

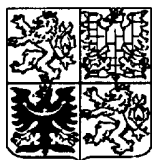
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 622

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **157-96**

(22) Přihlášeno: **29. 07. 94**

(30) Právo přednosti:

30. 07. 93 EP 93/93202260

24. 12. 93 EP 93/93203695

(40) Zveřejněno: **17. 07. 96**

(Věstník č. 7/96)

(47) Uděleno: **28. 07. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **13. 10. 99**

(Věstník č. 10/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP94/02544**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/04149**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/52

C 12 N 1/15

C 12 N 15/80

C 12 N 15/55

C 12 N 9/48

C 12 P 35/00

// (C 12 N 1/15, C 12 R 1:82,

C 12 R 1:19)

(73) Majitel patentu:

GIST-BROCADES B. V., Delft, NL;

(72) Původce vynálezu:

Bovenberg Roelof Ary Lans, Rotterdam, NL;

Koekman Bertus Pieter, Schipluiden, NL;

Hoekema Andreas, Oegstgeest, NL;

Van Der Laan Jan Metske, Breda, NL;

Verweij Jan, Leiden, NL;

De Vroom Erik, Leiden, NL;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,

11000;

(54) Název vynálezu:

Způsob výroby a izolace

7-aminodesacetoxycefalosporanové

kyseliny

(57) Anotace:

Předmětem řešení je způsob výroby a izolace 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny, 7-ADCA, při němž se a) kmen *Penicillium chrysogenum* transformuje genem *expandasy* za transkripční a translační regulace expresních signálů vláknité houby; b) kmen se fermentuje v kultivačním médiu, do něhož se přidá 3,3'-thiodipropionová kyselina nebo její sůl nebo ester vhodná pro získání 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-aminopenicilanové kyseliny, tj. 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-APA, přičemž kruh v posledně uvedených látkách se in situ rozšíří za vzniku 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA; c) z fermentační pudy se izoluje 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA; d) 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se deacyluje; a e) izoluje se krystalická 7-ADCA.

CZ 285 622 B6

Způsob výroby a izolace 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny

Oblast techniky

5

Vynález se týká biosyntetického způsobu výroby a izolace 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny (7-ADCA).

10 Dosavadní stav techniky

β-laktamová antibiotika tvoří nejdůležitější skupinu antibioticky účinných sloučenin s dlouhou historií klinického používání. Prominentními typy antibiotik spadajících do této skupiny jsou peniciliny a cefalosporiny. Tyto sloučeniny jsou v přírodě produkovány vláknitými houbami *Penicillium chrysogenum* a *Acremonium chrysogenum*.

15

Za použití klasických technik zlepšování produkčních kmenů se v posledních desetiletích dramaticky zvýšila úroveň produkce antibiotik v *Penicillium chrysogenum* a *Acremonium chrysogenum*. Zvyšující se znalosti biosyntetických drah vedoucích k penicilinům a cefalosporinům a zavedení technologie rekombinace DNA představují nové prostředky pro zlepšování produkčních kmenů a pro in vivo derivatizaci požadovaných sloučenin.

20

Byla identifikována většina enzymů podílejících se na biosyntéze β-laktamu a jim odpovídající geny byly klonovány [srovnej např. Ingolia a Queener, Med. Res. Rev. 9 (1989), 245 až 264 (biosyntetická dráha a enzymy) a Aharonowitz, Cohem a Martin, Ann. Rev. Microbiol., 46 (1992), str. 461 až 495 (klonování genu)].

25

První dva stupně biosyntézy penicilinu v *P. chrysogenum* zahrnují kondenzaci tří aminokyselin: L-5-amino-5-karboxypentanové kyseliny (L-α-aminoadipové kyseliny) (A), L-cysteinu (C) a L-valinu (V), za vzniku tripeptidu vzorce LLD-ACV, po níž následuje cykлизace tohoto tripeptidu na isopenicilin N. Tato sloučenina obsahuje typickou β-laktamovou strukturu.

30

Třetí stupeň zahrnuje výměnu hydrofilního postranního řetězce L-5-amino-5-karboxypentanové kyseliny za hydrofobní postranní řetězec působením enzymu acyltransferasy (AT). Při průmyslovém způsobu výroby penicilinu G se jako postranního řetězce účelně používá zbytek fenyloctové kyseliny (PA). V EP-A-0 532 341 je popsáno použití adipátové (5-karboxypentanoátové) suroviny. Inkorporace tohoto substrátu vede k derivátu penicilinu s 5-karboxypentanoylovým postranním řetězcem, tj. k 5-karboxypentanoyl-6-aminopenicilanové kyselině. Tato inkorporace je důsledkem skutečnosti, že acyltransferasa vykazuje širokou substrátovou specifitu [Behrens et al., J. Biol. Chem. 175 (1948), str. 751 až 809; Cole, Process Biochem. 1 (1966) str. 334 až 338; Ballio et al., Nature 185 (1960), str. 97 až 99]. Enzymatická výměnná reakce zprostředkovaná acyltransferasou se uskutečňuje uvnitř buněčné organely, tj. mikrotělesa (viz EP-A-0 448 180).

35

40

Cefalosporiny jsou podstatně nákladnější než peniciliny. Jedním z důvodů je, že některé cefalosporiny (jako například cefalexin) se vyrábějí z penicilinů řadou chemických konverzí. Druhým důvodem je, že až dosud bylo možno fermentovat pouze cefalosporiny s D-5-amino-5-karboxypentanoylovým postranním řetězcem. Cefalosporin C, až dosud nejdůležitější výchozí látka pro tyto účely, je velmi rozpustný ve vodě při jakékoliv hodnotě pH, což vyvolává potřebu zdoluhavých a nákladných izolačních postupů, při nichž je nutno používat neobratných a nákladných sloupcových technologií. Cefalosporin C získaný takovým způsobem je nutno převádět na terapeuticky použitelné cefalosporiny řadou chemických a enzymatických konverzí.

50

Meziprodukt 7-ADCA se v současné době vyrábí chemickou derivatizací penicilinu G. Potřebné chemické stupně pro výrobu 7-ADCA zahrnují rozšíření pětičlenné kruhové struktury penicilinu na šestičlennou kruhovou strukturu cefalosporinu. Takové rozšíření kruhu může zajistit enzym expandasa z vláknité bakterie *Streptomyces clavuligerus*. Po zavedení do *P. chrysogenum* může tento enzym převést penicilinovou kruhovou strukturu na cefalosporinovou kruhovou strukturu, jak je to popsáno v Cantwell et al., Proc. R. Soc. Lond. B. 248 (1992) str. 283 až 289 a v EP-A-0 532 341 a EP-A-0 540 210. Enzym expandasa byl dobře charakterizován (EP-A-0 366 354) jak biochemicky, tak funkčně, podobně jako jemu odpovídající gen. Byly popsány fyzikální mapy genu *cefE* (EP-A-0 233 715), sekvence DNA a transformační studie v *P. chrysogenum* za použití *cefE*.

Dalším zdrojem vhodného enzymu pro rozšíření kruhu je vláknitá bakterie *Nocardia lactamdurans* (dříve označovaná názvem *Streptomyces lactamdurans*). Byly popsány jak biochemické vlastnosti tohoto enzymu, tak sekvence DNA příslušného genu (Cortés et al., J. Gen. Microbiol., 133 (1987), str. 3165 až 3174; a Coque et al., Mol. Gen. Genet. 236 (1993), str. 453 až 458).

V přihlášce EP-A-0 532 341 je konkrétněji popsáno *in vivo* použití enzymu expandasy v *P. chrysogenum* v kombinaci s 5-karboxypentanoylovým postranním řetězcem, jako surovinou tvořící substrát pro acyltransferasu v *P. chrysogenum*. Přitom vzniká 5-karboxypentanoyl-6-APA, která se převádí enzymem expandasou zavedeným do kmene *P. chrysogenum* na 5-karboxypentanoyl-7-ADCA. Nakonec se navrhuje odštěpit 5-karboxypentanoylový postranní řetězec za vzniku 7-ADCA, jako konečného produktu.

V patentové přihlášce EP-A-0 540 210 je popsán podobný způsob výroby 7-ACA, který zahrnuje přídavné stupně konverze 3-methylového postranního řetězce kruhu ADCA na 3-acetoxymethylový postranní řetězec ACA.

V posledně citovaných dvou patentových přihláškách však není popsán výkonný a ekonomicky účinný postup, poněvadž nebyl vyřešen především problém včasné exprese enzymu expandasy v buňkách současně s expresí enzymu acyltransferasy.

Naproti tomu způsob podle vynálezu představuje účinný postup výroby 7-ADCA, při němž se expandasa exprimuje současně s acyltransferasou.

Kromě toho je podle vynálezu navrhován nový prekurzor postranního řetězce, tj. 3,3'-thio-dipropionová kyselina. Tento prekurzor se do odpovídajících penicilinů, jejichž kruh má být rozšířen následným působením enzymu expandasy, velmi účinně zavádí pomocí *P. chrysogenum*. Kromě toho nebyl až dosud popsán žádný efektivní způsob izolace derivátů 7-ADCA z fermentační půdy před jeho deacylací. Vynález zahrnuje účinný způsob rozpouštědlové extrakce pro získání derivátu 7-ADCA.

Vynález představuje skutečně účinný integrální způsob výroby 7-ADCA, který zahrnuje reakční stupně, jež dosud nebyly publikovány ani navrženy v dosavadním stavu techniky.

Za použití tohoto vynálezu lze v analogii k popisu uvedenému v EP-A-0 540 210 vyrábět účinným způsobem také 7-ACA.

50 Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob výroby a izolace 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny, 7-ADCA, jehož podstata spočívá v tom, že se

- a) kmen *Penicillium chrysogenum* transformuje genem *expandasy* za transkripční a translační regulace expresních signálů vláknité houby;
- b) kmen se fermentuje v kultivačním médiu, do něhož se přidá 3,3'-thiodipropionová kyselina nebo její sůl nebo ester vhodná pro získání 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-aminopenicilinové kyseliny, tj. 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-APA, přičemž kruh v posledně uvedených látkách se in situ rozšíří za vzniku 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA;
- c) z fermentační půdy se izoluje 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA;
- d) 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se deacyluje; a
- e) izoluje se krystalická 7-ADCA.
- Stupeň e) je přednostně filtračním stupněm.

Exprese genu *expandasy* je přednostně transkripčně a translačně regulována příslušnými kontrolními prvky AT-genu, což zajišťuje současnost exprese těchto genů.

