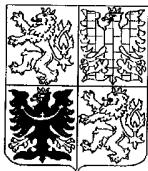


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 01.09.1997

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 07.02.1997 30.04.1997

(31) Číslo prioritní přihlášky: 1997/025667 1997/113052

(33) Země priority: JP JP

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 15.03.2000
(Věstník č. 3/2000)

(86) PCT číslo: PCT/JP97/03051

(87) PCT číslo zveřejnění: WO98/35025

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2761

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 7:

C 12 N 9/02

C 12 N 15/53

C 12 N 15/63

C 12 N 1/21

C 12 P 7/62

/(C 12 N 9/02, C 12 R 1:91, C 12 P 7/62,
C 12 R 1:91)

(71) Přihlašovatel:

KANEKA CORPORATION, Osaka-shi,
JP;

(72) Původce:

Yosohara Yoshihiko, Himeji-shi, JP;
Kizaki Noriyuki, Takasago-shi, JP;
Hasegawa Junzo, Akashi-shi, JP;
Wada Masaru, Kyoto-shi, JP;
Shimizu Sakayu, Kyoto-shi, JP;
Kataoka Michihiko, Kyoto-shi, JP;
Yamamoto Kazuhiko, Takatsuki-shi, JP;
Kawabata Hiroshi, Kyoto-shi, JP;
Kita Keiko, Tottori-shi, JP;

(74) Zástupce:

Kratochvíl Václav Ing., Husníkova 2082,
Praha 5, 155 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nová karbonylová reduktasa, gen, který ji
kóduje a způsob pro použití této reduktasy a
genu**

(57) Anotace:

Enzym s karbonyl redukční aktivitou schopný asymetricky
redukovat karbonylové sloučeniny za vzniku opticky
aktivního alkoholu, DNA kódující tento enzym, plasmid
nesoucí tuto DNA, transformant, který je buňka
transformována plasmidem, a způsob přípravy opticky
aktivního alkoholu za použití enzymu a/nebo
transformovaných buněk.

15.12.99

PV1999-2761

- 1 -

~~86/86~~

Nová karbonylová reduktasa, gen, který ji kóduje a způsob pro použití této reduktasy a genu.

Oblast techniky

Vynález se týká enzymu s karbonyl reduktasovou aktivitou, která redukuje sloučeniny s asymetrickým karbonylem za vzniku opticky aktivního alkoholu (dále bude tento enzym označován jako CRD enzym), DNA kódující tento enzym, plasmidu nesoucího tuto DNA, transformantu, kterým je buňka obsahující tento plasmid, a metody pro získávání opticky aktivního alkoholu za použití zmíněného enzymu a/nebo transformovaných buněk. Výsledný opticky aktivní alkohol, například (S)-4-halo-3-hydroxybutyl ester, je užitečnou sloučeninou pro syntesu léčiv, chemikálií pro zemědělství a podobně.

Dosavadní stav techniky

Je známo několik CRD enzymů (viz. Yuki Gosei Kagaku, 49, 52 (1991) a Eur. J. Biochem., 184, 1 (1981)). Mezi těmito CRD enzymy, jsou ty které působí na 4-halo-acetooctové estery za vzniku (S)-4-halo-3-hydroxybutyl esteru, získané z mikroorganismů, mající popsané charakteristiky, pouze enzymy získanými z *Geotrichum candidum* (Enzyme Microb. Technol. (1992), Vol.14, 731) a z *Candida parapsilosis* (Enzyme Microb. Technol. (1993), Vol. 15, 950). Avšak doposud nebyly popsané žádné informace o genech kódujících tyto dva typy enzymů. Redukce 4-halo-acetooctových esterů za použití těchto enzymů probíhá pouze při nízkých koncentracích substrátu. Je tudíž nepraktické syntetisovat (S)-4-halo-3-hydroxybutyl ester za použití těchto enzymů jako katalysátorů.

Kromě uvedené reakce používající dvou typů enzymů, celá řada reakcí používá mikrobiální buňky a o produktech těchto reakcí je známo, že vznikly asymetrickou redukcí 4-halo-acetooctového esteru (Japonský patent číslo 1723728, japonská Laid-Open publikace č. 6-209782 a č. 6-38776, a podobně). Avšak tyto reakce neprobíhají při vysokých koncentracích substrátu a tudíž nemohou být užívány v praxi jako účinná produkční metoda. Jako příklad může sloužit metoda reakce používající dvoufázový systém s organickým rozpouštědlem

(Japonský patent číslo 2566962). Rovněž byla popsána metoda používající opticky aktivní fosfinový komplex s rutheniem (japonská Laid-Open publikace č. 1-211551). Tato metoda však má mnoho problémů, které nejsou dořešeny, například požadavek na vysokotlakou reakční nádobu a potřeba drahého katalysátoru.

Za těchto okolností bylo žádoucí vyvinout praktickou enzymovou metodu, která by prováděla asymetrickou redukci karbonylových sloučenin jako jsou 4-halo-acetooctové estery k produkci opticky aktivních alkoholů, například (S)-4-halo-3-hydroxy butyl ester.

Enzymy CRD typu vyžadují pro reakci redukční typ koenzymu. Má-li být redukováná karbonylová sloučenina pomocí buněk mikroorganismů, které mají CRD enzym, je nutné do reakčního systému přidat cukr, například glukosu, aby se aktivovaly enzymy regeneračního systému pro přeměnu oxidovaného koenzymu na redukovaný typ, a tento regenerovaný koenzym je pak využit pro redukci. Skupina těchto enzymů regeneračního systému je náchylná k zablokování nebo poškození, a to buď substrátem nebo produkty redukce. Tento fakt je nutné brát v úvahu jako hlavní příčinu toho, proč reakce probíhá pouze tehdy, je-li koncentrace substrátu nebo produktu nízká. Je známo, že množství drahého koenzymu užívaného pro redukci lze značně snížit kombinací enzymu majícího schopnost regenerace koenzymu, na kterém CRD enzym závisí, s CRD enzymem během reakce (Japonský patent č. 2566960) a Enzyme Microb. Technol. (1993), Vol.15, 950). V tomto případě je však nutné připravit zdroj enzymu pro regeneraci odděleně od produkce CRD enzymu dříve, než je regenerační enzym přidán do reakční směsi.

Předkladatelé tohoto vynálezu objevili nový typ CRD enzymu u rodu *Candida*, a našli, že opticky aktivní alkohol může být účinně produkován z karbonylových sloučenin za užití tohoto CRD enzymu.

Také našli, že opticky aktivní alkohol lze účinně produkovat za použití transformovaných buněk nesoucích gen se schopností souběžně regenerovat koenzym (například glukosodehydrogenasový gen).

Tudíž předložený vynález se dá popsat jako systém, který výhodně poskytuje nový typ CRD enzymu, DNA kódující tento enzym, plasmid nesoucí tuto DNA, a transformované buňky tímto plasmidem. Systém slouží jako produkční způsob k získání opticky aktivních alkoholů za použití zmíněného enzymu a/nebo transformovaných buněk.

Podstata vynálezu

Karbonylová reduktasa uváděná v předloženém vynálezu má následující fyzikální a chemické vlastnosti od (1) do (4) :

(1) účinek:

působí na ethyl-4-chloroacetoacetát při využití NADPH jako koenzymu za vzniku (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrátu;

(2) substrátová specifita:

vykazuje silnou aktivitu k ethyl-4-chloroacetoacetátu, zatímco k ethyl acetoacetátu nevykazuje prakticky vůbec žádnou aktivitu;

(3) optimální pH: 5,5 až 6,5;

(4) optimální teplota reakce: 50°C až 55°C;

V jednom řešení má karbonylová reduktasa další fyzikální a chemické vlastnosti od (5) do (7):

(5) tepelná stabilita: je plně stabilní až do 40°C, je-li uchována při pH 7,0 po 30 min;

(6) inhibitor: je inhibována ionty rtuti a kvercetinem; a

(7) molekulová hmotnost: určeno gelovou filtrací cca 76 000 a cca 32 000 pomocí SDS polyakrylamidové elektroforesy.

Karbonylová reduktasa uváděná v předloženém vynálezu má sekvenci aminokyselin SEQ ID No:1 seznamu sekvencí nebo aminokyselinovou sekvenci s jednou nebo několika vynechanými aminokyselinami, substituované nebo přidané v aminokyselinové sekvenci SEQ ID No:1 soupisu sekvencí, nebo část aminokyselinových sekvencí SEQ ID No:1 soupisu sekvencí, a má aktivitu redukovat ethyl-4-chloroacetoacetát asymetricky za vzniku ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrátu.

V jednom provedení je zmíněný enzym získáván v mikroorganismu náležejícího do rodu *Candida*. S výhodou je tento enzym získáván z *Candida magnoliae*. Nejvýhodněji je enzym získáván z druhu *Candida magnoliae* IFO 0705.

DNA kódující podle předloženého vynálezu zmíněný enzym. Tato látka, tj. zmíněná DNA má sekvenci nukleotidů odpovídající SEQ ID No:2 seznamu sekvencí.

Plasmid, který podle tohoto vynálezu má shora uvedenou DNA sekvenci. Plasmid těchto sekvencí je označen pNTS1.

Transformované buňky podle předloženého vynálezu jsou buňky, které byly transformovány shora uvedeným plasmidem. Takovou transformovanou buňkou může být *E. coli*. Ve výhodném provedení jsou transformované buňky buňkami *E. coli* HB101(pNTS1).

Plasmid podle tohoto vynálezu má DNA kódující enzym mající schopnost asymetricky redukovat ethyl-4-chloroacetoacetát za vzniku ethyl (S)-4-chlorohydroxybutyrátu a DNA kódující enzym se schopností regenerace koenzymu na kterém enzym závisí (například glukosodehydrogenasa).

V jednom řešení je glukosodehydrogenasa získávána z *Bacillus megaterium*. Je výhodné, je-li nesena plasmidem pNTS1G.

Transformované buňky podle tohoto vynálezu jsou transformanti, kde buňky byly transformovány uvedeným plasmidem.

V jednom provedení jsou transformované buňky *E. coli*. Ve výhodném provedení, jsou transformované buňky *E. coli* HB101(pNTS1).

Transformované buňky podle předkládaného vynálezu jsou buňky transformované tak, že první plasmid obsahuje DNA kódující enzym s aktivitou asymetricky redukovat ethyl-4-chloroacetoacetát za vzniku ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutyrátu a druhý plasmid obsahuje

DNA kódující enzym mající aktivitu regenerovat koenzym na kterém je enzym závislý (například glukosodehydrogenasa).

V jednom řešení lze za transformované buňky pokládat takové transformanty, jejichž buňky nesou plasmid pNTS1 a plasmid, které obsahují DNA kódující glukosodehydrogenasu, získaný z *Bacillus megaterium*. Přednostní formou transformovaných buněk jsou buňky *E. coli*.

Produkční způsob pro výrobu opticky aktivního 3-hydroxybutyl esteru podle předkládaného vynálezu zahrnuje následující kroky: reakce enzymu s aktivitou asymetricky redukovat s 3-oxo-butyl ester s 3-oxo-butyl esterem za vzniku opticky aktivního 3-hydroxy-butyl esteru, nebo kultura mikroorganismu majícího schopnost produkce tohoto enzymu, nebo izolovaný produkt této kultury; a získání vytvořeného produktu, kterým je opticky aktivní 3-hydroxy-butyl ester.

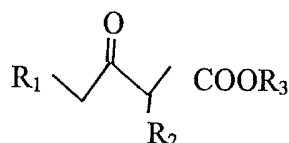
Produkční způsob pro výrobu opticky aktivního 3-hydroxy butyl estaru podle předloženého vynálezu sestává z těchto kroků: reakce transformantů, kterými jsou buňky transformované plasmidem nesoucím DNA kódující enzym s aktivitou asymetricky redukovat 3-oxo- butyl ester s 3-oxo-butyl esterem za vzniku opticky aktivního 3-hydroxy-butyl esteru; a získání vzniklého produktu, kterým je opticky aktivní 3-hydroxy-butyl ester.

