolosuhteissa. Saostunut tuote erotettiin yhdessä biomassan kanssa sentrifugoimalla. Muodostunut sakka suspendoitiin sitten uudelleen 500 ml:aan vettä ja erotettiin taas sentrifugoimalla. Soluja sisältämättömät supernatantit yhdistettiin, väkevöitiin pyöröhaihduttimella 300 ml:n tilavuuteen ja jäädytettiin 0 °C:seen. Muodostuneet kiteet erotettiin suodattamalla ja kuivattiin. Kyettiin eristämään yhteensä 0,67 moolia (108 g) 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihappoa, mikä vastaa 67 %:n saantoa käytetyn pyratsiinikarboksyylihapon natriumsuolan pohjalta laskettuna.

Esimerkki 2

Pseudomonas acidovorans DSM 4746 -lajia viljeltiin fermentterissä mineraalisuola-alustassa (taulukko 1), johon lisättiin jatkuvatoimisesti natriumnikotinaattia (0,6 g/l/h), pH:ssa 7,0 ja lämpötilassa 30 °C, kunnes saavutettiin optinen tiheys (aallonpituudella 650 nm) 10. Solut erotettiin sitten sentrifugoimalla ja suspendoitiin uudelleen 100 ml:aan liuosta, joka sisälsi 0,056 moolia (7,9 g) pyratsiinikarboksyylihapon ammoniumsuolaa (pH 7,0). Optinen tiheys aallonpituudella 650 nm oli silloin 20. 24 tunnin inkubointiajan jälkeen, joka inkubointi tehtiin aerobisissa olosuhteissa pH:ssa 7,0 ja lämpötilassa 30 °C, ei UV-spektroskopian avulla kyetty enää havaitsemaan lainkaan lähtöainetta. Sen jälkeen soluja sisältämättömän supernatantin pH säädettiin väkevällä rikkihapolla arvoon 2,0 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihapon saostamiseksi. Suspensio jäähdytettiin sitten 4 °C:seen ja suodatettiin. Suodatusjäännös pestiin kahdesti 10 ml:lla vettä ja kuivattiin. Kyettiin eristämään yhteensä 0,054 moolia (7,56 g) 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihappoa, mikä vastaa 96 %:n saantoa käytetyn pyratsiinikarboksyylihapon ammoniumsuolan pohjalta laskettuna. 5-hydroksipyratsiinikarboksyylihappopitoisuus oli HPLC:n mukaan > 90 %.

Taulukko 1**Mineraalisuola-alustan koostumus**

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,8 g/l
CaCl ₂	0,16 g/l
Na ₂ SO ₄	0,25 g/l
KH ₂ PO ₄	0,4 g/l
Na ₂ HPO ₄	0,9 g/l
SLF	1 ml/l
FeEDTA	15 ml/l

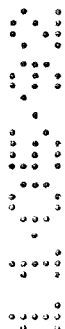
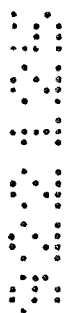
Mineraalisuola-alustan hivenaineiden (SLF) koostumus

	KOH	15 g/l
	EDTANa ₂ ·2H ₂ O	100 g/l
5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9 g/l
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	4 g/l
	H ₃ BO ₃	2,7 g/l
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,8 g/l
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 g/l
10	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,18 g/l
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,2 g/l

FeEDTA:n koostumus

	EDTANa ₂ ·2H ₂ O	5 g/l
15	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/l

(Liuoksen pH säädettiin arvoon 7,0.)



Patenttivaatimukset

1. Mikrobiologinen menetelmä 5-hydroksipyratsiini-
 karboksyylihapon ja/tai sen suolojen valmistamiseksi,
 5 t u n n e t t u siitä, että substraattina käytettävä py-
 ratsiinikarboksyylihappo ja/tai sen suola muunnetaan sel-
 laisten mikro-organismien avulla, jotka kuuluvat su-
 kuun/sukuihin Pseudomonas ja/tai Achromobacter ja/tai Ba-
cillus ja/tai Azorhizobium ja/tai Sarcina ja/tai Mycobac-
 10 terium ja jotka kasvavat käyttäen ainoana hiilen, typen ja
 energian lähteenään nikotiinihappoa ja/tai sen suoloja, 5-
 hydroksipyratsiinikarboksyylihapoksi ja/tai sen suolaksi,
 joka akkumuloituu kasvualustaan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 15 t u n n e t t u siitä, että muuntaminen toteutetaan mik-
 ro-organismilajilla Pseudomonas acidovorans DSM 4746 tai
 siitä polveutuvilla lajeilla tai sen mutanteilla.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 20 t u n n e t t u siitä, että muuntaminen toteutetaan mik-
 ro-organismilajilla Pseudomonas putida NCIB 10 521 ja/tai
 mikro-organismilajilla Pseudomonas putida NCIB 8176 tai
 niistä polveutuvilla lajeilla tai niiden mutanteilla.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 25 t u n n e t t u siitä, että muuntaminen toteutetaan mik-
 ro-organismilajilla Achromobacter xyloxydans DSM 2402
 ja/tai mikro-organismilajilla Achromobacter xyloxydans
 DSM 2783 tai niistä polveutuvilla lajeilla tai niiden mu-
 tanteilla.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen me-
 30 netelmä, t u n n e t t u siitä, että muuntaminen to-
 teutetaan lisäten substraatti yhdellä kertaa tai lisäten
 sitä jatkuvatoimisesti niin, että substraatin pitoisuus ei
 kohoa suuremmaksi kuin 20 paino-%.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen me-
 35 netelmä, t u n n e t t u siitä, että muuntaminen to-
 teutetaan aerobisissa olosuhteissa pH:ssa 4 - 10 ja lämpö-
 tilassa 10 - 60 °C.

nen toteutetaan lisäten substraatti yhdellä kertaa tai lisäten sitä jatkuvatoimisesti niin, että substraatin pitoisuus ei kohoa suuremmaksi kuin 20 paino-%.

- 5 7. Ainakin jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muuntaminen toteutetaan aerobisissa olosuhteissa pH:ssa 4 - 10 ja lämpötilassa 10 - 60 °C.