- Přednostně se 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA izoluje z fermentační půdy extrakcí filtrátu této půdy organickým rozpouštědlem, které je nemísitelné s vodou při pH nižším než asi 4,5 a reextrakcí vzniklého extraktu vodou při pH v rozmezí od 4 do 10.

- Při transformaci kmene *Penicillium chrysogenum* genem *expandasy* za transkripční a translační regulace expresních signálů vláknité houby se účelně používá rekombinantního DNA vektoru obsahujícího DNA kódující *expandasu*, která je funkčně připojena k transkripčním a translačním kontrolním prvkům AT-genu *gpdA* z *P. chrysogenum* nebo *A. nidulans*.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněna funkční mapa plazmidu pMcTNE.

Na obr. 2 je znázorněna funkční mapa plazmidu pMcTSE.

Na obr. 3 je znázorněna funkční mapa plazmidu pMcTNde.

Na obr. 4 je znázorněna funkční mapa plazmidu pGNETA.

Na obr. 5 je znázorněna funkční mapa plazmidu pGSETA.

Na obr. 6 je znázorněna funkční mapa plazmidu pANETA.

Na obr. 7 je znázorněna funkční mapa plazmidu pASETA.

Na obr. 8 je znázorněna sekvence DNA *Nocardia lactamdurans* *cefE* (Coque et al., výše uvedená citace) (spodní řádky) uvedená v zákrytu pod sekvencí PCR produktu 1 (vrchní řádky).

Krátký popis seznamu sekvencí

Sekvence 1 až 13 (SEQ ID NO: 1 až 13) představují oligonukleotidy použité pro konstrukci expresní kazety *P. chrysogenum* pro geny *cefE* *Streptomyces clavuligerus* a *Nocardia lactamdurans*.

Sekvence 14 (SEQ ID NO: 14) představuje sekvenci DNA cefE *Nocardia lactamdurans* (Coque et al., výše uvedená citace).

Následuje podrobnější popis tohoto vynálezu.

5

Vynález se opírá o použití funkčních genových konstruktů v *P. chrysogenum* pro in vivo rozšiřování kruhové struktury penicilinu v kombinaci s použitím nového substrátu pro biosyntetické enzymy, za účelem získání derivátu klíčového meziproductu při biosyntéze cefalosporinu, kterým je 7-aminodesacetoxycefalosporanová kyselina, tj. 7-ADCA. Tento

10

derivát má chemické složení umožňující účinnou rozpouštědlovou extrakci, která představuje ekonomicky atraktivní způsob izolace.

Transformace *P. chrysogenum* může být v zásadě prováděna různými způsoby zavádění DNA, jako je přijímání protoplastů zprostředkované PEG–Ca, elektroporace nebo ostřelování

15

s následující selekcí transformantů [viz například Van den Holdel en Punt, Gene Transfer and Vector Development for Filamentous Fungi, v *Applied Molecular Genetics of Fungi* (Peberdy, Laten, Ogden, Bennett, eds.), Cambridge University Press (1991). Bylo též popsáno použití dominantních a nedominantních selekčních markerů (Van den Holdel, výše uvedená citace). Byly popsány jak selekční markery homologického původu (získané z *P. chrysogenum*), tak

20

selekční markery heterologického původu (získané z jiných zdrojů než z *P. chrysogenum*).

Použití různých homologických a heterologických markerů pro selekci transformantů za přítomnosti nebo nepřítomnosti vektorových sekvencí, které jsou fyzikálně připojeny nebo které nejsou připojeny k neselektovatelné DNA, je při selekci transformantů dobře známo.

25

Pro selekci transformantů *P. chrysogenum* se přednostně používá homologického selekčního markeru, aby se omezilo množství heterologické DNA zavedené do *Penicillium chrysogenum*. Největší přednost se dává použití dominantního selekčního markeru, který lze selektivně odstranit z transformovaného řetězce, například genu *amdS* z *A. nidulans* nebo jiné vláknité

30

houby (viz evropská patentová přihláška č. 94201896.1). Tyto přednostní vlastnosti selekčního markeru z transformantu *Penicillium chrysogenum* jsou velmi prospěšné při postupech monitorování procesu a registrace produktu, poněvadž se na nich nepodílejí žádné markery resistance vůči antibiotikům a nemůže tedy dojít k jejich uvolňování do životního prostředí.

35

Provedení, kterému se dává největší přednost, zahrnuje selekční marker *amdS*, který lze selektivně z kmene odstraňovat a který umožňuje donekonečna opakovat transformační cykly za použití stejné dominantní selekce. Okolnost, že nové kmeny *P. chrysogenum* exprimující expandasu neobsahují selekční markery, má rozhodující význam pro rychlý vývoj vysoce produkčních kmenů v rámci programu zlepšování průmyslových kmenů.

40

Enzym expandasa zprostředkující reakci spojenou s rozšířením kruhu se zavádí a exprimuje v *P. chrysogenum*, například ve kmeni Wisconsin 54–1255. Toto rozšíření kruhu se také provádí v mutantech vykazujících zlepšený výtěžek β -laktamu. Je zřejmé, že v posledně uvedeném případě je zapotřebí podmínky média mírně přizpůsobit pro dosažení účinného růstu.

45

Kromě toho, gen *cefE* se umístí pod transkripční a translační kontrolu příslušných kontrolních elementů genu vláknité houby, přednostně získaných z genu acyltransferasy (AT z *P. chrysogenum*), což umožňuje jeho expresi v optimálním časovém rámci, přičemž tato exprese je synchronizována se samotným působením acyltransferasy. Tato opatření mají

50

rozhodující význam pro účinnost rozšiřování kruhu v molekule penicilinu.

Kromě synchronizované exprese genů kódujících expandasu a acyltransferasu může být pro vývoj ekonomického produkčního procesu důležitá intracelulární ko-lokalizace části enzymu

expandasy s acyltransferasou v mikrotělesech (intracelulární umístění adyltransferasy). Při těchto přednostních provedeních se nesmírně sníží množství penicilinových vedlejších produktů, které nejsou registračními úřady tolerovány ve výsledném produktu 7-ADCA.

- 5 V krátkosti lze shrnout, že vynález učí jal lze aktivity enzymu expandasy zavedeného do *P. chrysogenum* využít k rozšiřování penicilinového kruhu za podmínek synchronizované exprese.

- 10 Podle tohoto vynálezu se vyrábějí β -laktamové meziproducty 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA v *P. chrysogenum* tak, že se přidá 3,3'-thiodipropionová kyselina nebo její sůl nebo ester. Jako vhodné soli lze například uvést soli sodné a draselné. Tyto látky se účinně regenerují z produkčního média jednoduchou rozpouštědlovou extrakcí, která se provádí například takto:

- 15 Půda se přefiltruje a k filtrátu se přidá organické rozpouštědlo, které je nemísitelné s vodou. Přizpůsobí se hodnota pH, aby se cefalosporin extrahoval z vodné vrstvy. Hodnota pH může být nižší než 4,5 a přednostně by měla ležet v rozmezí od 4 do 1, zvláště výhodně od 2 do 1. Přitom se cefalosporin oddělí od mnoha jiných nečistot, které jsou přítomny ve fermentační půdě. Přednostně se používá malého objemu organického rozpouštědla, takže vzniká koncentrovaný roztok cefalosporinu. Při tom lze snížit objemové rychlosti průtoku. Druhou možností představuje
20 úplná extrakce půdy při pH 4 nebo nižší. Přednostně se půda extrahuje při pH v rozmezí od 4 do 1 organickým rozpouštědlem, které je nemísitelné s vodou.

- Může se použít jakéhokoli rozpouštědla, které neinterferuje s molekulou cefalosporinu. Jako vhodná rozpouštědla je možno uvést například butylacetát, ethylacetát, methylisobutylketon,
25 alkoholy, jako je butanol atd. Přednostně se používá 1-butanolu nebo isobutanolu.

- Cefalosporin se potom reextrahuje vodou při pH v rozmezí od 4 do 10, přednostně od 6 do 9. I v tomto případě se drasticky sníží konečný objem. Izolace se může provádět při teplotách v rozmezí od 0 do 50 °C, přednostně při teplotě okolí.

- 30 Na takto získaný vodný roztok cefalosporinu se působí vhodným enzymem, aby se odstranil 3-(karboxyethylthio)propionylový postranní řetězec a aby se získala požadovaná 7-ADCA.

- Přednostně se používá imobilizovaného enzymu, aby bylo možno používat enzym opakovaně.
35 Způsoby výroby takových částic a imobilizace enzymů jsou důkladně popsána v EP-A-0 222 462. Hodnota pH vodného roztoku je například 4 až 9. Za těchto podmínek je degradace cefalosporinu minimalizována a je optimalizována požadovaná enzymatická konverze. Enzym se tedy přidá k vodnému roztoku cefalosporinu za současného udržování hodnoty pH na vhodné úrovni, například přidáváním anorganické báze, jako je roztok hydroxidu draselného
40 nebo za použití katexové pryskyřice. Po skončení reakce se imobilizovaný enzym odfiltruje. Další možnost spočívá v použití imobilizovaného enzymu v koloně s pevným nebo fluidizovaným ložem nebo v použití roztoku enzymu. V posledně uvedeném případě se produkty oddělují membránou filtrací. Potom se reakční směs okyselí za přítomnosti organického rozpouštědla, které je nemísitelné s vodou.

- 45 Vhodné enzymy například pocházejí z mikroorganismu *Pseudomonas* SY77 (mutace v jedné nebo více polohách 62, 177, 178 a 179). Může se také použít enzymů z jiných mikroorganismů přednostně *Pseudomonas* SE83, které popřípadě vykazují mutaci v jedné nebo více z poloh odpovídajících polohách 62, 177, 178 a 179 v *Pseudomonas* SY77.

- 50 Po nastavení hodnoty pH na asi 0,1 až 1,5 se oddělí vrstvy a pH vodné vrstvy se nastaví na 2 až 5. Nakonec se krystalická 7-ADCA odfiltruje.

Deacylace se také může provádět chemicky za použití způsobů známých z dosavadního stavu techniky, například přes tvorbu imunochloridového postranního řetězce (tato reakce se provádí tak, že se přidá chlorid fosforečný při teplotě nižší než 10 °C a potom isobutanol při teplotě okolí nebo při teplotě nižší).