Produkční způsob pro výrobu opticky aktivního alkoholu podle předloženého vynálezu sestává z těchto kroků: transformanti, kterými jsou buňky transformované plasmidem nesoucím DNA, která kóduje enzym s aktivitou asymetricky redukovat karbonylové sloučeniny a dále DNA kódující enzym se schopností regenerace koenzymu, na kterém enzym závisí reagují se sloučeninami obsahujícími karbonyl a dávají vznik opticky aktivnímu alkoholu; dále získání vzniklého produktu, kterým je opticky aktivní alkohol.

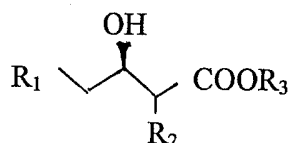
Produkční způsob k získání opticky aktivního alkoholu podle předloženého vynálezu sestává z kroků: se sloučeninami obsahujícími karbonylovou skupinu reaguje transformant, kterým je buňka, která obsahuje jako první plasmid nesoucí DNA kódující enzym s aktivitou asymetricky redukovat karbonylové sloučeniny za vzniku opticky aktivního alkoholu a jako

druhý plasmid, který obsahuje DNA kódující enzym, který má schopnost regenerovat koenzym na kterém je enzym závislý; dále získání vzniklého produktu, kterým je opticky aktivní alkohol.

Je výhodné, je-li sloučeninou, obsahující karbonyl 3-oxo-butyl, ester, který lze zobrazit obecným vzorcem:



a výsledný opticky aktivní alkohol je 3-hydroxy-butyl ester, který lze zobrazit obecným vzorcem:



Je výhodné, jsou-li ve shora uvedených obecných vzorcích skupiny R_1 a R_2 nezávislé halogeny, azidy, aminobenzyly nebo vodík, přičemž jeden z R_1 a R_2 má být vodík, a R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkylová nebo arylová skupina.

Ještě výhodnější je, je-li ve shora uvedených obecných vzorcích R_1 chlor, R_2 je vodík a R_3 je ethyl.

Je výhodné, jsou-li ve shora uvedených obecných vzorcích skupiny R_1 a R_2 nezávislé alkylové skupiny, hydroxylové skupiny nebo vodík, přičemž jeden z R_1 a R_2 má být vodík, a R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkylová nebo arylová skupina.

Ještě výhodnější je, je-li ve shora uvedených obecných vzorcích R_1 hydroxylová skupina, R_2 je vodík a R_3 je ethyl.

Přehled obrázků na výkresech

Na obr. 1 je znázorněno pořadí bází a tomu odpovídající aminokyselinové sekvence.

Na obr. 2 je znázorněn způsob užitý při konstrukci rekombinantního plasmidu pNTS1G.

Příklady provedení vynálezu

Dále bude předložený vynález popsán se všemi podrobnostmi.

(Purifikace CRD enzymu)

Organismus používaný jako zdroj CRD enzymu v předloženém vynálezu, není zcela přesně vymezen, ale může jím být například kvasinka rodu *Candida*. Je obzvláště výhodné, je-li to kvasinka *Candida magnoliae* IFO 0705, která je uložena ve sbírce mikroorganismů "Cetraalbureau voor Schimmelcultures" (CBS; Oosterstraat 1, Postbus 273, NL/3740 AG Baarn, Holandsko) pod číslem CBS166 a jejíž izolace a charakteristika jsou popsány v knize „The Yeasts, a Taxonomic Study, 3rd ed. (1984) pp.731. Mikroorganismus schopný produkce enzymu podle předloženého vynálezu může být buď divoký nebo mutantní kmen. Rovněž může být používán mikroorganismus získaný genetickými technikami, jakými jsou fúze buněk nebo genetické manipulace. Například mikroorganismus získaný genetickou manipulací, který produkuje enzym podle předloženého vynálezu lze získat metodou zahrnující tyto kroky: izolace a/nebo purifikace tohoto enzymu a určení části nebo celé sekvence aminokyselin; získání DNA sekvence nebo úseku DNA kódujícího enzym, na základě dříve zmíněné sekvence aminokyselin; vnesení této DNA do jiného mikroorganismu s cílem získat rekombinantní mikroorganismus podle předloženého vynálezu.

Medium ke kultivaci mikroorganismu pro získání enzymu podle předloženého vynálezu (nebo mikroorganismu užitého pro přípravu (S)-4-halo-3-hydroxybutyl esteru podle předloženého vynálezu) není zvláště vymezené, pokud na něm může mikroorganismus růst.

Například mohou být použita obvyklá tekutá výživná media, obsahující zdroj uhlíku, zdroj dusíku, anorganické soli, organické nutrienty.

Pod "mikrobiální kulturou" zde pak rozumíme mikrobiální buňky nebo tekutou kulturu obsahující mikrobiální buňky a "jejich vytvořený produkt", což znamená produkt získaný extrakcí a purifikací, jak je popsáno dále.

Způsob extrakce a purifikace enzymu, které se užívají pro tyto účely odborníky v dané oblasti techniky, mohou být užity pro extrakci a purifikaci enzymu po výsledné kultivaci. Například z kultury se centrifugací separují mikrobiální buňky, které se suspendují do vhodného pufru. Buňky v této suspenzi se rozruší nebo rozpustí za použití fyzikálních technik, jako je užití skleněných kuliček nebo biochemickými technikami, což představuje použití vhodného enzymu. Pevné částice jsou potom z roztoku odstraněny centrifugací a tak se získá nečistý roztok enzymu. Podobně lze roztok surového enzymu získat z kultury purifikačními metodami, které jsou podobné shora popsanému postupu.

Zmíněný roztok surového enzymu lze dále čistit za použití způsobů užívaných odborníky v dané oblasti techniky, jako je srážení síranem amonným, dialysa a chromatografie, a to jak samotnými nebo v jejich kombinaci. Pokud jde o chromatografii, různé typy chromatografií jako je hydrofobní chromatografie, iontoměnná chromatografie (např. DEAE Sepharosa), gelová filtrace, mohou být užity buď samotné nebo v kombinaci pro získání enzymu podle předloženého vynálezu.

Například CRD enzym lze izolovat z *Candida magnoliae* IFO 0705 následujícím způsobem.

Nejprve se shora uvedená kvasinka kultivuje ve vhodném mediu, a mikrobiální buňky jsou sklizeny z výsledné kultury centrifugací. Mikrobiální buňky jsou rozrušeny desintegrátorem Dyno (výrobce Dyno-Mill), a další centrifugací jsou odstraněny zbytky buněk a získá se bezbuněčný extrakt. Tento bezbuněčný extrakt se pak dále zpracovává postupy jako je vysolování (tj. srážení síranem amonným a fosforečnanem sodným), srážení rozpouštědly (frakcionové srážení bílkovin za použití acetonu, ethanolu nebo podobnými látkami), dialysou,

gelovou filtrací, iontoměnnou chromatografií a sloupcovou chromatografií, což může být reversní fázová chromatografie a ultrafiltrace samotná nebo v kombinaci s dalšími postupy, aby se enzym purifikoval. CRD enzymová aktivita může být určena měřením ze snížení absorpce 1 mM ethyl 4-chloracetátu jako substrát, při 340 nm a 30°C v 100 mM fosfátovém pufru (pH 6,5), 0,1 mM NADPH jako koenzym po přidání sledovaného enzymu, nebo v 200 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) s 0,2 mM ethyl 4-chloracetátem jako substrátem a 0,32 mM NADPH jako přidaný koenzym. Za těchto reakčních podmínek oxidace 1 μ mol NADPH na NADP během 1 minuty je definovaná jako 1 jednotka enzymové aktivity.

Výraz, že enzym je "stálý", který je zde užíván znamená, že enzym má při pH 7,0, teplotě 40°C, po uplynutí 30 minut aktivitu 90% nebo více, než byla na začátku testu.

Molekulová hmotnost enzymu byla určena gelovou filtrací za použití kolony TSK-G3000SW (ϕ 0,75 x 60 cm; výrobce Tosoh Corporation). Jako eluent byl užít 0,1M fosfátový pufr (pH 7,0) obsahující 0,1M Na₂SO₄ a 0,05 % NaN₃. Molekulová hmotnost podjednotky enzymu byla určena elektroforesou v 10 % SDS polyakrylamidovém gelu za redukujících podmínek (reduktant: 2 V/V% 2-merkapt ethanol) a výpočtem z relativní pohyblivosti standardních proteinů.

Například CRD enzym, který má pořadí aminokyselin SEQ ID No:1 podle předloženého vynálezu má fyzikální a chemické vlastnosti od (1) do (4):

(1) účinek:

reaguje s ethyl-4-chloracetoacetátem za použití NADPH jako koenzymu za vzniku ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu;

(2) substrátová specifita:

vykazuje silnou aktivitu k ethyl-4-chloroacetoacetátu zatímco prakticky vůbec nevykazuje aktivitu k ethyl-acetoacetátu;

(3) optimální pH: 5,5 až 6,5; a

(4) optimální teplota pro aktivitu: 50°C až 55°C.

Tato látka, totiž karbonyl reduktasa mající pořadí aminokyselin SEQ ID No:1 podle předloženého vynálezu, má další fyzikální a chemické vlastnosti od (5) do (7):

- (5) teplotní stabilita: enzym je stálý až do teploty 40°C , při pH 7,0 po 30 minut;
- (6) inhibitor: enzym je inhibován ionty rtuti a kvercetinem; a
- (7) molekulová hmotnost: cca 76 000 určeno gelovou filtrací a cca 32 000 stanoveno SDS polyakrylamidovou elektroforesou.

Enzym mající v podstatě identické vlastnosti s enzymem podle předloženého vynálezu může být buď přirozený nebo rekombinantní enzym. Například rekombinantní enzym lze získat následujícím postupem: jedna nebo několik aminokyselin v aminokyselinovém pořadí enzymu získaného z *Candida magnoliae* IFO 0705 lze nahradit, vypustit, vložit nebo přidat a tak vytvořit rekombinantní enzym, jehož enzymová aktivita je měřitelná.

(Příprava syntetické oligonukleotidové sondy)

Purifikovaný CRD enzym získaný shora uvedeným postupem je denaturován (například 8M močovinou) a pak natráven endopeptidasou (například lysyl endopeptidasou). Pořadí aminokyselin ve vzniklých fragmentech peptidů je určeno Edmanovou metodou. DNA sonda je syntetisovaná na základě určeného pořadí aminokyselin. Takováto sonda může být označena například ^{32}P .

(Příprava genové knihovny)

Chromosomální DNA mikroorganismu produkujícího CRD enzym podle předloženého vynálezu nebo cDNA téhož je částečně natrávena vhodným restrikčním enzymem, například, *Sau3AI*. Fragmenty DNA mající vhodnou velikost (například 23 kb až 20 kb) po působení restrikčního enzymu jsou vloženy do kompatibilního restrikčního enzymového místa na fágovém vektoru. Výsledný rekombinantní fágový vektor je uložen *in vitro* a potom je možné jím infikovat *E. coli* a vytvořit tak genovou knihovnu.

(Klonování Genu CRD enzymu z genové knihovny)

Takto vzniklá genová knihovna může být prohlížena a vyhledáván gen pro CRD enzym pomocí metody plakové hybridizace za použití ^{32}P značené syntetické DNA sondy. (Science, 196, 180 (1977)). Analýza pořadí basí výsledné DNA může být určena dideoxy sekvenční metodou, dideoxy řetězovou terminační metodou nebo podobně. Určení sekvencí může být

prováděno za použití ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (výrobce Perkin Elmer) a ABI 373A DNA Sequencer (výrobce Applied Biosystems).

Výsledný fragment DNA může být amplifikován použitím metody PCR nebo podobné a klonován.

(Konstrukce rekombinantního plasmidu obsahujícího gen CRD enzymu)

Gen CRD enzymu je vpraven do hostitelského mikroorganismu a exprimován zde pomocí DNA vektoru. Jako takový DNA vektor, lze užít jakýkoli DNA vektor, který může zabezpečit expresi genu CRD enzymu ve vhodném hostitelském mikroorganismu. Příklady těchto DNA vektorů jsou plasmidové vektory, fágové vektory a případně cosmidy. Lze použít přenašečový vektor, který umožňuje výměnu genu mezi různými hostitelskými kmeny. Takový DNA vektor obsahuje řídící úseky jako je promotor (například lacUV5 promotor, trp promotor, trc promotor, tac promotor, lpp promotor, tufB promotor, recA promotor a promotor pL) a úseky posilující tuto vazbu. Například pUCNT (WO94/03613) a podobný mohou být přednostně použity. Plasmid pUCNT je výhodný proto, neboť jeho inserční místa jako NdeI a EcoRI leží vpravo za lac promotorem (downstream).

(Konstrukce rekombinantního plasmidu nesoucího jak gen CRD, tak gen enzymu majícího schopnost regenerace koenzymu, na kterém aktivita CRD enzymu závisí)

Mohou být užity enzymy se schopností regenerace koenzymu jako jsou hydrogenasa, formiatdehydrogenasa, alkohol dehydrogenasa, glukoso-6-fosfátdehydrogenasa, glukosodehydrogenasa. Je výhodné, je-li užita glukosodehydrogenasa. Přesněji, jde o glukosodehydrogenasu z kmene *Bacillus megaterium* (dále zkracovanou jako GDH), kterou lze užít.

Plasmid pGDA2 (J. Biol.Chem. (1988), 264,6381) obsahuje GDH gen získaný z *Bacillus megaterium*. Fragment nesoucí GDH gen se dá vyjmout z tohoto plasmidu a vložit do plasmidu obsahujícího gen enzymu CRD a to buď před něj nebo za něj (upstream nebo downstream) a tak vytvořit rekombinantní plasmid nesoucí jak gen pro CRD enzym, tak gen pro GDH.

(Transformace)

Výsledný rekombinantní plasmid nesoucí gen CRD enzymu nebo rekombinantní plasmid mající jak gen CRD enzymu, tak gen GDH, mohou být konvenčními metodami vneseny do hostitelské buňky. Nebo rekombinantní plasmid nesoucí gen CRD enzymu a rekombinantní plasmid nesoucí gen GDH mohou být současně, nebo postupně vneseny do hostitelské buňky tak, aby se získal kmen transformovaný těmito dvěma plasmidy.

Jako hostitelskou buňku lze užít bakterii, kvasinku, vláknitou houbu, rostlinnou buňku, živočišnou buňku apod. Obzvláště výhodné je, užije-li se *E. coli*.

Plasmid je možno přenést do hostitelské buňky některou známou současnou metodou, jakou je metoda zahrnující smíchání hostitelské buňky v kompetentním stavu s rekombinantním plasmidem a dále metoda zahrnující transfekci plasmidu za použití plasmidu typu "helper" pomocí konjugační transmise.

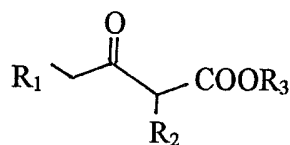
Plasmid vnesený do hostitelské buňky se v této může autonomně replikovat jako episom. Nebo celý plasmid nebo jeho části jsou včleněny do chromosomu a replikují se spolu s chromosomem.

Aktivita GDH transformovaných buněk může být určena měřením zvýšení absorpce při 340 nm při 25°C, v 1 M tris-HCl pufru (pH 8,0), v reakci, kde substrátem je 0,1 M glukosa, 2 mM NADP je koenzymem, po přidání enzymu.

(Získání opticky aktivního alkoholu)

Opticky aktivní 4-halo-3-hydroxy butyl ester, který je reprezentantem opticky aktivních alkoholů lze získat následujícím způsobem například takto.

Jako substrát je užit 4-halo acetoocethyl ester přestavený následujícím obecným vzorcem:



(kde, R_1 je halogen, R_2 je vodík a R_3 je substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl nebo aryl). V případě, je-li R_3 alkyl, mohou být použity například skupiny jako methyl, ethyl, propyl, butyl, nebo isopropyl. Je-li R_3 aryl, pak například mohou být přítomny skupiny jako fenyl nebo tolyl. Je-li R_3 substituovaný aryl, pak jsou výhodné skupiny jako flurofenyl, chlorofenyl a podobně.

Je výhodné, je-li jako R_1 chlor nebo brom, a R_3 je pak alkylová skupina od 1 do 4 atomů uhlíku. Ještě výhodnější je, je-li substrát methyl-4-chloroacetoacetát, ethyl-4-chloroacetoacetát, methyl-4-bromoacetoacetát nebo ethyl-4-bromoacetoacetát. Rovněž ethyl-4-jodoacetoacetát, ethyl-4-hydroxyacetoacetát, ethyl-2-chloro-3-oxobutyřát, ethyl-2-methyl-3-oxobutyřát, ethyl-4-azidoacetoacetát a podobné sloučeniny mohou být substráty.

Shora uvedený 4-haloacetoacetátový ester lze připravit metodou uveřejněnou například v Japanese Laid-Open Publication číslo 61-146191. Například tyto 4-halo acetoacetátové estery mohou být připraveny metodou používající diketen jako výchozí materiál, který reaguje s halogenem za vzniku-haloacetoacetát halidu, který pak reaguje s alkoholem. Nebo 4-halo acetoacetátový ester je užít jako výchozí materiál a jeho kvarterní místo je přímo halogenováno.

4-haloacetoacethyl ester jako substrát se vnáší do vhodného rozpouštědla spolu s NADPH jako koenzymem a kulturou transformovaného mikroorganismu, nebo z něj získaným produktem a směs je promíchávána a pH se vhodně upraví. Tato reakce probíhá při pH od 4 do 10 při teplotě od 10 do 70°C. Ačkoli užívané koncentrace substrátu jsou v rozsahu od 0,1 do 90 % (w/v), lze také substrát kontinuálně přidávat. Reakce může probíhat jak vsádkovým, tak kontinuálním způsobem.

Produkt získaný z mikroorganismu nebo jiných buněk, jak uvedeno shora, může být surový extrakt, nakultivované mikrobiální buňky, lyofilisované organismy, acetonem vysušené

organismy, homogenát mikrobů a podobně. Tento vytvořený produkt může být užíván ve stavu imobilizovaném, jako enzym, nebo jako buňky mikroorganismů. Pro imobilizaci lze užít současné metody (například fyzikálně absorpční metody, zřetězující vazby nebo zachycovací metody).

V reakci pak, množství drahého koenzymu, může být značně sníženo za využití obecného regeneračního systému NADPH. Například může být užita metoda používající GDH a glukosu, která je typickým regeneračním systémem NADPH. Reakční podmínky, i když závisí na typu enzymu, mikroorganismu nebo jeho produktu, jsou následující: koncentrace substrátu je v rozmezí od 0,1 do 90 % wt, reakční teplota je od 10 do 50°C, pH je od 5 do 8, a doba reakce je mezi 1 až 36 hodinami.

Shora uvedená reakce může být prováděna za použití kultury transformovaného mikroorganismu nebo vytvořeného produktu získaného vnesením jak genu pro CRD enzym a genu enzymu (GDH) majícího schopnost regenerovat koenzym, na kterém CRD enzym závisí, do hostitelského mikroorganismu. V tomto případě pak už další příprava zdroje enzymu požadovaného pro regeneraci koenzymu není nutná, a (S)-4-halo-3-hydroxy butyl ester lze připravit s nižšími náklady.

Tento 4-halo-3-hydroxy butyl ester vzniklý v reakci může být purifikován standardními metodami. Například 4-halo-3-hydroxy butyl ester je podroben centrifugaci, filtraci a dalším postupům, které jsou obvyklé pro odstranění mikrobů z reakční směsi. Výsledný produkt je pak extrahován organickým rozpouštědlem jako například ethylacetátem a toluenem a odvodněn látkami jako síran sodný. Organické rozpouštědlo se odstraní pod vakuem. Výsledný produkt je pak podroben vakuovému sušení, chromatografii (například křemičité gelové sloupcové chromatografii) a podobným purifikačním postupům.

Kvantitativní stanovení 4-halo-3-hydroxy butyl esteru lze provádět plynovou chromatografií. Například kvantitativní stanovení ethyl-4-chloro-3-hydroxybutyrátu může být provedeno na chromatografu se skleněnou kolonou (ID 3 mm x 1 m) plněnou PEG-20M Chromosorb WAWDMCS 10% 80/100 mesh (vyrobena GL Science Co. Ltd.) při 150°C a FID detekci.

Optická čistota ethyl (S)-4-halo-3-hydroxybutyrátu může být určena použitím HPLC s optickou isolační kolonou CHILCEL OB (vyrobena Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.).

Tudíž jak svrchu popsáno předložený vynález umožňuje produkci CRD enzymu. Dále pak, za použití tohoto enzymu, je zabezpečen účinný produkční způsob k získání opticky aktivního alkoholu, jako například (S)-4-halo-3-hydroxybutyl esteru.

V dalším pak bude předložený vynález popsán podrobně na příkladech, které jsou pouze ilustrační a není jimi omezen rozsah ochrany.

Detaily způsobů použitých k genovým manipulacím užívaných k získání rekombinantní DNA jsou popsány na příkladech v následujících publikacích.

(I) Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)

(II) Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)

(Příklad 1: Purifikace CRD enzymu)

CRD enzym mající schopnost asymetricky redukovat 4-halo acetoacetátový ester, získaný z *Candida magnoliae* IFO 0705, za vzniku (S)-4-halo-3-hydroxy butyl esteru byl purifikován následujícím způsobem, tak, že se pohyboval jako jediný pruh v elektroforese.

Bylo připraveno 8 000 ml tekutého media následujícího složení, toto medium bylo rozděleno po 400 ml dávkách do Sakaguchiho lahví o obsahu 2 000 ml a sterilizováno parou při 120°C po 20 minut.

Složení media:

Glukosa	5,00 %
Polypepton	0,50 %
KH_2PO_4	0,20 %
K_2HPO_4	0,10 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,01 %
Vodovodní voda	
PH 6,5	

Shora uvedené medium bylo zaočkováno kulturou *Candida magnoliae* IFO 0705, která byla předkultivovaná v objemu 5 ml/ láhev po 3 dny na třepačce při 30°C. Buňky mikroorganismu byly sklizeny z výsledné kultury centrifugací a dvakrát promyty roztokem soli, takže se získalo 230 g vlhké hmoty biomasy. Z této vlhké biomasy bylo 180 g rozmícháno v 360 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0), potom byly buňky rozbity desintegrátorem Dyno mill (výrobce Dyno-Mill). Suspense desintegrovaných mikroorganismů byla centrifugována, aby se odstranily zbytky buněčných struktur a získalo se 760 ml bezbuněčného extraktu. K němu byl přidán síran amonný až do 40 % nasycení. Výsledný precipitát byl odstraněn centrifugací a supernatant byl dialysován proti 10 mM fosfátovému pufru (pH 7,0) obsahujícímu 0,1 mM DTT. Výsledný produkt byl nanesen na kolonu (500 ml) DEAE Sephacelu (výrobce Pharmacia Biotech), která obsahovala stejný pufr, a rovněž tímto pufrem byla kolona promyta. Frakce s enzymovou aktivitou byly sebrány a k naředěnému roztoku, který prošel kolonou byl přidán NaCl až do konečné koncentrace 4 M. Aktivní frakce byly naneseny na kolonu (200 ml) plněnou Phenyl Sepharose CL-4B (výrobce Pharmacia Biotech), ekvilibrovanou 10 mM fosfátovým pufrem, obsahujícím 4 M NaCl a 0,1 mM DTT, na kterou se enzym adsorboval. Poté byla kolona promyta stejným pufrem, aktivní frakce byly eluovány 10 mM fosfátovým pufrem (pH 7,0) s lineárním gradientem NaCl (od 4 M do 0 M) a ethylenglykolu (od 0% do 50% w/v). Eluované aktivní frakce byly spojeny a dialysovány přes noc v 10 mM fosfátovém pufru (pH 7,0).