5

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Uvedené příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

10 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

15 Exprese genů cefE Streptomyces a Nocardia v Penicillium chrysogenum

a. Obecné postupy klonování genu a transformace genu

Při postupu podle vynálezu se používá obvyklých technik klonování genu. Tyto techniky zahrnují řetězové reakce katalyzované polymerasou (PCR), syntézu oligonukleotidu, stanovení sekvence nukleotidů v DNA, enzymatickou ligaci a restrikci DNA, subklonování vektoru E. coli, transformaci a selekci transformantů, izolaci a purifikaci DNA, charakterizaci DNA analýzou Southern blot a próbami značenými ³²P, ³²P značení DNA náhodným primováním. Tyto techniky jsou velmi dobře známy v tomto oboru a jsou dobře popsány v mnoha literárních citacích (viz například Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA (1989), Innes et al., PCR protocols, a Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990) a Mc Pherson et al., PCR, a Practical Approach, IRL Press (1991).

Obecné postupy použité při transformaci vláknitých hub a selekci transformantů zahrnují přípravu fungálních protoplastů, přenos DNA a vytvoření podmínek pro regeneraci protoplastů, purifikaci transformantu a jeho charakterizaci. Tyto postupy jsou všechny dobře známy v tomto oboru a jsou dobře dokumentovány v následujících publikacích: Finkelstein and Ball (eds.), Biotechnology of Filamentous Fungi, technology and products, Butterworth-Heinemann (1992); Bennett and Lasure (Eds.), More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press (1991); Turner, v Pühler (ed.), Biotechnology, druhé úplně přepracované vydání, VCH (1992).

Další specifické aplikace klonování genu a technologie transformace genu do Penicillium chrysogenum jsou velmi dobře dokumentovány ve výše uvedených citacích Bennet a Lasure; Finkelstein a Ball.

40

– Syntetické oligonukleotidy DNA se syntetizují za použití obchodně dostupného syntetizátoru DNA (Applied Biosystems, CA, USA) podle instrukcí výrobce.

– PCR se provádí za použití obchodně dostupného automatizovaného přístroje pro provádění PCR (Perkin Elmer, USA) a DNA polymerasy Ultma (Perkin Elmer) podle údajů výrobce.

45

– Použije se protokolu hGC PCR (Dutton et al, Nucleic Acid Res. 21, (číslo 12) (1993) 2953 až 2954), aby bylo možno amplifikovat kódující oblasti cefE N. lactamdurans a chromosomální DNA S. clavuligerus.

50

– Restrikční enzymy a jiné enzymy pro modifikaci DNA pocházejí od firmy BRL (MD, USA) a používá se jich v souladu s instrukcemi výrobce.

– Vektor E. coli, pBluescript^(R) je získán od firmy Stratagene (CA, USA).

– Jiné použité chemikálie jsou v čistotě p.a. a pocházejí od různých dodavatelů.

- 5 – Analýza sekvence nukleotidů v DNA se provádí za použití automatizovaného zařízení pro analýzu sekvence DNA (Applied Biosystems), který pracuje na bázi detekce sekvenčně specifického fluorescentního značení. Pracuje se podle instrukcí výrobce.

b. Kultivace mikroorganismů

- 10 *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 se pěstuje v sojovém nálevu „Tryptic soy broth“ (Difco). Chromosomální DNA tohoto kmene se použije pro izolaci genu *cefE* (Kovacevitz et al., J. Bacteriol. (1989) 754 až 760).

- 15 Také *Nocardia lactamdurans* ATCC 27382 se pěstuje v sojovém nálevu „Tryptic soy broth“ (Difco). Chromosomální DNA tohoto kmene se použije pro izolaci genu *cefE* (Coque et al., výše uvedená citace).

- 20 *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54–1255 (ATCC 28089) se pěstuje v úplném médiu YPD (YPD; 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% glukóza). Chromosomální DNA tohoto kmene se použije pro izolaci 5' a 3' regulační oblasti genu *penDE*, kterých je zapotřebí pro expresi genu *cefE*. Jako hostitele pro transformační experimenty s genem *cefE* se také použije *Penicillium chrysogenum* ATCC 28089. Jiné kmeny *Penicillium chrysogenum*, včetně mutantů kmene Winconsin 54–1255, poskytujících zlepšené výtěžky β -laktamu, jsou také vhodné. V závislosti na použitém selekčním markeru pro transformanty se může použít kmenů *P. chrysogenum* obsahujících mutace v genu *pyrG*, *niaD* nebo *facA*. Tyto mutantní kmeny je možno získat metodami, které jsou dobře známy v tomto oboru (Cantor, Bio/Technol. 5 (1987), 494 až 497; Gouka et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. (1993), 514 až 519).

- 30 Kultivace *P. chrysogenum* za účelem získání protoplastů použitých při transformaci se také provádí v médiu YPD.

- 35 V tomto oboru je dobře známo, že postupy tvorby protoplastů a regenerační postupy se mohou mírně lišit v závislosti na konkrétně použitém kmeni *Penicillium chrysogenum* a konkrétním postupu selekce transformantů.

- 40 Kultivace *E. coli* WK6 (Zell and Fritz, EMBO J. 6 (1987), 1809 až 1815), XLI–Blue (Stratagene) a HB 101 (Boyer and Roulland–Dussoix, J. Mol. Biol., 41 (1969), 459; Bolivar and Backman, Messages Enzymol. 68 (1979), 2040) se udržuje a kultivuje za použití standardního kultivačního média pro *E. coli* (Sambrook, výše uvedená citace).

c. Konstrukce expresních kazet *cefE*

- 45 Expresní kazety *cefE* jsou uvedeny v tabulce I, v níž je také vysvětleno názvosloví, kterého bylo použito pro označování těchto plazmidů.

Tabulka I

Seznam zkonstruovaných expresních kazet *cefE*

5 Legenda

¹*tac* = hybridní promotor *trp-lac*²*gpd* = 5'-konec genu *gpdA* z *A. nidulans*³*AT* = 3'-konec genu *pen DE* z *P. chrysogenum*⁴*AT* = 5'-konec genu *penDE* z *P. chrysogenum*

10

Plazmid	Promotor	Gen	Mikrotělesa –zacílení	Terminátor
pMCTSE	<i>tac</i> ¹	<i>S.cla cefE</i>		FdT
pMCTNE	<i>tac</i>	<i>N.lac cefE</i>		Fdt
pGSE	<i>gpd</i> ²	<i>S.cla cefE</i>		–
pGNE	<i>gpd</i>	<i>N.lac cefE</i>		–
pGNETA	<i>gpd</i>	<i>N.lac cefE</i>	+ zacílení	AT ³
pGNEWA	<i>gpd</i>	<i>N.lac cefE</i>	Wt	AT
pANETA	AT ⁴	<i>N.lac cefE</i>	+ zacílení	AT
pANEWA	AT	<i>N.lac cefE</i>	Wt	AT
pGSETA	<i>gpd</i>	<i>S.cla cefE</i>	+ zacílení	AT
pGSEWA	<i>gpd</i>	<i>S.cla cefE</i>	Wt	AT
pASETA	AT	<i>S.cla cefE</i>	+ zacílení	AT
pASEWA	AT	<i>S.cla cefE</i>	Wt	AT

Pro zhotovení syntetických oligonukleotidů, jejichž seznam je uveden v tabulce II se použije publikovaných nukleotidových sekvencí: genu *cefE* z *S. clavuligerus* (Kovacevitz, výše uvedená citace), genu *cefE* z *N. lactamdurans* (Coque, výše uvedená citace), genu *gpdA* z *A. nidulans* (Punt et al., Gene 69 (1988), 49 až 57) a genu *penDE* z *P. chrysogenum* (Barredo et al., Gene 83 (1989) 291 až 300); Diez et al., Mol. Gen. Genet. 218 (1989), 572 až 576.

Tabulka II

Oligonukleotidy použité pro konstrukci expresních kazet *P. chrysogenum* pro gen *cefE* z *N. lactamdurans* a *S. clavuligerus*

5

1.	5'-GCT GAA GGA GCT GAG CAT ATG ACG GAC GCG ACC GTG CCG ACC-3'
2.	5'-CCC GGG TCT AGA TCT AGA TCA CCG GGC GGC GGC GGT CTT CCG GAT GTT-3'
3.	5'-GAT CAG TGA GAG TTG CAT ATG GAC ACG ACG GTG CCC ACC TTC AGC CTG-3'
4.	5'-CCC GGG TCT AGA TCT AGA CTA TGC CTT GGA TGT GCG GCG GAT GTT-3'
5.	5'-GAG CTC TGT GAA TTC ACA GTG ACC GGT GAC TCT TTC-3'
6.	5'-GGG AGC CAT ATG GAT GTC TGC TCA AGC GGG GTA GCT-3'
7.	5'-AGA ACG GAT TAG TTA GTC TGA ATT CAA CAA GAA CCG CCA GAC-3'
8.	5'-GAC AGA GGA TGT GAA GCA TAT GTG CTG CCG GTC GGA AGA TGG-3'
9.	5'-ACA TCA ACA TCC GGA AGA CCG CCG CCG CCC GGT GAA GGC TCT TCA TGA-3'
10.	5'-GGA CTA GTG TCG ACC CTG TCC ATC CTG AAA GAG TTG-3'
11.	5'-ACA TCA ACA TCC GGA AGA CCG CCG CCG CCC GGC TTT GAA GGC TCT TCA-3'
12.	5'-TTC GAT GTC AGC CTG GAC GGC GAG ACC GCC ACG TTC CAG GAT TGG ATC GGG GGC AAC TAC GTG AAC ATC CGC CGC ACA TCC AAG GCA TGA AGG CTC TTC ATG ACG-3'
13.	5'-GAT GTC AGC CTG GAC GGC GAG ACC GCC ACG TTC CAG GAT TGG ATC GGG GGC AAC TAC GTG AAC ATC CGC CGC ACA TCC AAG CTA TGA AGG CTC TTC ATG ACG-3'

c1. Konstrukce expresních plazmidů *cefE* *E. coli* (pMCTSE a pMCTNE)PCR, 1: *N. lactamdurans cefE*

- 5 Při první řetězové reakci PCR za použití chromosomální DNA z *N. lactamdurans* a oligonukleotidů 1 a 2 se získá otevřený čtecí rámec *N. lactamdurans cefE* ve formě 0,9kb PCR produktu obsahujícího jedinečné restrikční místo *NdeI* u 5'-konce a jedinečné restrikční místo *XbaI* u 3'-konce.