Výsledný dialysát byl nanesen na kolonu (1 ml) Mono Q HR 5/5 (FPLC systém vyrobený Pharmacia Biotech), který byl ekvilibrován v 10 mM fosfátovém pufru. Aktivní frakce v promývacím roztoku byly spojeny a koncentrovány ultrafiltrací na 200 µl. Tento

koncentrát byl nanesen na kolonu (24 ml) obsahující Superdex 200 HR 10/30 (výrobce Pharmacia Biotech), která byla ekvilibrovaná 10 mM fosfátovým pufrem (pH 7,0) obsahujícím 0,2 M NaCl a 0,1 mM DTT a byly eluovány tímž pufrem. Aktivní frakce byly spojeny pro získání purifikovaného enzymu.

(Příklad 2: Měření vlastností enzymu)

Byly zkoumány enzymové charakteristiky enzymu získaného způsobem uvedeným v příkladu 1.

Enzymová aktivita byla určena v 3 ml reakčního roztoku obsahujícího 0,2 mM ethyl-4-chloroacetoacetát jako substrát, 0,32 mM NADPH jako koenzym a 0,1 ml roztoku enzymu v 200 mM fosfátovém pufru (pH 7,0) při 1 minutové reakci při 30°C a měření snížení hodnot absorpce při 340 nm.

- (1) Účinek: Enzym působí na ethyl-4-chloroacetoacetát za přítomnosti NADPH jako koenzymu za vzniku ethyl (S)-4-hydroxybutyrátu, který má optickou čistotu minimálně 99 % nebo více.
- (2) Substrátová specifita: Enzym podle předloženého vynálezu reaguje s různými karbonyl obsahujícími sloučeninami jak ukazuje níže uvedená Tabulka 1. Podmínky reakce těchto substrátů byly stejné jako u ethyl-4-chloroacetoacetátu. Výsledná substrátová specifita, kterou enzym vykazoval ukazuje Tabulka 1.

Tabulka 1

Substrát 0,2 mM	Relativní aktivita (%)
ethyl- 4-chloracetacetát	100
ethyl-acetoacetát	0
p-nitrobenzaldehyd	0
o-nitrobenzaldehyd	0
m-nitrobenzaldehyd	0
p-chlorbenzaldehyd	0
o-chlorbenzaldehyd	0
m-chlorbenzaldehyd	0
nikotinaldehyd	0
iso-nikotinaldehyd	0
benzaldehyd	0
glyoxal	0
methylglyoxal	0
diacetyl	19
chloracetaldehyd	0
kamforylchinon	0
ethyl-2-chloracetoacetát	95
methyl-4-chloracetacetát	11
methyl-2-chloracetoacetát	11
oktyl-4-chloracetoacetát	36

- (3) Optimální pH: Enzymová aktivita byla měřena v pH rozsahu od 5,0 do 8,5 v fosfátovém pufru nebo pufru Tris – Hcl. Výsledkem bylo zjištění, že optimální pH pro účinek enzymu na ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát leží mezi hodnotami 5,5 – 6,5.
- (4) Optimální teplota: Aktivita enzymu podle předloženého vynálezu byla měřena s užitím ethyl-4-chloracetoacetátu jako substrátu po 1 minutu v teplotním rozmezí od 20°C do 60°C. Výsledkem je zjištění, že optimální teplota je v rozmezí od 50 do 55°C.
- (5) Teplotní stabilita: Enzym podle předloženého vynálezu byl inkubován při pH 7,0 při 40°C po dobu 30 minut, výsledná aktivita byla měřena s ethyl 4-chloracetoacetátem jako substrátem. Za těchto podmínek byla zachována 90 % aktivita , kterou měl enzym před ošetřením.

- (6) Inhibitor: Různé ionty kovů a inhibitory v různých koncentracích jsou uvedeny v dále uvedené Tabulce 2. Koncentrace odpovídají těm, které byly v reakční směsi kde, měřeným produktem byl ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát, vytvořený ze substrátu ethyl 4-chloracetoacetátu. Výsledkem je zjištění, že enzym podle předloženého vynálezu byl inhibován kvercetinem a ionty rtuti, jak vyplývá z Tabulky 2.

Tabulka 2

Sloučenina	koncentrace inhibitoru (mM)	relativní aktivita (%)
Bez přídavku		100
Kvercetin	0,01	84
	0,1	0
Difenyl hydantoin	1	84
Dikumarol	0,1	97
2,4-dinitrofenol	0,1	86
DTNB	0,05	100
kyselina jodoctová	1	100
NEM	1	105
PMSF	1	93
p-CMB	1	88
EDTA	1	95
Fenylhydrazin	1	97
SnCl ₂	1	77
PbCl ₂	1	86
CdCl ₂	1	91
CuCl ₂	1	85
CoCl ₂	1	89
MgCl ₂	1	83
ZnCl ₂	1	97
HgCl ₂	0,1	49

- (7) Molekulová hmotnost: molekulová hmotnost enzymu byla měřena za užití TSK-G 3000SW kolony v 0,1M fosfátovém pufru (pH 7,0) obsahujícího 0,1M Na₂SO₄ a 0,05 % NaN₃ jako eluent, a byla stanovena cca 76 000. Molekulová hmotnost podjednotky enzymu byla určena z výsledků elektroforesy s 10 % SDS-polyakrylamidovým gelem v přítomnosti 2 v/v% 2-merkptoethanolu a byla vypočtena z relativní pohyblivosti standardních

proteinů. Jako výsledek byla stanovena molekulová hmotnost podjednotky enzymu cca 32000.

- (8) Odolnost k organickým rozpouštědlům: do fosfátového pufru (pH 7,0) bylo přidáno ekvivalentní množství ethylacetátu nebo butyl acetátu, kde byl přítomen enzym podle předloženého vynálezu a směs byla třepána při 28°C po 30 minut a pak centrifugována. Zbytková aktivita enzymu ve vodné fázi byla měřena za použití ethyl-4-chloracetoacetátu jako substrátu. Výsledkem je zachování 72 % aktivity po přidání ethylacetátu a zachování 85 % aktivity po přidání butylacetátu.

(Příklad 3: Produkce ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu za použití enzymu podle předloženého vynálezu)

Ke 100 ml fosfátového pufru (pH 6,5), bylo přidáno 25 ml obsahujících 50 jednotek enzymu podle předloženého vynálezu, 250 mg ethyl-4-chloracetoacetátu, 1,56 mg NADP, 280 mg glukosy a 60 jednotek glukosodehydrogenasy (vyrobena Amano Pharmaceutical Co.,Ltd.) a směs byla 24 hodin promíchávána při 30°C. Po skončení reakce byla reakční kapalina extrahovaná ethylacetátem a extrakt po odstranění rozpouštědla byl analysován. Jako výsledek bylo nalezeno, že ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát o optické čistotě minimálně 99 % byl produkován s výtěžkem 98 %.

Optická čistota ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu byla ověřena Na HPLC s optickou isolační kolonou, CHIRACEL OB (vyrobena Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.). Chromatografie byla prováděna s použitím směsi hexan/isopropanol v poměru 9/1 jako mobilní fáze při rychlosti průtoku 0,8 ml/min. detekce se prováděla měřením absorpce při 215 nm.

Kvantitativní stanovení ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu bylo provedeno plynovou chromatografií při 150°C, s použitím skleněné kolony (ID 3 mm x 1 m) plněné PEG-20M Chromosorbem WAW DMCS 10 % 80/100 mesh (vyrobena GL Science Co., Ltd.), detekce byla provedena pomocí FID.

(Příklad 4: Produkce ethyl (S)-4-brom-3-hydroxybutyrátu za použití enzymu podle předloženého vynálezu)

Ke 100 ml fosfátového pufru (pH 6,5), bylo přidáno 2,5 ml obsahujících 5 purifikovaného jednotek enzymu podle předloženého vynálezu, 25 mg ethyl 4-bromacetoacetátu, 0,16 mg NADP, 28 mg glukosy a 6 jednotek glukosodehydrogenasy (vyrobena Amano Pharmaceutical Co.,Ltd.) a směs byla 24 hodin promíchávána při 30°C. Po skončení reakce byla reakční kapalina extrahovaná ethylacetátem a extrakt po odstranění rozpouštědla byl analyzován. Jako výsledek bylo shledáno, že ethyl (S)-4-brom-3-hydroxybutyrát byl produkován stejným způsobem jako ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát v příkladu 2.

(Příklad 5: produkce methyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu za požití enzymu podle předloženého vynálezu)

K 2,5 ml butylacetátu bylo přidáno 2,5 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6,5) obsahujícího 5 jednotek enzymu podle předloženého vynálezu, 25 mg methyl-4-chlor acetoacetátu, 0,16 mg NADP, 28 mg glukosy a 6 jednotek glukosodehydrogenasy (vyrobena Amano Pharmaceutical Co.,Ltd.) a směs byla 24 hodin promíchávána při 30°C. Po skončení reakce byla reakční kapalina extrahovaná ethylacetátem a extrakt po odstranění rozpouštědla byl analyzován. Jako výsledek bylo nalezeno, že methyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát byl produkován stejným způsobem jako ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát v příkladu 2.

(Příklad 6: produkce ethyl (S)-4chlor-3-hydroxybutyrátu za použití enzymu podle předloženého vynálezu: kontinuální přidávání substrátu)

Ethyl-4-chloracetoacetát v množství 3,8 g byl kontinuálně přidáván k 50 ml 100 mM fosfátového pufru (pH 6,5) obsahujícího 5 jednotek enzymu podle předloženého vynálezu, 25 mg methyl-4-chlor acetoacetátu, 1,56 mg NADP, 4,5 mg glukosy a 250 jednotek glukosodehydrogenasy (vyrobena Amano Pharmaceutical Co.,Ltd.), 0,24 g NaCl rychlostí 0,23 g za hodinu a směs byla 20 hodin promíchávána při 30°C, při stálé úpravě pH hydroxidem sodným. Po skončení reakce byla reakční kapalina extrahovaná ethylacetátem a extrakt po odstranění rozpouštědla byl analyzován. Jako výsledek bylo nalezeno, že ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát, s optickou čistotou 100 % e.e byl získán v výtěžkem 91 %. Kvantitativní analýsou prováděnou měřením optické čistoty ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu bylo

zjištěno, že ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát byl produkován stejným způsobem jako v příkladu 2.

(Příklad 7: Klonování genu pro CRD enzym)

(Vytvoření knihovny chromosomální DNA)

Chromosomální DNA byla extrahovaná z nakultivovaných buněk *Candida magnoliae* IFO 0705 podle metody popsané Herefordem (Cell, 18,1261 (1979)). Získaná chromosomální DNA byla částečně rozložena Sau3A1 a fragmenty DNA o velikosti 23 - 20 kb byly vloženy do místa BamH1 fágového vektoru EMBL3 (dodáno Strategene). Výsledný rekombinantní fágový vektor byl *in vitro* „zapakován“ s užitím Gigapack II Gold (dodáno Stratagene) a pak provedena infekce *E. coli* NM415 tímto vektorem, a tak vznikla knihovna chromosomální DNA složená z cca 20 000 úseků DNA.

(Příprava syntetické oligonukleotidové sondy)

Purifikovaný CRD enzym získaný podle postupu popsaném v příkladu 1 byl denaturován v přítomnosti 8 M močoviny a pak natráven lysylpeptidasou z *Achromobacter* (vyrobena Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Pořadí aminokyselin vzniklých peptidů bylo stanoveno Edmanovou metodou.

Na základě výsledného pořadí aminokyselin, byly syntetisovány DNA sondy o následujícím složení,

Sonda 1: 5'-GCNCAYACNAARAAYGA-3' (SEQ ID No:3)

Sonda 2: 5'-AAYGTNGARTAYCCNGC-3' (SEQ ID No:4)

Sonda 3: 5'-CTRGTYCTRCTRCTTT-3' (SEQ ID No:5)

Sondy 1, 2 a 3 byly označeny ^{32}P za užití Megalabelu (vyrobena Takara Shuzo Co.,Ltd.) a označené sondy byly použity v dalších experimentech.

(Klonování genu enzymu CRD z knihovny chromosomální DNA)

Knihovna chromosomální DNA vytvořená shora popsaným způsobem byla prohledávaná podle plaků fágů obsahujících gen pro CRD enzym plakovou hybridizační

metodou (Science, 196, 180 (1977)) za užití ^{32}P značených synthetických DNA sond. Jako výsledek byl získán jeden pozitivní plak. Poté byla rekombinantní fágová DNA získaná z pozitivního plaku natrávena dvěma enzymy: EcoR1 a HindIII, výsledná DNA pak byla analyzovaná pomocí metody Southern blotting (J. Mol. Biol., 98, 53 (1975)). Jako výsledek byl nalezen fragment DNA cca 1.3 kb vytvořený účinkem EcoR1 a HindIII, který byl hybridizován se shora uvedenými synthetickými DNA sondami. Fragment DNA o velikosti cca 1,3 kb byl insertován do místa EcoR1-HindIII plasmidu pUC19 (dodán Takara Shuzo Co.,Ltd.) a tak byl vytvořen rekombinantní plasmid pUC-HE a bylo určeno, že obsahuje část chromosomální DNA nesoucí gen pro CRD enzym. Tento plasmid byl pojmenován jako pUC-HE.

(Určení pořadí basí)

Celá řada rekombinantních enzymů, které působily na shora uvedený rekombinantní plasmid pUC-HE byla užita, a získané fragmenty byly analyzovány tak, aby vytvořili restriční mapu enzymu. Potom, různé fragmenty DNA získané během analýsy byly insertovány do multi-klonových míst plasmidu pUC19 s cílem získat rekombinantní plasmid. Za použití těchto rekombinantních plasmidů, pořadí basí daného vloženého fragmentu bylo analyzováno za použití systému ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (vyrobena Perkin Elmer) a ABI 373A DNA Sequencer (vyrobena Applied Biosystems). Jako výsledek těchto postupů byla získána celá sekvence basí fragmentu DNA o velikosti cca 1,3 kb, kde se očekávalo, že je přítomná gen pro CRD enzym. Obr. 1 ukazuje takto získané pořadí basí. Pořadí aminokyselin vypočtené z pořadí basí části strukturálního genu je rovněž zobrazeno pod odpovídajícími sekvencemi basí na obr.1. Pořadí aminokyselin bylo porovnáno s částečným pořadím získaným z fragmentů peptidů purifikovaného enzymu CRD po účinku lysylendopeptidasy. Jako výsledek bylo nalezeno, že částečné aminokyselinové sekvence z purifikovaného CRD enzymu byly rovněž nalezeny v pořadí aminokyselin vypočteném na základě sekvence basí (tyto části jsou podtržené úseky pořadí aminokyselin na obr. 1) s výjimkou nepřítomnosti methioninu na N konci. Předpokládá se, že methionin na N konci je odstraněn modifikacemi po skončení proteosynthesy.

(Příklad 8: Konstrukce rekombinantního plasmidu obsahujícího gen enzymu CRD)

Aby mohl být CRD enzym tvořen v *E. coli* byl připraven pomocí transformace rekombinantní plasmid. Nejprve byla přidána dvouřetězcová DNA nesoucí NdeI místo, do

iniciačního kodonu strukturálního genu pro CRD a rovněž EcoR1 místo bylo přidáno bezprostředně po terminaci téhož kodonu, následujícím způsobem. Jak N konec DNA primeru nesoucího místo Nde1 vnesený do části iniciačního kodonu strukturálního genu CRD enzymu tak, C konec DNA primeru nesoucí EcoR1 místo přidané bezprostředně po terminaci kodonu strukturálního genu, nebyly syntetisovány. Pořadí basí těchto dvou primerů je následující.

N-konec DNA primeru

5' - TAGTCGTTAACCATATGGCTAAGAAGAACTTCTCCAAC-3'

(SEQ ID No: 6)

C-konec DNA primeru

5' - TCTGAGTTAACGAATTCTTAGGGAAGCGTGTAGCCACCGT-3'

(SEQ ID No: 7)

Použitím těchto dvou shora uvedených synthetických DNA primerů, byla syntetisovaná dvouřetězcová DNA za použití plasmidu pUC-HE, vytvořeného jak uvedeno v příkladu 7, jako templátu. Výsledný fragment DNA byl natráven Nde1 a EcoR1 a vložen do Nde1 a EcoR1 míst vpravo (downstream) od lac promotoru plasmidu pUCNT (WO94/03613), a tak byl vytvořen rekombinantní plasmid pNTS1.

(Příklad 9: Příprava rekombinantního plasmidu obsahujícího jak gen CRD enzymu, tak gen pro GDH)

Plasmid pGDA2 (J. Biol.Chem.(1989),264,6381) byl podroben dvěma enzymům: EcoR1 a Pst1 s cílem získat fragment DNA cca 0,9 kb velký, nesoucí gen GDH, pocházející z *Bacillus megaterium*. Tento fragment DNA byl insertován do EcoR1-Pst1 místa plasmidu pSL301 (připraveno Invitrogen) s cílem konstrukce rekombinantního plasmidu pSLG. Rekombinantní plasmid pSLG byl pak podroben digesci dvěma enzymy: EcoR1 a Xho1 a fragment DNA cca 0,9 kb velký nesoucí gen GDH, pocházející z *Bacillus megaterium* byl pak izolován. Tento DNA fragment byl insertován do místa EcoR1-Sal1 (umístěného vpravo "downstream" od CRD genu) plasmidu pNTS1 konstruovaného v příkladu 8, a tak byl získán rekombinantní plasmid pNTS1G. Metoda konstrukce a struktura pNTS1G jsou ukázány na obr.2.

(Příklad 10: Konstrukce rekombinantního *E. coli*)

E. coli HB101 (dodané Takara Shuzo Co., Ltd.) byl transformován za použití rekombinantního plasmidu pNTS1, získaného podle příkladu 8 a dále za užití rekombinantního plasmidu pNTS1G, získaného podle příkladu 9, tak aby byl získán rekombinant *E. coli* HB 101(pNTS1) a HB101(pNTS1G). Takto získané rekombinantní kmeny *E. coli* HB 101(pNTS1) a HB101(pNTS1G) byly uloženy spolu s Ministerstvem zahraničního obchodu a průmyslu, Národním ústavem pro biovědy a humánní technologie pod sbírkovými čísly FERM BP-5834 a FERM BP-5835 dne 24. února 1997.

Dále, jak uvedeno v příkladu 9, byl plasmid pGDA2 (J. Biol. Chem.(1989), 264, 6381) podroben digesci dvou enzymů: EcoR1 a Pst1, aby bylo možné fragment DNA cca 0,9 kb velký, nesoucí gen pro GDH z *Bacillus megaterium*. Tento fragment DNA byl vpraven do EcoR1-Pst1 místa plasmidu pSTV28 (dodáno Takara Shuzo Co., Ltd.) a tak vytvořen rekombinantní plasmid pSTVG. Kmen *E. coli* HB 101(pNTSS1), u kterého byla navozena kompetence metodou s CaCl₂ byl transformován s pSTVG, a tak byl získán kmen *E. coli* HB101 (pNTS1, pSTVG).

(Příklad 11: Expresse enzymu CRD v rekombinantním *E. coli*)(Určení aktivity enzymu CRD v rekombinantním *E. coli*)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101(pNTS1) získaný podle příkladu 10 byl kultivován v 2 x ZT mediu obsahujícím 50 µg/ml ampicilinu, zahuštěn a resuspendován ve 100 mM fosfátovém pufru (pH 6,5), a rozrušen působením ultrazvuku tak, aby byl získán bezbuněčný lysát. Aktivita CRD enzymu v bezbuněčném lysátu byla měřena následujícím způsobem. Jako substrát byl užit 1 mM ethyl-4-chloracetoacetát, 0,1 mM NADPH jako koenzym a zkoumaný enzym byly přidány do 100 mM fosfátového pufru (pH 6,5), jako výsledek reakce bylo měřeno snížení absorpce při 340 nm při teplotě 30°C. Za těchto reakčních podmínek oxidace 1 µmol NADPH na NADP během 1 minuty byla definována jako jedna jednotka enzymové aktivity. Takto měřená aktivita CRD enzymu v bezbuněčném lysátu představovala specifickou aktivitu a v porovnání s aktivitou transformantů majících pouze vektorový plasmid. Také byla připravena bezbuněčná suspence *Candida magnoliae* IFO 0705, podle příkladu 1 a enzymová aktivita CRD enzymu byla porovnána. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3. Kmen *E. coli* HB101 (pNTS1) vykazoval zvýšenou aktivitu ve srovnání s kmenem *E. coli* HB101(pUCNT),

který byl transformován pouze vektorovým plasmidem, a dále vykazoval 8,5 x vyšší aktivitu ve srovnání s *Candida magnoliae* IFO 0705.

Tabulka 3

Označení kmene	Specifická aktivita CRD (U/mg)
HB101 (pUCNT)	< 0,01
HB101 (pNTS1)	16,0
<i>Candida magnoliae</i> IFO 0705	1,89

(Srovnání sekvencí na N-konci)

Pořadí aminokyselin na N-konci všech CRD enzymů purifikovaných z bezbuněčných extraktů získaných shora uvedenými postupy a z bezbuněčného lysátu *Candida magnoliae* IFO 0705, bylo určeno na 30 zbytků Edmanovou metodou. Výsledné pořadí aminokyselin na N-konci bylo porovnáno a bylo zjištěno, že je všech případech stejné.

(Příklad 12: Současná exprese Enzymu CRD a GDH v rekombinantním *E. coli*)

Aktivita GDH v bezbuněčném lysátu získaném z rekombinantního *E. coli* HB101 (pNTS1G) a *E. coli* HB101 (pNTS1, pSTVG) získaných jak uvedeno v příkladu 10, způsobem popsaným v příkladu 11 byla měřena následujícím způsobem. Jako substrát byla užita 0,1 M glukosa, 2 mM NADP jako koenzym, dále byl do reakce přidán enzym do 1 M Tris – Hcl pufru (pH 8,0), bylo měřeno zvýšení absorpce při 340 nm při 25°C. Za těchto reakčních podmínek, redukce 1 μ mol NADP na NADPH za 1 minutu bylo definováno jako jedna jednotka enzymové aktivity. Aktivita CRD enzymu byla také měřena, a to způsobem uvedeným v příkladu 10. Takto naměřená aktivita CRD enzymu a aktivita GDH enzymu v bezbuněčném lysátu byly vyjádřeny jako specifické aktivity a porovnány s aktivitami *E. coli* HB101 (pNTS1), HB101 (pNTS1, pSTVG) a transformantu HB101 (pUCNT), který obsahoval samotný vektor. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4. *E. coli* HB101 (pNTS1), HB101 (pNTS1, pSTVG) vykazovaly jasné zvýšení aktivity CRD enzymu a aktivity GDH v porovnání s *E. coli* HB101 (pUCNT), který byl transformován jen vektorem.