10 PCR, 2: *S. clavuligerus cefE*

- Při druhé řetězové reakci PCR za použití chromosomální DNA z *S. clavuligerus* a oligonukleotidů 3 a 4 se získá otevřený čtecí rámec *S. clavuligerus cefE* ve formě 0,9kb PCR produktu také obsahujícího jedinečné restrikční místo *NdeI* u 5'-konce a jedinečné restrikční místo *XbaI* u 3'-konce.

- Pro účely exprese genů *cefE* v *E. coli* a charakterizace PCR produktů DNA sekvenční analýzou se PCR produktů 1 a 2 klonují do vektoru pMCTNde, což je derivát pMC-5 (Stanssens et al., Nucleic Acids Res. 17 (1989), 4441). Plazmid pMCTNde je odvozen od pMC5-8 (Evropská patentová přihláška č. 0351029) insercí fragmentu kódujícího promotor *tac* a potom místa RBS a klonovacího místa *NdeI* (obr. 3).

- PCR produkty 1 a 2 se rozštěpí *NdeI* a *XbaI* a ligují do *NdeI* *XbaI* rozštěpeného vektoru pMCTNde. Ligační směsi se použije pro transformaci *E. coli* WK6. Transformanty se selektují na resistenci vůči chloramfenikolu. Těchto transformantů se použije pro izolaci plazmidové DNA. Vložená expresní kazeta *cefE* se nejprve analyzuje štěpením restrikčním enzymem a izolací předvídaných restrikčních fragmentů. Plazmidy obsahující předvídaná místa pro štěpení restrikčním enzymem se nakonec analyzují automatizovanou DNA sekvenční analýzou.

- 30 Sekvence DNA otevřeného čtecího rámce *S. clavuligerus cefE* v plazmidu pMCTSE (viz obr. 2) je ze 100 % identická s publikovanou sekvencí (Kovacevitz, výše uvedená citace).

- Sekvence DNA (obr. 8) všech analyzovaných klonů obsahujících otevřený čtecí rámec *N. lactamdurans cefE* je odlišná od publikované sekvence (Coque, výše uvedená citace).

- 35 Odvozená aminokyselinová sekvence publikovaného genu *cefE* z *N. lactamdurans* obsahuje prolin v aminokyselinové poloze 41 (viz SEQ ID NO: 14). Tento prolinový zbytek chybí v klonech, které byly získány při PCR 1. Získaný plazmid je označen názvem pMCTNE (viz obr. 1).

40 c2. Konstrukce expresních plazmidů *P. chrysogenum cefE*PCR, 3: *gpdA* promotor

- 45 Při této třetí PCR za použití DNA z plazmidu pAN7-1 (Punt et al., Gene 56 (1987), 117 až 124), který obsahuje gen *hph* z *E. coli* pod kontrolou promotoru *gpdA* z *A. nidulans* a oligonukleotidy 5 a 6, se získá promotor *gpdA* ve formě 0,9kb PCR produktu obsahujícího jedinečné restrikční místo *ECORI* u 5'-konce a jedinečné restrikční místo *NdeI* u 3'-konce.

PCR, 4: AT promotor

Při čtvrté řetězové reakci PCR za použití chromosomální DNA z *P. chrysogenum* a oligonukleotidů 7 a 8 se získá 1,5kb fragment promotoru AT také obsahující jedinečné restriční místo EcoRI u 5'-konce a jedinečné restriční místo NdeI u 3'-konce.

PCR, 5: AT terminátor a 3'-konec genu *cefE* z *N. lactamdurans*

Při páté PCR se získá 0,5kb oblast *penDE* (AT) terminátoru za použití chromosomové DNA z *P. chrysogenum* a oligonukleotidů 9 a 10 či 11 a 10. Tyto PCR produkty tedy obsahují 3'-terminální sekvence genu *cefE* se signálem pro zacílení mikrotěles nebo bez něho, které se skládají z C-terminální aminokyselinové sekvence ARL (Müller et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1116 (1992), 210 až 213).

Tyto oligonukleotidy se zkoncentrují tak, aby se jedinečné místo BspEI zavedlo k 5'-konci PCR produktu a jedinečné místo SpeI k 3'-konci PCR produktu.

PCR, 6: AT terminátor a 3'-konec genu *cefE* z *S. clavuligerus*

Při šesté PCR se získá 0,5kb oblast *penDE* (AT) terminátoru za použití chromosomové DNA z *P. chrysogenum* a oligonukleotidů 12 a 10 či 13 a 10. Tyto PCR produkty tedy obsahují 3'-terminální sekvence genu *cefE* *S. clavuligerus* se signálem pro zacílení mikrotěles nebo bez něho, které se skládají z C-terminální aminokyselinové sekvence SKL (DE Hoop et al., *Biochem. J.* 286 (1992), 657 až 669).

Tyto oligonukleotidy se zkonstruují tak, aby se jedinečné místo BglI zavedlo k 5'-konci PCR produktu a jedinečné místo SpeI k 3'-konci PCR produktu.

Aby se dosáhlo exprese genů *cefE* v *P. chrysogenum*, liguje se fragment promotoru *gpdA* a fragment promotoru AT k fragmentům *cefE* z plazmidů *pMCTNE* a *pMCTSE*. Tyto ligované fragmenty se klonují do vektoru *pBluescript II KS*.

Produkt PCR 3 se štěpí EcoRI a NdeI. Plazmidy *pMCTNE* a *pMCTSE* se štěpí NdeI a XbaI. Tyto restriční fragmenty se oddělí elektroforézou na agarosovém gelu. 0,9kb Fragmenty kódující *cefE* se purifikují na agarovém gelu. Promotorový fragment EcoRI-NdeI se liguje s fragmenty *cefE* NdeI-XbaI do vektoru *pBluescript II KS* štěpeného EcoRI-XbaI. Tak se získají plazmidy *pGSE* a *pGNE*.

Pro dosažení optimální exprese genů *cefE* v *P. chrysogenum* byl zvolen přístup, při němž se AT terminační signální sekvence klonuje za geny *cefE* v expresních plazmidech *Penicillium* uvedených výše.

pGNETA-pGNEWA

Produkty PCR 5 se štěpí BspEI a SpeI a ligují do vektoru *pGNE* rozštěpeného BspEI a SpeI. Ligačních směsí se použije pro transformaci *E. coli* HB101. Transformanty se selektují na základě resistance vůči ampicilinu. Plazmidy izolované z těchto transformantů se charakterizují analýzou restričních fragmentů a pozdější DNA sekvenční analýzou. Tak se získají plazmidy *pGNEWA* a *pGNETA* (obr. 4).

pGSETA-pGSEWA

Produkty PCR 6 se štěpí BglI a SpeI a ligují do vektoru *pGSE* rozštěpeného BglI a SpeI. Ligačních směsí se použije pro transformaci *E. coli* BH101. Transformanty se selektují na

základě resistance vůči ampicilinu. Plazmidy izolované z těchto transformantů se také charakterizují analýzou restričních fragmentů a později DNA sekvenční analýzou. Tak se získají plazmidy pGSEWA a pGSETA (obr. 5). pANETA, pANEWA a pASETA a pASEWA.

- 5 Plazmidy pGNETA, pGNEWA a pGSETA a pGSEWA se štěpí EcoRI a NdeI. Restriční fragmenty se oddělí elektroforézou na agarosovém gelu s z gelu se purifikují 4,5kb fragmenty.

Produkt PCR 4 se štěpí EcoRI a NdeI a ligují s purifikovanými fragmenty uvedenými výše. Po transformaci ligačních směsí do *E. coli* HB101 se transformanty selektují na základě resistance vůči ampicilinu.

Transformanty se nechají růst a jejich plazmidy se izolují a charakterizují analýzou restričních fragmentů a nakonec DNA sekvenční analýzou. Tak se získají požadované konstrukty pANETA (obr. 6), pANEWA, pASETA (obr. 7) a pASEWA.

15

d. Transformace *P. chrysogenum*

Použije se Ca-PEG zprostředkovaného postupu transformace protoplastů.

- 20 Za použití postupů popsaných ve výše uvedených publikacích Cantoral; Gouka et al. (*J. Biotechnol.*, viz výše) a Gouka et al. (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, viz výše) se použije celého plazmidu nebo purifikované expresní kazety *cefE* (neobsahující sekvence vektoru *E. coli*) pro transformaci kmenů *P. chrysogenum* s geny *pyrG*, *niaD*, *facA* nebo *amdS* (Beri et al., *Curr. Genet.* 11 (1987) 639 až 641), jako selekčními markery.

25

Za použití homologických selekčních markerů *pyrG*, *niaD* nebo *facA* v purifikované formě, tj. bez obsahu sekvencí vektoru *E. coli*, se získají transformované kmeny *Penicillium chrysogenum*, které neobsahují geny bakteriální resistance.

- 30 V evropské patentové přihlášce č. 94201896.1 je popsán způsob získání rekombinantních kmenů bez selekčního markerového genu. Tohoto způsobu bylo s úspěchem použito u transformantů *P. chrysogenum* obsahujících jako dominantní selekční amarker gen *amdS* z *A. nidulans*.

Jedinými elementy heterologické povahy jsou potom 0,9kb oblast kódující *cefE* a popřípadě 0,9kb oblast promotoru *gpdA*.

35

e. Analýza transformantů

- 40 Transformanty *P. chrysogenum* se purifikuje opakovanou kultivací na selekčním médiu. Jednotlivých stabilních kolonií se použije pro přípravu šikmých agarů, za účelem produkce spor a za účelem screeningu na transformanty obsahující expresní kazetu *cefE*. Vařením fragmentu čerstvého mycelia z transformantů na misce s agarem se získá dostatečné množství templátové DNA pro efektivní selekci několika stovek transformantů na přítomnost genu *cefE* za použití PCR techniky [Seth, *Fungal Genetics Conference, Asilomar* (1991), Abstract v *Fungal Genetics Newsletter* 38, 55]. Přitom se odhadne účinnost transformace.

45

Screening transformantů se také provede bioesejem. Transformanty se nechají růst na agarovém médiu obsahujícím zvolený prekurzor postranního řetězce. Jako indikátorové bakterie v převrstvujícím agaru se použije *E. coli* ESS2231. Tato vrstva agaru obsahuje také Bacto penasu, aby byla schopna diskriminovat mezi produkcí penicilinu a cefalosporinu v souladu s postupy známými v tomto oboru a popsanými například v Guttiérrez et al., *Mol. Gen. Genet.* 225 (1991), 56 až 64.

50

Spór se použije pro inokulaci kultivačního média *P. chrysogenum*, které je popsáno v části d. Po 72 hodinách kultivace při 25 °C se z mycelia izoluje chromosomová DNA. Tato DNA se rozštěpí restričním enzymem s 6bp rozpoznávací sekvencí, jako EcoRI nebo PstI.

- 5 Fragmenty DNA se oddělí elektroforézou na agarosovém gelu a blotují se na nylonové membrány Gene screen (New England Nuclear). Bloty Southern se hybridizují s ³²P–značeným produktem PCR 2, jako próbou pro sekvence genu *cefE*. ³²P značení purifikovaného produktu PCR 2 se provádí náhodným značením pomocí primování za přítomnosti α³²P dCTP za použití obchodně dostupné soupravy pro značení (Boehringer Mannheim).

- 10 Transformanty obsahující sekvenci kódující *cefE* se zkoušejí na expresi produktu genu *cefE*, která je zde označována názvem aktivita expandasy.

Selektované transformanty se kultivují v médiu pro produkci penicilinu (viz příklad 2).

- 15 V experimentu, při němž se sleduje průběh fermentace v závislosti na čase, se odebírají vzorky mycelia po 48, 72 a 96 hodinách. Vyrobí se extrakty mycelia a v surových extraktech se stanoví aktivita expandasy v podstatě způsobem popsaným v Rollins et al., Can. J. Microbiol., 34 (1988), 1196 až 1202. Transformanty vykazující aktivitu expandasy se také zkoušejí na aktivitu acyltransferasy způsoby popsanými v Alvarez et al., Antimicrob. Agent Chem. 31 (1987), 1675 až 1682.

- 20 Na základě těchto analýz se selektují transformanty s různou úrovní acyltransferasové a expandasové enzymatické aktivity pro fermentační produkci derivátů 7–ADCA.

25

Příklad 2

Fermentační produkce 3–(karboxyethylthio)propionyl–7–ADCA a její izolace

30

- Kmen *P. chrysogenum* Wisconsin 54–1255 (ATCC 28089) se transformuje jedním z konstruktů DNA popsaných v příkladu 1 a inokuluje v koncentraci 2×10^6 konidií/ml do očkovacího média, které obsahuje následující látky (koncentrace v g/litr jsou uvedeny v závorce) : glukóza (30); síran amonný (10), dihydrogenfosforečnan draselný (10); roztok stopových prvků I (10 ml/litr)
- 35 [heptahydrát síranu hořečnatého (25); heptahydrát síranu železnatého (10); pentahydrát síranu měďnatého (0,5); heptahydrát síranu zinečnatého (2); síran sodný (50); monohydrát síranu manganatého (2); dihydrát chloridu vápenatého (5)]. Hodnota pH před sterilizací je 6,5.

- Očkovací kultura se inkubuje 48 až 72 hodin při teplotě 25 až 30 °C a potom se jí použije pro inokulaci 10 až 20 objemů produkčního média, které obsahuje následující látky (koncentrace v g/litr jsou uvedeny v závorce) : laktóza (80); maltóza (20); síran vápenatý (4); močovina (3); heptanhydrát síranu hořečnatého (2); dihydrogenfosforečnan draselný (7); chlorid sodný (0,5); síran amonný (6); heptahydrát síranu železnatého (0,1); 3,3'–thiodipropionová kyselina (5); roztok stopových prvků II: (10 ml/litr) [pentahydrát síranu měďnatého (0,5); heptahydrát síranu zinečnatého (2); monohydrát síranu manganatého (2); síran sodný (50)]. Hodnota pH před
- 45 sterilizací je 5,5 až 6,0. Potom se v inkubaci pokračuje dalších 96 až 120 hodin.

- Na konci produkční fermentace se mycelium oddělí centrifugací nebo filtrací a 3–(karboxyethylthio)propionyl–7–ADCA se analyzuje vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na sloupci s obrácenými fázemi. Použije se zařízení pro HPLC Beckman System Gold, které se skládá z programovatelného rozpouštědlového systému model 126, automatického sběrače frakcí model 507, diodového detektoru model 168 a systému pro zpracování dat System Gold (5.10). Jako stacionární fáze se použije dvou patronových kolon Chromspher C18 (100 x 3 mm,
- 50

Chrompack), které jsou zapojeny v sérii. Mobilní fáze se skládá z lineárního gradientu od 100 % 0,07M fosfátového pufru o pH 4,8 do kombinace 25 % acetonitrilu a 75 % fosfátového pufru o pH 4,8, během 15 minut při průtokové rychlosti 0,5 ml/min. Produkce 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se kvantifikuje při 260 nm za použití syntetické 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA, jako referenční látky.

Identita píků se potvrdí porovnáním UV a NMR spekter (v systému on line).

Půda se přefiltruje a k filtrátu se přidá asi 0,1 objemu 1-butanolu. Hodnota pH směsi se nastaví zředěnou kyselinou chlorovodíkovou na 2 a vzniklá směs se 5 minut míchá při teplotě místnosti. Organická vrstva se oddělí a buď se odpaří, nebo se jí dále použije na chemickou deacylaci (příklad 3). Také se může reextrahovat 0,33 objemu vody o pH 8 (přičemž vzniklého extraktu se potom může použít při enzymatické deacylaci (příklad 4).

Příklad 3

Deacylace 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA

Ke směsi 3 g (8 mmol) 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se při teplotě okolí přidá 3,5 ml (36 mmol) N,N-dimethylanilinu, 13 ml methylenchloridu a 2,6 ml (21 mmol) trimethylchlorsilanu. Směs se 30 minut míchá a potom se ochladí přibližně na -50 °C, načež se k ní najednou přidá 1,8 g (8,5 mmol) chloridu fosforečného. Teplota reakční směsi se 2 hodiny udržuje na -40 °C a potom se směs ochladí na -65 °C. Dále se k této směsi přidá 12 ml (137 mmol) isobutylalkoholu. Tento isobutylalkohol se přidává takovou rychlostí, aby teplota reakční směsi nepřestoupila -40 °C. Roztok se dále 2 hodiny míchá a potom se nalije do 15 ml vody a bezprostředně nato se ke vzniklé směsi přidá 5 ml 4,5N roztoku amoniaku. Pomalým přidáváním pevného hydrogenuhličitanu amonného se hodnota pH nastaví na 4. Směs se ochladí na 5 °C, přefiltruje a krystalická 7-ADCA se promyje 5 ml vodného acetonu (1:1) a izoluje.

Příklad 4

Enzymatická deacylace 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se použití acylace z mutantu *Pseudomonas* SY77

Konverze 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se provádí v jediném enzymatickém stupni za použití specifické acylasy, která byla získána místně orientovanou mutagenesí z acylasy *Pseudomonas* SY77 se zlepšenou aktivitou vůči 3-(karboxyethylthio)propionyllového postrannímu řetězci byla popsána v EP-A-0 453 048. V tomto mutantu je tyrosin v poloze 178 v α -podjednotce acylasy *Pseudomonas* SY77 nahrazen histidinem. Mutantní acylasa je produkována v *E. coli*. Buňky se sklídí centrifugací a resuspendují se v 10mM fosfátovém pufru o pH 7,4 s obsahem chloridu sodného (140mM). Potom se buňky rozbíjí ultrazvukem. Zbytky buněk se odstraní a izolují se supernatanty vykazující acylasovou aktivitu. Další purifikace acylasy se provádí v sérii chromatografických stupňů: 1. ionexová chromatografie na sloupci Q-Sepharose fast flow při pH 8,8; 2. hydrofobní interakční chromatografie na Phenyl-Sepharose a 3. gelová permeační chromatografie na sloupci Sephacryl S200HR.

Purifikovaná acylasa se imobilizuje na částicích skládajících se ze směsi želatiny a chitosanu. Těsně před přidáním enzymu se na částice působí glutaraldehydem.

Konverze 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se provádí v reaktoru typu míchané nádrže. Do reaktoru se nejprve přidá vodný roztok cefalosporinu. Potom se teplota roztoku za

konstantního míchání zvýší na 30 °C a hodnota pH se hydroxidem draselným upraví na 8. Potom se přidá imobilizovaný enzym, čímž se zahájí konverze. V průběhu konverze se kontinuálně zaznamenává hodnota pH v reaktoru a udržuje se na 8. 3,3'-thiodipropionová kyselina, která se uvolňuje během této reakce, se titruje hydroxidem draselným. Množství přidaného hydroxidu draselného se integruje a zaznamenává. Konverze se sleduje odběrem vzorků z reaktoru a analýzou na 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA a 7-ADCA za použití HPLC popsané v příkladu 2.

Po dokončení reakce se imobilizovaný enzym odfiltruje a hodnota pH filtrátu obsahujícího butylacetát se upraví na 1. Oddělí se vrstvy a pH vodné vrstvy obsahující 7-ADCA se upraví na 3. Potom se krystalická 7-ADCA odfiltruje.

Příklad 5

Enzymatická deacylace 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA za použití acylasy *Pseudomonas* SE83

Konverze 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se provádí způsobem popsaným v příkladu 4, tentokrát však za použití acylasy *Pseudomonas* SE83. Dosáhne se stejných výsledků.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby a izolace 7-aminodesacetosycefalosporanové kyseliny, 7-ADCA, **v y z n a - č u j í c í s e t í m**, že se

a) kmen *Penicillium chrysogenum* transformuje genem *expandasy* za transkripční a translační regulace expresních signálů vláknité houby;

b) kmen se fermentuje v kultivačním médiu, do něhož se přidá 3,3'-thiodipropionová kyselina nebo její sůl nebo ester vhodná pro získání 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-aminopenicilinové kyseliny, tj. 3-(karboxyethylthio)propionyl-6-APA, přičemž kruh v posledně uvedených látkách se *in situ* rozšíří za vzniku 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA;

c) z fermentační pudy se izoluje 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA;

d) 3-(karboxyethylthio)propionyl-7-ADCA se deacyluje; a

e) izoluje se krystalická 7-ADCA.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že stupeň e) je filtrační stupeň.

3. Způsob podle nároků 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že stupněm c) je filtrační stupeň, přičemž filtrát pudy se extrahuje organickým rozpouštědlem, které je nemísitelné s vodou, při pH pod 4,5 a potom se provede jeho reextrakce vodou při pH v rozmezí od 4 do 10.