Tabulka 4

Jméno kmene	Specifická aktivita CRD (U/mg)	Specifická aktivita GDH (U/mg)
HB101 (pUCNT)	< 0,01	< 0,01
HB101 (pNTS1)	16,0	< 0,01
HB101 (pNTS1G)	8,03	62,6
HB101 (pNTS1, pSTVG)	13,5	1,6

(Příklad 13: Synthesa (S)-4halo-3-hydroxybutyrát esteru z 4-halo-acetoacetát esteru za použití rekombinantního *E. coli* s vloženým genem CRD enzymu)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1) získaný postupem uvedeným v příkladu 10, byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Enzym GDH (dodaný Amano Pharmaceutical Co., Ltd.) v množství 1 250 jednotek, dále 5,5 g glukosy a 1,6 mg NADP bylo přidáno do 50 ml narostlé kultury. Směs byla promíchávána při 30°C a pH upraveno na 6,5 roztokem NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-chloracetoacetát v 250 mg dávkách každých 15 minut. Tímto způsobem bylo celkem přidáno 5 g ethyl-4-chloracetoacetátu a reakce probíhala 5 hodin. Poté byla reakční tekutina podrobena extrakci ethylacetátem a extrakt byl po odstranění rozpouštědla analyzován. Bylo zjištěno, že vzniklý ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát má 100% optickou čistotu a byl získán s 90 % výtěžkem.

Bylo provedeno kvantitativní stanovení ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrátu plynovou chromatografií s použitím skleněné kolony (ID 3 mm x 1 m) plněné PEG-20M Chromosorbem WAW DMCS 10% 80/100 mesh (vyrobena GL Science Co., Ltd.) při 150°C a detekce použila FID.

Optická čistota ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu byla měřena pomocí HPLC s optickou isolační kolonou, CHIRACEL OB (vyrobena Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.). Při chromatografii byla užita směs hexan/isopropanol v poměru 9/1 jako mobilní fáze při průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Detekce byla prováděna měřením absorpce při 215 nm.

(Příklad 14: Synthesa (S)-4-halo-3-hydroxybutyrát esteru z 4-halo-acetoacetátu esteru pomocí rekombinantního kmene *E. coli* obsahujícího enzym CRD a GDH současně)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) získaný podle příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 5,5 g glukosy, 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-chloracetoacetát a reakce probíhala po 5 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt analyzován po odstranění rozpouštědla. Bylo zjištěno, že ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát s optickou čistotou 100 % byl produkován s výtěžkem 92 %.

Kvantitativní stanovení měření optické čistoty ethyl-4-chlor-3-hydroxybutyrátu bylo provedeno stejným způsobem, který je uveden v příkladu 13.

(Příklad 15: Synthesa ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu z ethyl-4-chloracetoacetát za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 40 ml výsledné kultury bylo přidáno 19,2 g glukosy, 2,5 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-chloracetoacetátu v celkovém množství 16,1 g kontinuálním způsobem, rychlostí 2g/hod. Reakce probíhala po 24 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven pod vakuem rozpouštědla a koncentrát byl purifikován chromatografií na koloně s křemičitanovým gelem s výtěžkem 15,6 g ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu. Optická čistota tohoto ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu byla analyzována pomocí HPLC a byla 100 %. ¹H-NMR(CDC13)δ(ppm): 1,33 (3H,t), 2,65 (2H,d), 3,31 (1H,d), 3,60 (2H,d), 4,2 (3H,m); kolona: Chiracel OB (0,46 x 25 cm) vyrobeno Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.; teplota kolony: 0°C, eluent: n-hexan/2-propanol v poměru 9/1; průtoková rychlost: 0,8 ml/min.; detekce: 215 nm; eluce: 19,2 min pro (S), 17,0 minut pro (R).

(Příklad 16: Synthesa ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu z ethyl-4-chloracetoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 40 ml výsledné kultury bylo přidáno 9,6 g glukosy. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-chloracetoacetátu v celkovém množství 8,1 g kontinuálním způsobem, rychlostí 2g/hod. Reakce probíhala po 24 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven rozpouštědla a koncentrát byl analyzován. Výsledkem byl ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát o optické čistotě 100 %, s výtěžkem 96 %.

(Příklad 17: Synthesa ethyl (S)-4-brom-3-hydroxybutyrátu z ethyl-4-bromacetoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 1,3 g glukosy, 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a OH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M Namoh. Během míchání byl přidáván ethyl-4-chloracetoacetátu v celkovém množství 1 g. Reakce probíhala po 18 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven pod vakuem rozpouštědla a koncentrát byl purifikován chromatografií na koloně s křemičitanovým gelem s výtěžkem 900 mg ethyl (S)-4-brom-3-hydroxybutyrátu. Optická čistota tohoto ethyl (S)-4-brom-3-hydroxybutyrátu byla analyzována dále popsáním způsobem a byla 100 %. Vzorek byl přeměněn na karbamát a ten měřen pomocí HPLC. ¹H-NMR(CDC13) δ(ppm): 1,38 (3H, t), 2,75 (2H, m), 3,28 (1H, br), 3,51 (2H, m), 4,18 (3H, q), 4,25 (1H, m); Kolona Chiracel OJ (0,46 x 25 cm) vyrobeno Daicel Chemical Industries Co., Ltd.; Teplota kolony: 25°C+ Eluent: n-hexan/2-propanol v poměru 9/1; průtoková rychlost 0,8 ml/min.; detekce: 254 nm; doba eluce 24,2 min pro (S), 27,8 min pro (R).

(Příklad 18: Synthesa ethyl (S)-4-jod-3-hydroxybutyrátu z ethyl-4-jodacetoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 0,5 g glukosy, 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávána při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-jodeacetoacetátu v celkovém množství 0,5 g. Reakce probíhala po 72 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven pod vakuem rozpouštědla a koncentrát byl purifikován chromatografií na koloně s křemičitanovým gelem s výtěžkem 900 mg ethyl (S)-4-jod-3-hydroxybutyrátu. Optická čistota tohoto ethyl (S)-4-jod-3-hydroxybutyrátu byla analyzována dále uvedeným způsobem, byla 91,6 %. Takže vzorek byl zahříván spolu N-kyanidem v dimethyl sulfoxidu aby se získal ethyl-4-kyano-3-hydroxybutyrát, který pak byl změněn na ester kyseliny benzoové použitím benzoyl chloridu v přítomnosti pyridinu. Optická čistota benzoyl esteru pak byla měřena pomocí HPLC. NMR(CDC13)δ(ppm): 1,28 (3H, t), 2,65 (2H, d), 3,31 (3H, m), 4,00 (1H, m), 4,20 (2H, q); Eluent: n-hexan/ethanol v poměru 95/5; průtoková rychlost: 19,6 minut pro (S), 21,3 minut pro (R).

(Příklad 19: Synthesa methyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu z methyl-4-chloracetoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 7,2 g glukosy, 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávána při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván methyl-4-chloracetoacetátu v celkovém množství 4 g. Reakce probíhal po 24 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven pod vakuem rozpouštědla a koncentrát byl purifikován chromatografií na koloně s křemičitanovým gelem s výtěžkem 3,85 g methyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu. Optická čistota tohoto methyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu byla analyzována jak popsáno dále a byla 100 %. Vzorek byl konvertován na karbamát pomocí fenyl isokyanátu v přítomnosti pyridinu a optická čistota produktu byla měřena na HPLC. ¹H-NMR (CDC13)δ(ppm): 2,65 (2H, m), 3,20 (1H, br), 3,63 (2H, m), 3,73 (3H, s), 4,28 (1H, m), Kolona: Chiralcel OJ (0,46 x 25 cm) vyrobená Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.; teplota

kolony: 25°C,; eluent: n-hexan/2-propanol v poměru 8/2; průtoková rychlost: 1ml/min.; detekce: 254 nm; Eluční čas: 19,2 minut pro (S), 22,6 minut pro (R).

(Příklad 20: Synthesa ethyl (S)-4-azid-3-hydroxybutyrátu z ethyl-4-azidacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 3,1 g glukosy a 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-azidacetoacetátu v celkovém množství 2 g kontinuálním způsobem, rychlostí 2g/hod. Reakce probíhala po 72 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven rozpouštědla a koncentrát byl analyzován HPLC metodou. Výsledkem byl ethyl (S)-4-azid -3-hydroxybutyrát o optické čistotě 90 %. ¹H-NMR (CDC13)δ(ppm): 1,25 (3H, t), 3,30-3,35 (3H, m), 4,20 (3H,m): kolona: Chiralcel OB (0,46 x 25 cm) vyrobeno Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.;teplota kolony: 25°C; eluent: n-hexan/2-propanol v poměru 9/1; průtoková rychlost: 1ml/min.; detekce: 254 nm; eluční čas: 16,2 minut pro (S), 19,6 minut pro (R).

(Příklad 21: Synthesa ethyl (S)-3,4-dihydroxybutyrátu z ethyl 4-hydroxyacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 7,4 g glukosy a 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl-4-hydroxyacetoacetátu v celkovém množství 4 g. Reakce probíhala po 18 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven rozpouštědla a koncentrát byl analyzován HPLC metodou. Výsledkem byl ethyl (S)-3,4-dihydroxybutyrát v množství 3,2g a optické čistotě 100 %. Analýza probíhala následujícím způsobem: vzniklý produkt reagoval s Na-kyanidem v prostředí ethanolu a pokojové teplotě za vzniku 4-kyano-3-hydroxyethylbutyrátu, který byl

dále převeden benzoyl chloridem v přítomnosti pyridinu na příslušný ester kys. benzoové. Optická čistota tohoto esteru byla měřena metodou HPLC. ¹NMR (CDC13)δ(ppm): 1,30 (3H, t), 2,55 (3H, m), 3,18 (1H, br), 3,55 (1H, d), 3,68 (1H, d), 4,15 (1H, s), 4,20 (2H, q); kolona: Chiralpak AS (0,46 x 25 cm) vyrobeno Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.; teplota kolony: 25°C; Eluent: n-hexan/ethanol v poměru 95/5; průtoková rychlost: 1ml/min.; detekce: 254 nm; eluční čas: 19,6 minut pro (S), 21,3 minut pro (R).

(Příklad 22: Synthesa ethyl -3-hydroxy-2-methylbutyrátu redukcí z ethyl 2-methyl-3-oxoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 7,5 g glukosy a 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl 2-methyl-3-oxoacetátu v celkovém množství 4 g, reakce probíhala po 18 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven rozpouštědla a koncentrát byl analyzován na křemičitanové koloně. Výsledkem byl ethyl-3-hydroxy-2-methylbutyrát v množství 3,5 g o optické čistotě 91,6 % e.e. Analýza probíhala následujícím způsobem: vzorek reagoval s Na-kyanidem v demethylsulfoxidu při pokojové teplotě a vzniklý ethyl 4-kyan-3-hydroxybutyrát byl dále podroben reakci s benzoyl chloridem, v přítomnosti pyridinu za vzniku patřičného benzoyl esteru. Optická čistota této látky měřena pomocí HPLC. ¹H-NMR (CDC13)δ(ppm): 1,17 (3H, t), 1,22-3,35 (2H, t), 1,28 (3H, t), 2,46 (1H, m), 2,82 (1H, br), 3,90 (1H, m), 4,18 (2H, q).

(Příklad 23: Synthesa ethyl-2-chlor-3-hydroxybutyrátu redukcí z ethyl 2-chlor-3-oxoacetátu za použití rekombinantního *E. coli* obsahujícího současně enzym CRD a GDH)

Rekombinantní kmen *E. coli* HB101 (pNTS1G) vytvořený jak uvedeno v příkladu 10 byl inokulován do 100 ml 2 x YT media sterilizovaného v Sakaguchiho baňkách obsahu 500 ml a kultivován na třepačce při 37°C po 13 hodin. Do 50 ml výsledné kultury bylo přidáno 6,5 g glukosy a 3,2 mg NADP. Kultura byla promíchávaná při 30°C a pH bylo upraveno na 6,5 pomocí 5 M NaOH. Během míchání byl přidáván ethyl 2-chlor-3-oxoacetátu v celkovém

množství 4 g , reakce probíhala po 18 hodin. Po skončení reakce, výsledná kapalina byla extrahovaná ethylacetátem a extrakt zbaven rozpouštědla a koncentrát byl analyzován na křemičitanové koloně. Výsledkem byl ethyl-2-chlor-3-hydroxybutyrát v množství 3,8 g. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1,35 (6H, m), 2,55 (1H, br), 4,15 (1H, d), 4,25 (1H, m), 4,30 (2H, q).