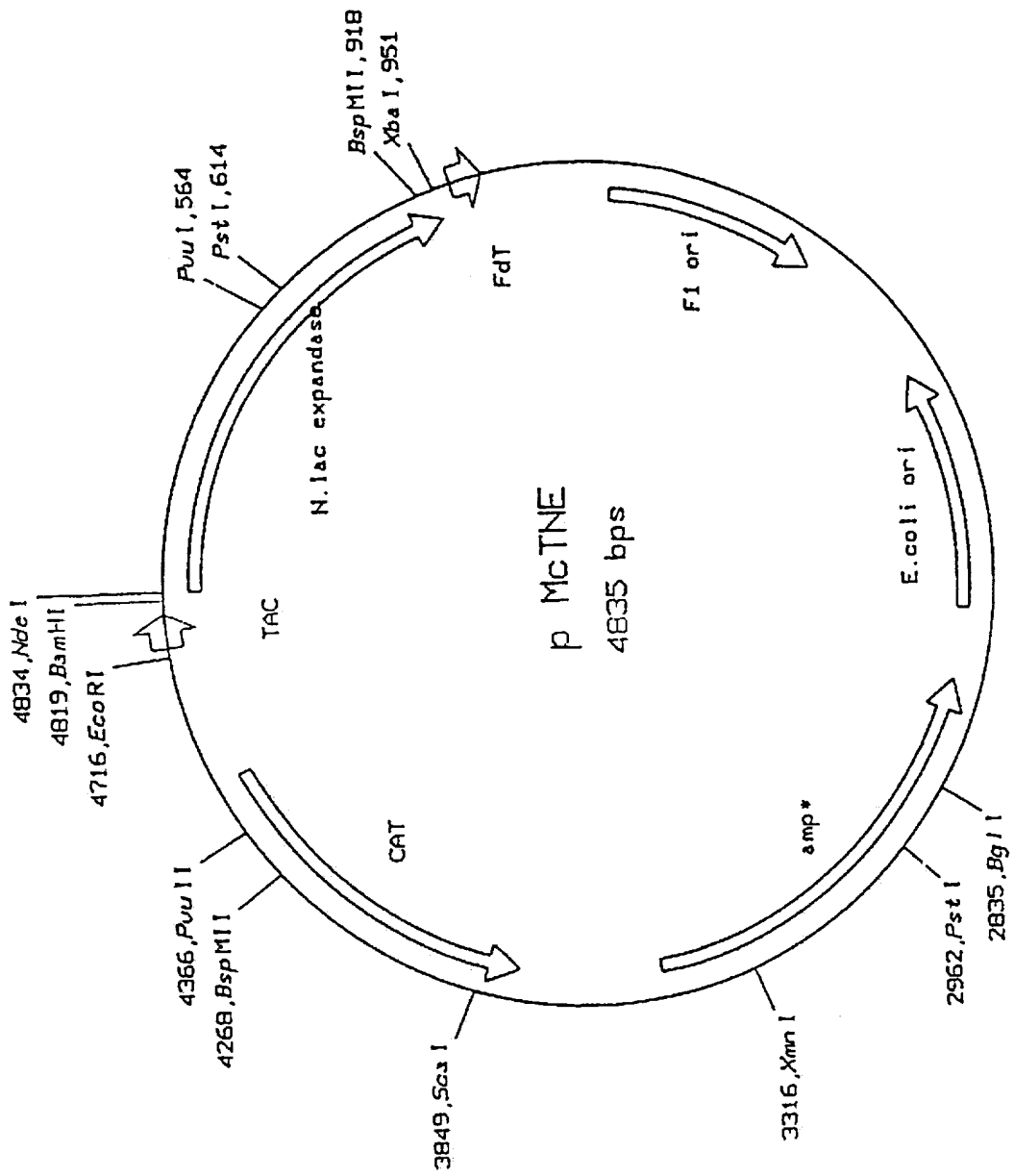
4. Způsob podle některého z předchozích nároků, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že gen *expandasy* pochází ze *Streptomyces clavuligerus* nebo *Nocardia lactamdurans*.

5. Způsob podle některého z předchozích nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se kmen *Penicillium chrysogenum* transformuje genem *expandasy* za transkripční a translační regulace expresních signálů acyltransferasového genu.

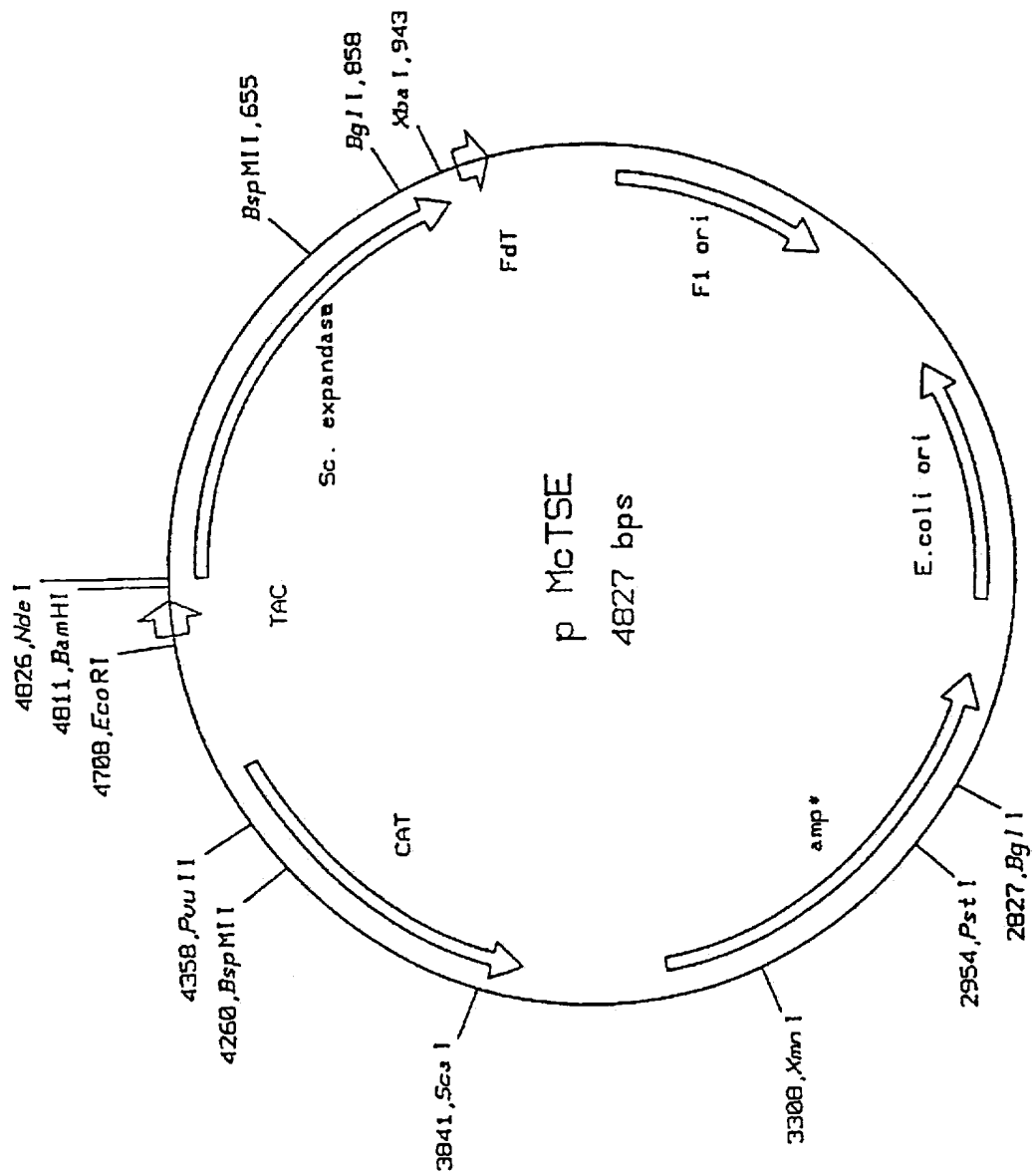
5

9 výkresů

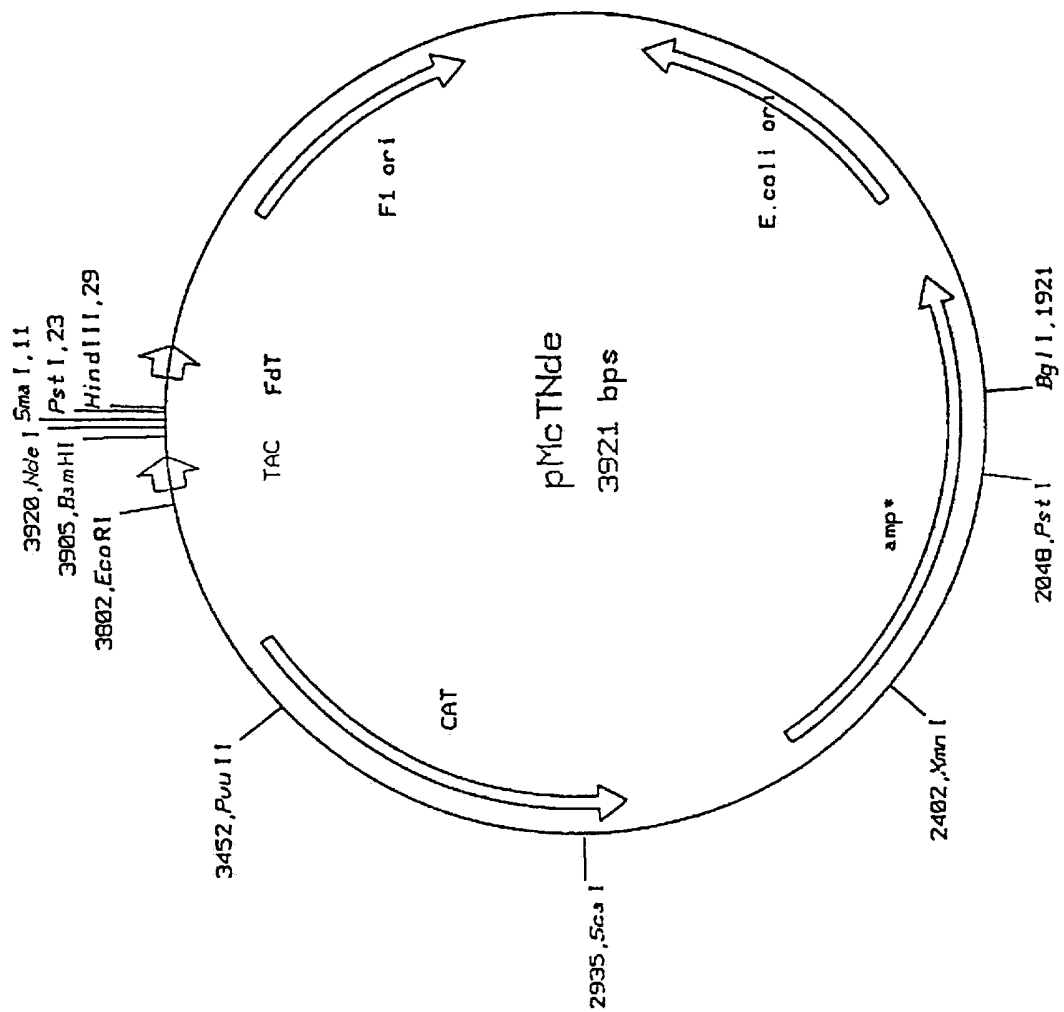
Obr. 1



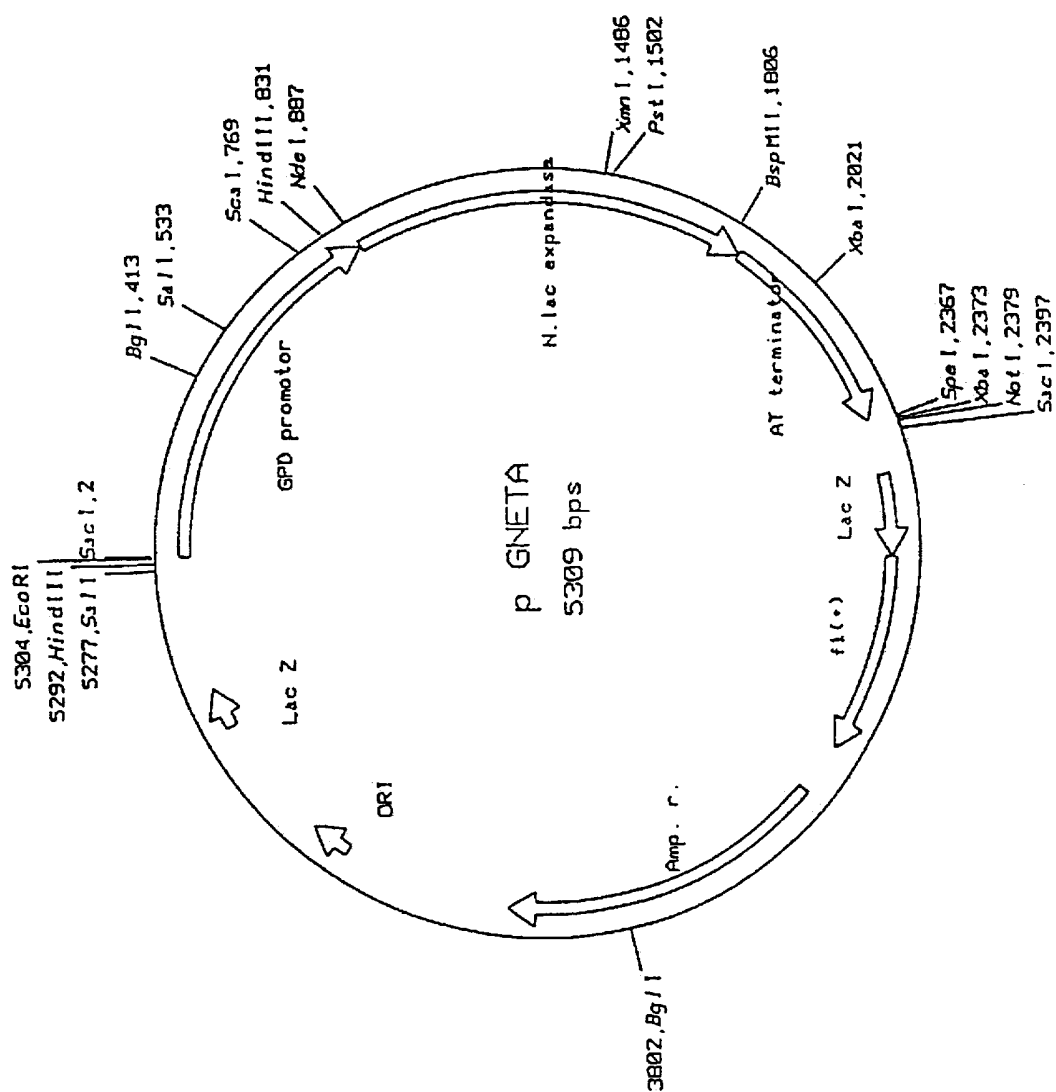
Obr. 2



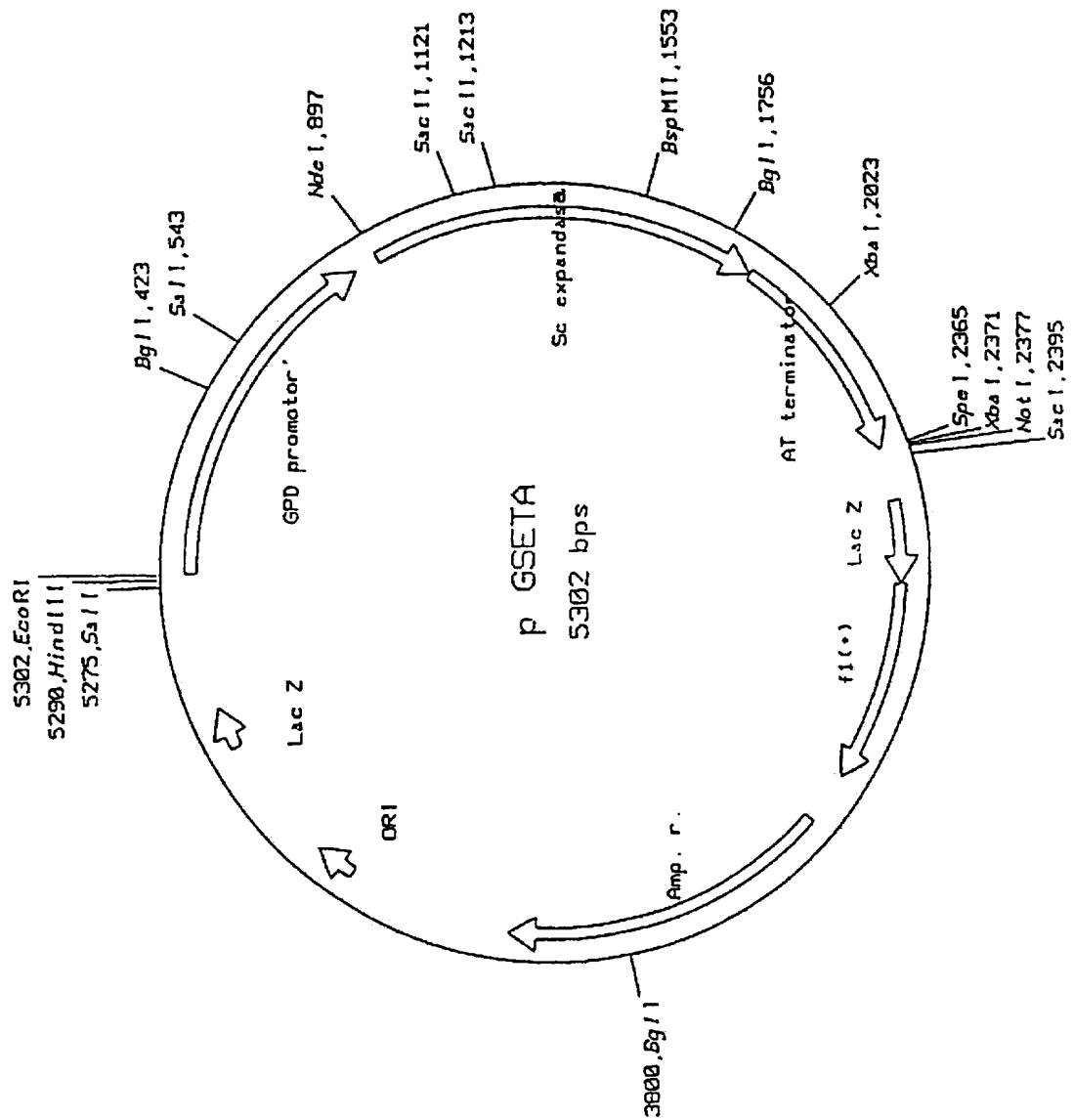
Obr. 3



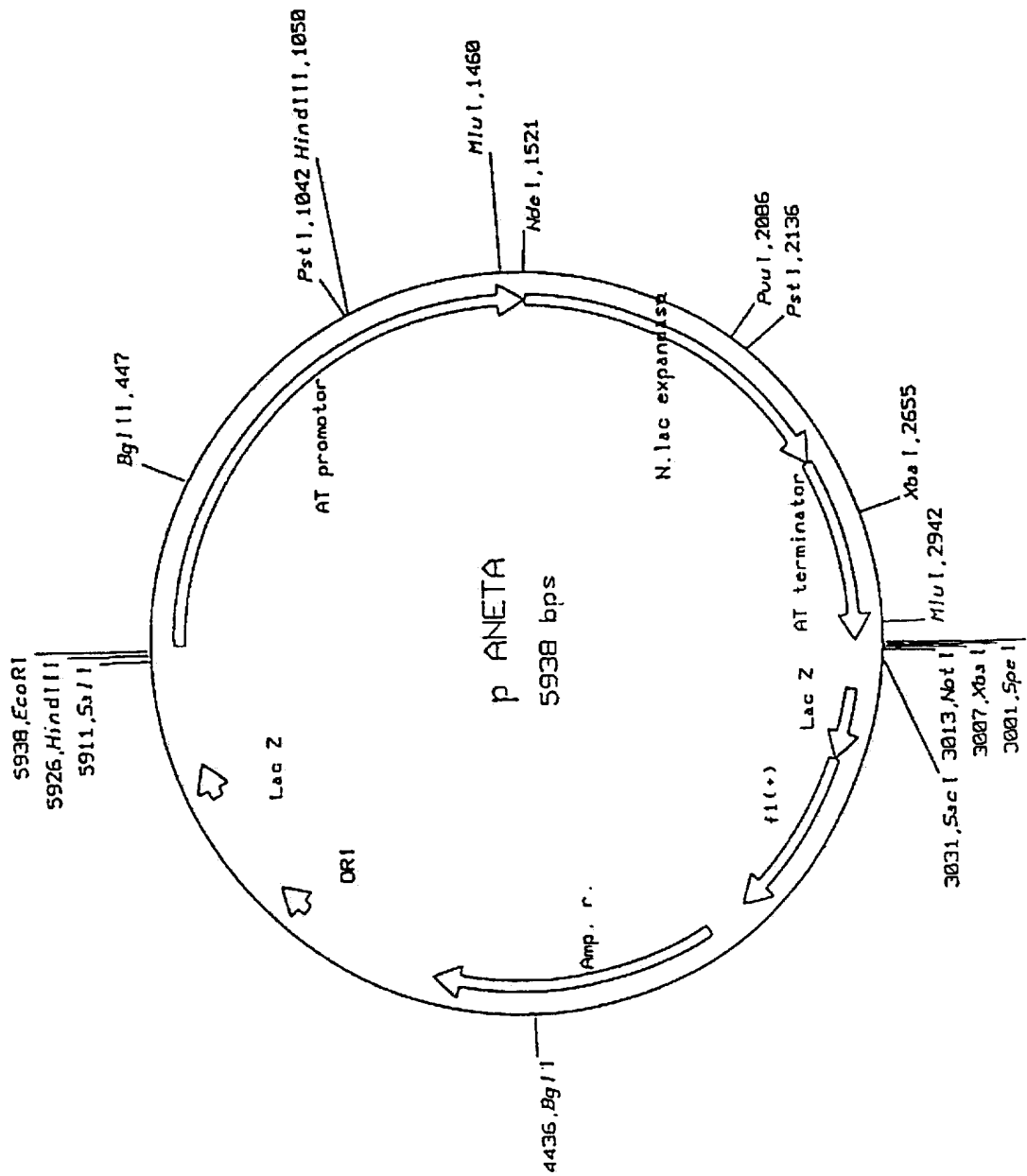
Obr. 4



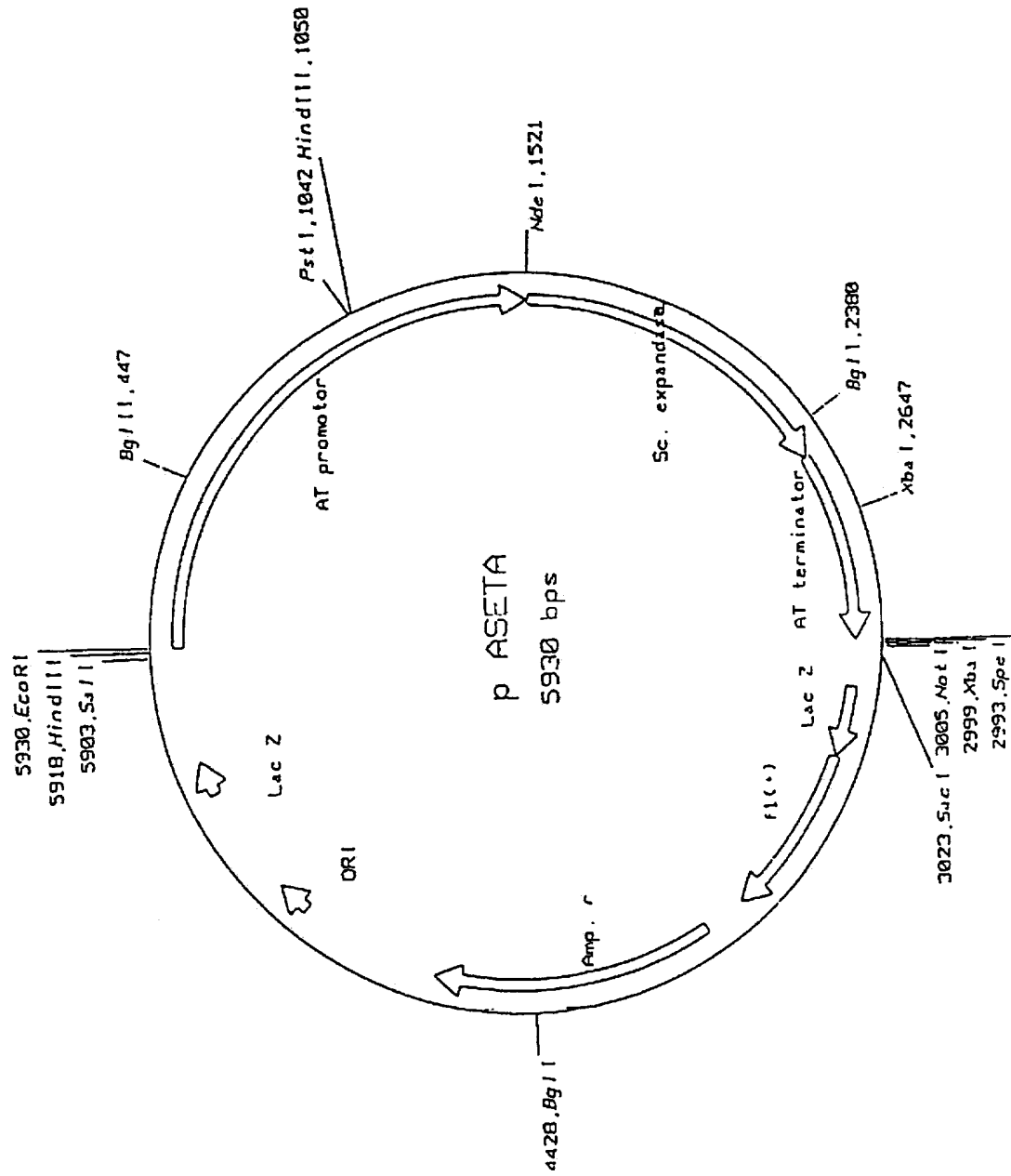
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8/1

```

1      ATGACGGACGGGACCGTGTCCGACCTTCGATCTGGCCGAGCTGCGTGAGGGCTTGCAACCAG
1      ATGACGGACGGGACCGTGTCCGACCTTCGATCTGGCCGAGCTGCGTGAGGGCTTGCAACCAG

61     GAGGAGTTCCGCCCACTGCCCTGCGCGAGAGGGCGTGTTCTACCTCAAGGGCACCCGGGCT
61     GAGGAGTTCCGCCCACTGCCCTGCGCGAGAGGGCGTGTTCTACCTCAAGGGCACCCGGGCTG
      *
120    C G CCGAGGCGGACCAACGCTCGGCGCGGGAGATCGCGGTGGACTTCTTCGACCAACGGC
121    CCGGCCGAGGCGGACCAACGCTCGGCGCGGGAGATCGCGGTGGACTTCTTCGACCAACGGC
      * *
178    ACCGAGGCCGAGAGAGGAGGGGGTGATGACGCCGATCCCGACCATCCGGCGCGGGTACGCC
181    ACCGAGGCCGAGAGAGGCGGTGATGACGCCGATCCCGACCATCCGGCGCGGGTACGCC

238    GGGCTGGAGTCCGAGAGCACCGCGCAGATCACGAAACACCGGCAGTACACCGACTACTCG
241    GGGCTGGAGTCCGAGAGCACCGCGCAGATCACGAAACACCGGCAGTACACCGACTACTCG

298    ATGTCGTACTCGATGGGCACCGCGGACAACTGTTCGCCAGCGCCGAGTTCGAGAAGGCG
301    ATGTCGTACTCGATGGGCACCGCGGACAACTGTTCGCCAGCGCCGAGTTCGAGAAGGCG

358    TGGGAGGACTACTTCCGCGGGATGTACCGCGCTTCGAGGACGTGCGCGCGGAGGTGCTG