Průmyslová využitelnost

Použitím nového CRD enzymu je možno efektivně vytvářet opticky aktivní alkoholy jako například (S)-4-halo-3-hydroxy butyrát ester použitelný jako syntetický meziprodukt k výrobě léků.

Pomocí naklonování genu nesoucího gen pro CRD enzym a určením jeho pořadí basí, byl získán transformant s vysokou účinností produkce CRD enzymu. Také byl získán transformant s vysokou hladinou produkce CRD enzymu a zároveň GDH.

Použitím shora uvedených transformantů je možné provádět syntézu opticky aktivního alkoholu jako je například (S)-4-halo-3-hydroxybutyrát ester z karbonylových sloučenin jako je například 4-halo-acetoacetát s vysokou účinností.

SEZNAM SEKVENCÍ

Informace pro SEQ ID No: 1

Délka sekvence : 283

Typ sekvence. Aminokyseliny

Typ molekuly: peptid

Topologie: lineární

Popis sekvence

```

Met Ala Lys Asn Phe Ser Asn Val Glu Tyr Pro Ala Pro Pro Pro Ala
  1           5           10           15
His Thr Lys Asn Glu Ser Leu Gln Val Leu Asp Leu Phe Lys Leu Asn
      20           25           30
Gly Lys Val Ala Ser Ile Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ile Gly Tyr Ala
      35           40           45
Leu Ala Glu Ala Phe Ala Gln Val Gly Ala Asp Val Ala Ile Trp Tyr
      50           55           60
Asn Ser His Asp Ala Thr Gly Lys Ala Glu Ala Leu Ala Lys Lys Tyr
      65           70           75           80
Gly Val Lys Val Lys Ala Tyr Lys Ala Asn Val Ser Ser Ser Asp Ala
      85           90           95
Val Lys Gln Thr Ile Glu Gln Gln Ile Lys Asp Phe Gly His Leu Asp
      100          105          110
Ile Val Val Ala Asn Ala Gly Ile Pro Trp Thr Lys Gly Ala Tyr Ile
      115          120          125
Asp Gln Asp Asp Asp Lys His Phe Asp Gln Val Val Asp Val Asp Leu
      130          135          140
Lys Gly Val Gly Tyr Val Ala Lys His Ala Gly Arg His Phe Arg Glu
      145          150          155          160
Arg Phe Glu Lys Glu Gly Lys Lys Gly Ala Leu Val Phe Thr Ala Ser
      165          170          175
Met Ser Gly His Ile Val Asn Val Pro Gln Phe Gln Ala Thr Tyr Asn
      180          185          190
Ala Ala Lys Ala Gly Val Arg His Phe Ala Lys Ser Leu Ala Val Glu

```

195	200	205
Phe Ala Pro Phe Ala Arg Val Asn Ser Val Ser Pro Gly Tyr Ile Asn		
210	215	220
Thr Glu Ile Ser Asp Phe Val Pro Gln Glu Thr Gln Asn Lys Trp Trp		
225	230	235
Ser Leu Val Pro Leu Gly Arg Gly Gly Glu Thr Ala Glu Leu Val Gly		240
	245	250
Ala Tyr Leu Phe Leu Ala Ser Asp Ala Gly Ser Tyr Ala Thr Gly Thr		255
	260	265
Asp Ile Ile Val Asp Gly Gly Tyr Thr Leu Pro		270
275	280	

Informace pro SEQ ID No: 2

Délka sekvence : 852

Typ sekvence. Nukleové kyseliny

Počet řetězců: dvojitý

Topologie: lineární

Typ sekvence: genomová DNA

Popis sekvence:

```

ATGGCTAAGA ACTTCTCCAA CGTCGAGTAC CCCGCCCCGC CTCCGGCCCCA CACCAAGAAC 60
GAGTCGCTGC AGGTCCTTGA CCTGTTCAAG CTGAATGGCA AGGTTGCCAG CATCACTGGC 120
TCGTCCAGCG GTATTGGCTA CGCTCTGGCT GAGGCCTTCG CGCAGGTCGG CGCTGACGTC 180
GCCATCTGGT ACAACAGCCA CGACGCTACT GGCAAGGCTG AGGCCCTCGC CAAGAAGTAC 240
GGCGTCAAGG TCAAGGCCA CAAGGCCAAC GTGAGCAGCT CTGACGCCGT GAAGCAGACG 300
ATCGAGCAGC AGATCAAGGA CTTCGGCCAC CTCGACATTG TCGTGGCGAA CGCCGGCATT 360
CCCTGGACGA AGGGTGCCTA CATCGACCAG GACGACGACA AGCACTTCGA CCAGGTCGTT 420
GACGTCGATC TGAAGGGTGT TGGATACGTC GCGAAGCACG CTGGCCGTCA CTTCCGCGAG 480
CGCTTCGAGA AGGAGGGCAA GAAGGGCGCC CTTGTGTTCA CGGCCTCCAT GTCTGGCCAC 540
ATTGTGAACG TGCCCCAGTT CCAGGCCACG TACAACGCGG CCAAGGCTGG CGTGCGCCAC 600
TTCGCGAAGT CGCTGGCCGT CGAGTTCGCG CCGTTCGCGC GCGTGAAC TC GTGTCGCCG 660
GGCTACATCA ACACGGAGAT CTCGGACTTC GTGCCCCAGG AGACGCAGAA CAAGTGGTGG 720
TCGCTCGTGC CCCTTGGCCG CGGCGGAGAG ACGGCCGAGC TCGTTGGCGC CTACCTGTTC 780
CTTGCATCTG ACGCCGGCTC GTACGCCACT GGTACGGACA TCATTGTTGA CCGTGGCTAC 840
ACGCTTCCTT AA

```

852

Informace pro SEQ ID No: 3
Délka sekvence : 17
Typ sekvence. nukleotidy
Počet řetězců: jeden
Topologie: lineární
Typ sekvence: synthetická DNA
Popis sekvence:
GCNCAACNA ARAAYGA

Informace pro SEQ ID No: 4
Délka sekvence : 17
Typ sekvence. nukleotidy
Počet řetězců: jeden
Topologie: lineární
Typ sekvence: synthetická DNA
Popis sekvence:
AAYGTNGART AYCCNGC

Informace pro SEQ ID No: 5
Délka sekvence : 17
Typ sekvence. nukleotidy
Počet řetězců: jeden
Topologie: lineární
Typ sekvence: synthetická DNA
Popis sekvence:
CTRGTYCTRC TRCTR TT

Informace pro SEQ ID No: 6
Délka sekvence : 35
Typ sekvence. nukleotidy
Počet řetězců: jeden
Topologie: lineární
Typ sekvence: synthetická DNA
Popis sekvence:
TAGTCGTTAA CCATATGGCT AAGAACTTCT CCAAC

Informace pro SEQ ID No: 7
Délka sekvence : 40
Typ sekvence. nukleotidy
Počet řetězců: jeden
Topologie: lineární
Typ sekvence: synthetická DNA
Popis sekvence:
TCTGAATTAA CGAATTCTTA GGGAAGCGTG TAGCCACCGT

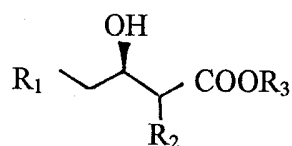
P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Karbonylová reduktasa, **vyznačující se tím, že** má následující fyzikální a chemické vlastnosti od (1) do (4) :
 - (1) aktivita:

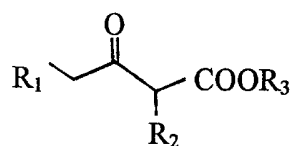
působí na ethyl-4-chloracetoacetát s NADPH jako koenzymem za vzniku ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrátu;
 - (2) substrátová specifita:

vykazuje silnou aktivitu k ethyl 4-chloracetoacetátu, zatímco prakticky vůbec nereaguje s ethyl acetoacetátem;
 - (3) optimální pH: 5,5 až 6,5;
 - (4) optimální teplota reakce: 50° až 55°C.
2. Karbonylová reduktasa podle nároku 1, **vyznačující se tím, že** má další fyzikální a chemické vlastnosti (5) až (7) :
 - (5) teplotní stabilita: je stabilní při 40°C po dobu 30 minut, je-li pH 7,0;
 - (6) inhibitor: je inhibován ionty rtuti a kvercetinem;
 - (7) molekulová hmotnost: cca 76 000 určeno gelovou filtrací a cca 32 000 SDS polyakrylamidovou elektroforesou.
3. Karbonylová reduktasa, **vyznačující se tím, že** má sekvenci aminokyselin odpovídající pořadí SEQ ID No:1 v seznamu sekvencí, nebo aminokyselinové pořadí s jednou nebo více vynechanými, substituovanými, nebo přidanými aminokyselinami ve srovnání s SEQ OD No:1, seznamu sekvencí, nebo částečnou aminokyselinovou sekvencí a mající aktivitu redukovat ethyl-4-chloracetoacetát asymetricky za vzniku ethyl (S)-4-chlor-3-hydroxybutyrát.
4. Karbonylová reduktasa podle kteréhokoli nároku 1 až 3, **vyznačující se tím, že** enzym byl získán z mikroba náležejícího do rodu *Candida*.
5. Karbonylová reduktasa podle kteréhokoli nároku 1 až 3, **vyznačující se tím, že** enzym byl získán z *Candida magnoliae*

6. Karbonylová reduktasa podle kteréhokoli nároku 1 až 3, **vyznačující se tím, že enzym** byl získán z *Candida magnoliae* IFO 0705.
7. DNA kódující enzym podle kteréhokoli nároku 1 až 6.
8. DNA podle nároku 7, **vyznačující se tím, že DNA má sekvenci uvedenou jako SEQ ID No:2 v seznamu sekvencí.**
9. Plasmid nesoucí DNA podle nároku 7 nebo 8.
10. Plasmid podle nároku 9, **vyznačující se tím, že plasmid je pNTS1.**
11. Transformanti, jejichž buňky jsou transformovány plasmidem podle nároku 9 nebo 10.
12. Transformovaná buňka podle nároku 11, **vyznačující se tím, že transformovaná buňka je *E. coli*.**
13. Transformovaná buňka podle nároku 11, **vyznačující se tím, že transformovaná buňka je *E. coli* HB101 (pNTS1)**
14. Způsob přípravy (S)-4-halo-3-hydroxybutyrát esteru majícího obecný vzorec:

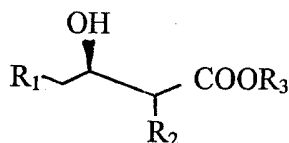


kde R_1 označuje atom halogenu, R_2 označuje vodík a R_3 označuje substituovaný nebo nesubstituovaný alkyl nebo aryl), způsob sestává z kroků: vytvoření 4-haloacetátu představeného obecným vzorcem:

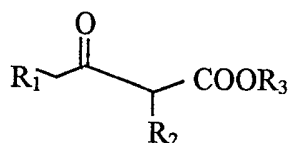


pomocí enzymu podle kteréhokoli nároku 1 až 3 nebo kulturou mikroorganismu mající schopnost produkce tohoto enzymu nebo vytvářet reakční produkt.