361    TGGGAGGACTACTTCCGCGGGATGTACCGCGCTTCGAGGACGTGCGCGCGGAGGTGCTG

418    ACCTCGGTGCGCGGGAAACCGAGGTGCGCATGGACGCCCTTCCTCGACTGCGAACCCTG
421    ACCTCGGTGCGCGGGAAACCGAGGTGCGCATGGACGCCCTTCCTCGACTGCGAACCCTG

```

478	CTGGCCCTGCGCTACTTCCCGAGGGTCCCGAGGATCGCGTGGCCGAGGAGCAGCCGCTG
481	CTGGCCCTGCGCTACTTCCCGAGGGTCCCGAGGATCGCGTGGCCGAGGAGCAGCCGCTG
538	CGGATGGCCCCCGCACTACGACCTCTCGATCGTCACTGATCCACAGACCCCTTGGCGG
541	CGGATGGCCCCCGCACTACGACCTCTCGATCGTCACTGATCCACAGACCCCTTGGCGG
598	AACGGGTTCGTCAGCCTGAGGTCGAGGTGGA CCGGTCTATGTGGACATCCCGGCGCAG
601	AACGGGTTCGTCAGCCTGAGGTCGAGGTGGA CCGGTCTATGTGGACATCCCGGCGCAG
658	CCGGGCGGGTGCTGGTGTCTCGGGCGGGTGGCGACGCTGGTGGCCGACGGCGCGATC
661	CCGGGCGGGTGCTGGTGTCTCGGGCGGGTGGCGACGCTGGTGGCCGACGGCGCGATC
718	AAGGCGCCCAAGCACCAAGTGGCCGCGCCGCGCGGACAGCGGGTGGGCGAGCAGCCGC
721	AAGGCGCCCAAGCACCAAGTGGCCGCGCCGCGCGGACAGCGGGTGGGCGAGCAGCCGC
778	ACCTCCAGCGTGTCTTCTCGCGCCCCAACGGGGACCTCCGCTTCTCGGTGCCCGGGCC
781	ACCTCCAGCGTGTCTTCTCGCGCCCCAACGGGGACCTCCGCTTCTCGGTGCCCGGGCC
838	AGGGAGTGCGGGTTCGACGTCAGCATCCCGGCCGAGACCGGCCACCTTCGACGACTGGATC
841	AGGGAGTGCGGGTTCGACGTCAGCATCCCGGCCGAGACCGGCCACCTTCGACGACTGGATC
898	GGCGGCAACTACATCAACATCCGGAAGACCGCCCGCCCGCGG
901	GGCGGCAACTACATCAACATCCGGAAGACCGCCCGCCCGCGG

Shoda = 937	Délka = 942	Shora/Délka = 99,5 procent
-------------	-------------	----------------------------

Konec dokumentu