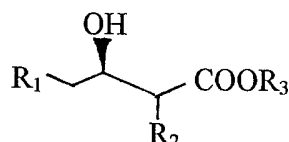
15. Způsob podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že atom halogenu je chlor nebo brom a R_3 je alkylová skupina s 1 až 4 atomy uhlíku.
16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že substrátem je methyl-4-chloracetoacetát, ethyl-4-chloracetoacetát, methyl-4-bromacetoacetát nebo ethyl-4-bromacetoacetát.
17. Způsob podle kteréhokoli nároku 14 až 16, **vyznačující se tím**, že mikrobem je mikroorganismus náležející do rodu *Candida*.
18. Způsob podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že mikrobem je mikroorganismus náležející do rodu *Candida magnoliae*.
19. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že mikrobem je mikroorganismus náležející do rodu *Candida magnoliae* IFO 0705.
20. Způsob podle kteréhokoli nároku 14 až 16, **vyznačující se tím**, že mikroorganismus je transformovanou buňkou podle kteréhokoli nároku 11 až 13.
21. Způsob přípravy opticky aktivního 3-hydroxybutyrát esteru představeného obecným vzorcem:



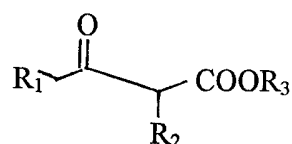
způsob sestává z kroků: reakce transformantu, kterým je buňka transformovaná plasmidem nesoucím DNA kódující enzym, který má schopnost asymetricky redukovat 3-oxo-butyřát ester, mající obecný vzorec:



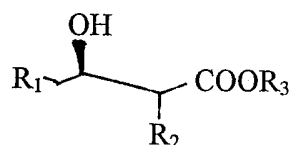
za vzniku opticky aktivního 3-hydroxybutyrát esteru, majícího obecný vzorec:



s 3-oxo-butyrát esterem, podle obecného vzorce:



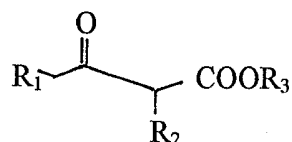
a produkovat opticky aktivní 3-hydroxybutyrát ester o obecném vzorci:



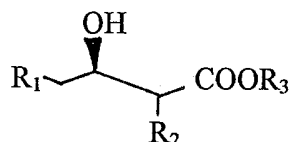
22. Způsob podle nároku 21, **vyznačující se tím**, že v obecných vzorcích jsou R_1 a R_2 na sobě nezávislé halogeny, azidy, benzylaminy, nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík, R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl nebo aryl skupina, nebo v obecných vzorcích R_1 a R_2 jsou nezávislé alkylové skupiny, hydroxidové skupiny nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík a R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl, nebo aryl skupina.
23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že v obecném vzorci R_1 je hydroxylová skupina, R_2 je vodík a R_3 je ethyl.

24. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím, že** v obecném vzorci R_1 je chlor, R_2 je vodík a R_3 je ethyl..
25. Způsob podle kteréhokoli nároku 21 až 24, **vyznačující se tím, že** transformované buňky jsou transformovanými buňkami podle kteréhokoli nároku 11 až 13.
26. Plasmid nesoucí DNA podle nároku 7 nebo 8 a DNA kódující glukosodehydrogenasu.
27. Plasmid podle nároku 26, **vyznačující se tím, že** glukosodehydrogenasa byla odvozena z *Bacillus megateri* um.
28. Plasmid podle nároku 27, **vyznačující se tím, že** plasmid je pNTS1G.
29. Transformant je buňka transformovaná plasmidem podle kteréhokoli nároku 26 až 28.
30. Transformovaná buňka podle nároku 29, **vyznačující se tím, že** transformovanou buňkou je *E. coli*.
31. Transformovaná buňka podle nároku 30, **vyznačující se tím, že** transformovanou buňkou je *E. coli* HB101 (pNTS1G).
32. Způsob přípravy opticky aktivního alkoholu, sestávající z kroků: reakce transformantu, kterým je buňka transformovaná plasmidem majícím DNA kódující enzym s aktivitou asymetricky redukovat sloučeniny s karbonylem za vzniku opticky aktivního alkoholu a dále DNA kódující enzym se schopností regenerovat koenzym na kterém je aktivita prvního enzymu závislá, s karbonylovými sloučeninami; vytvoření a získání opticky aktivního alkoholu.
33. Způsob podle nároku 32, **vyznačující se tím, že** enzymem, který má schopnost regenerace koenzymu je glukosodehydrogenasa.

34. Způsob podle nároku 32, **vyznačující se tím, že** transformované buňky jsou transformované buňky podle kteréhokoli nároku 29 až 31.
35. Způsob podle kteréhokoli nároku 32 až 34, **vyznačující se tím, že** karbonylovou sloučeninou je 3-oxo-butyrát ester podle obecného vzorce:

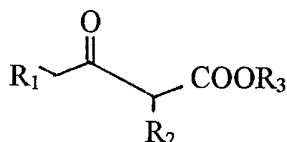


a výsledný opticky aktivní alkohol je opticky aktivní 3-hydroxybutyrát ester mající obecný vzorec:

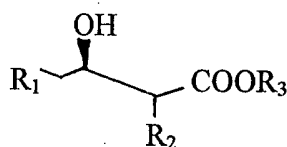


36. Způsob podle nároku 35, **vyznačující se tím, že** podle obecného vzorce jsou R_1 a R_2 na sobě nezávislé halogeny, azidy, benzylaminy, nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík, R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl nebo aryl skupina, nebo v obecných vzorcích R_1 a R_2 jsou nezávislé alkylové skupiny, hydroxidové skupiny nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík a R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl, nebo aryl skupina.
37. Způsob podle nároku 36, **vyznačující se tím, že** R_1 je chlor, R_2 je vodík a R_3 je ethyl.
38. Transformant, kterým je buňka transformovaná jako první plasmid, který má sekvenci DNA podle nároku 7 nebo 8 a jako druhý plasmid, který má DNA kódující glukosodehydrogenasu.
39. Transformovaná buňka podle nároku 38, **vyznačující se tím, že** jako první plasmid je pNTS1 a glukosodehydrogenasa je odvozena z *Bacillus megaterium*.

40. Transformovaná buňka podle nároku 38 nebo 39, **vyznačující se tím, že** transformovanou buňkou je *E. coli*.
41. Způsob přípravy opticky aktivního alkoholu sestávající z kroků, reakce transformantu, kterým je buňka transformovaná jako první plasmid, který má sekvenci DNA kódující enzym s aktivitou asymetricky redukovat karbonylové sloučeniny za vzniku opticky aktivního alkoholu a jako druhý plasmid, který má DNA kódující enzym se schopností regenerovat koenzym na kterém je první enzym závislý, působení na karbonylovou sloučeninu; vytváření a získávání opticky aktivního alkoholu.
42. Způsob podle nároku 41, **vyznačující se tím, že** enzym se schopností regenerace koenzymu je glukosodehydrogenasa.
43. Způsob podle nároku 41, **vyznačující se tím, že** kde transformované buňky jsou buňky transformované podle kteréhokoli nároku 38 až 40.
44. Způsob podle kteréhokoli nároku 41 až 43, **vyznačující se tím, že** karbonylovou sloučeninou je 3-oxo-butyát ester představený obecným vzorcem:



a výsledný opticky aktivní alkohol je opticky aktivní 3-hydroxy-butyát ester podle obecného vzorce:



45. Způsob podle nároku 44, **vyznačující se tím, že** v obecném vzorci jsou R_1 a R_2 na sobě nezávislé halogeny, azidy, benzylaminy, nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík, R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl nebo aryl skupina, nebo v obecných vzorcích R_1 a R_2 jsou nezávislé alkylové skupiny, hydroxidové skupiny nebo vodík, jeden z R_1 a R_2 by měl být vodík a R_3 je substituovaná nebo nesubstituovaná alkyl, nebo aryl skupina.
46. Způsob podle nároku 45, **vyznačující se tím, že** v obecném vzorci R_1 je chlor, R_2 je vodík a R_3 je ethyl.

15.12.99

PU1999-1761

~~86186~~

Obr. 1

59
AAGCTTGGGGAACCGACGTCCCCGCCCTCGTACATGCAGTGCATACAGCATTGCCCAAA

119
CCCCACATTGTGCCCCCACCCTCCGCGGATTCCGTAACATATAAAGGCCGCCAGTGCC

179
GACTATGGACCATCATCCCGAAATCACCAAGAATAACAATGGCTAAGAACTTCTCCAAC
MetAlaLysAsnPheSerAsn

239
GTCGAGTACCCCGCCCGCCTCCGGCCCCACACCAAGAACGAGTCGCTGCAGGTCCTTGAC
ValGluTyrProAlaProProProAlaHisThrLysAsnGluSerLeuGlnValLeuAsp

299
CTGTTCAAGCTGAATGGCAAGGTTGCCAGCATCACTGGCTCGTCCAGCGGTATTGGCTAC
LeuPheLysLeuAsnGlyLysValAlaSerIleThrGlySerSerSerGlyIleGlyTyr

359
GCTCTGGCTGAGGCCTTCGCGCAGGTCGGCGCTGACGTCGCCATCTGGTACAACAGCCAC
AlaLeuAlaGluAlaPheAlaGlnValGlyAlaAspValAlaIleTrpTyrAsnSerHis

419
GACGCTACTGGCAAGGCTGAGGCCCTCGCCAAGAAGTACGGCGTCAAGGTCAAGGCCTAC
AspAlaThrGlyLysAlaGluAlaLeuAlaLysLysTyrGlyValLysValLysAlaTyr

479
AAGGCGAACGTGAGCAGCTCTGACGCCGTGAAGCAGACGATCGAGCAGCAGATCAAGGAC
LysAlaAsnValSerSerSerAspAlaValLysGlnThrIleGluGlnGlnIleLysAsp

539
TTCGGCCACCTCGACATTGTCGTGGCGAACGCCGGCATTCCCTGGACGAAGGGTGCCTAC
PheGlyHisLeuAspIleValValAlaAsnAlaGlyIleProTrpThrLysGlyAlaTyr

599
ATCGACCAGGACGACGACAAGCACTTCGACCAGGTCGTTGACGTCGATCTGAAGGGTGTT
IleAspGlnAspAspAspLysHisPheAspGlnValValAspValAspLeuLysGlyVal

659
GGATACGTCGCGAAGCACGCTGGCCGTCCTCCGCGAGCGCTTCGAGAAGGAGGGCAAG
GlyTyrValAlaLysHisAlaGlyArgHisPheArgGluArgPheGluLysGluGlyLys

Obr. 1 - pokrač.

719
AAGGGCGCCCTTGTGTTACGGCCTCCATGTCTGGCCACATTGTGAACGTGCCCCAGTTC
LysGlyAlaLeuValPheThrAlaSerMetSerGlyHisIleValAsnValProGlnPhe
779
CAGGCCACGTACAACGCGGCCAAGGCTGGCGTGCGCCACTTCGCGAAGTCGCTGGCCGTC
GlnAlaThrTyrAsnAlaAlaLysAlaGlyValArgHisPheAlaLysSerLeuAlaVal
839
GAGTTCGCGCCGTTTCGCGCGCGTGAACCTCTGTGTCGCCGGGCTACATCAACACGGAGATC
GluPheAlaProPheAlaArgValAsnSerValSerProGlyTyrIleAsnThrGluIle
899
TCGGACTTCGTGCCCCAGGAGACGCAGAACAAGTGGTGGTCGCTCGTGCCCCCTGGCCGC
SerAspPheValProGlnGluThrGlnAsnLysTrpTrpSerLeuValProLeuGlyArg
959
GGCGGAGAGACGGCCGAGCTCGTTGGCGCCTACCTGTTCTTGCATCTGACGCCGGCTCG
GlyGlyGluThrAlaGluLeuValGlyAlaTyrLeuPheLeuAlaSerAspAlaGlySer
1019
TACGCCACTGGTACGGACATCATTGTTGACGGTGGCTACACGCTTCCCTAAGCGGCGTGC
TyrAlaThrGlyThrAspIleIleValAspGlyGlyTyrThrLeuPro***
1079
CGAAAACATAGAGCTATCTATATAACCATAATGATGCGCATATTATGATCTACTACTTTG
1139
ACTTCGATCGGAACTTAGGAACGATAAGGGTGGAAATGCGTGAAAGCGTG CATGCTGCAGA
1199
GCGGTGTAATCGGCAGGGCTGTAGGGTGCC TGAGGCGGCGGGCCAGCAGTG CATGTAACC
1259
GGAGCTGAAGCGGAGGCACACATTGCGATGCAGCGAAGCACGGCCGCCAGAACTCTTTGA
1310
GAACAAGCGCGGCCCTCGACTATGCAGCGGCAACAAGCGAATTC

00 01 51

Obr. 2

