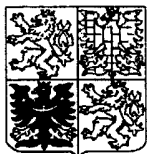


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

288 979

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000 - 3560**

(22) Přihlášeno: **08.10.1992**

(30) Právo přednosti:
06.10.1992 US 1992/953492

(40) Zveřejněno: **15.03.1995**
(Věstník č. 3/1995)

(47) Uděleno: **14.08.2001**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US92/08585**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 93/08287**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:

C 12 P 35/02

C 12 N 15/52

C 12 N 1/15

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

(73) Majitel patentu:

DSM GIST B. V., Delft, NL;

(72) Původce vynálezu:

Conder Michael J., Harrisonburg, VA, US;
Stephan Anthony Michael, Seattle, WA, US;
Crawford Lorilee, Bothell, WA, US;
Rambosek John A., Seattle, WA, US;
McAda Phyllis C., Woodinville, WA, US;
Reeves Christopher D., Woodinville, WA, US;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

**Biologický způsob výroby kyseliny 7-
aminocefalosporanové**

(57) Anotace:

Biologický způsob výroby kyseliny 7-aminocefalosporanové, 7-ACA, při němž se 1) v příslušném živném prostředí pěstuje kmen *Penicillium chrysogenum*, produkující isopenicillin N a do živného prostředí se přidává jako substrát adipát, a to kyselina adipová, její soli nebo její estery, asimilovatelné a využitelné použitým kmenem *Penicillium chrysogenum* za vzniku kyseliny adipoyl-6-aminopenicilanové, adipoyl-6-APA, 2) expresí odpovídajícího genu in situ se uskuteční následující přeměny: a) expanze kruhu adipoyl-6-APA in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodesacetoxycefalosporanové, adipoyl-7-ADCA působením enzymu expandázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum* transformuje kódovou DNA pro enzym expandázu, pro niž je substrátem adipoyl-6-APA, přičemž u adipoyl-6-APA, produkované uvedeným kmenem dojde in situ k expanzi kruhu a ke vzniku adipoyl-7-ADCA, b) 3-methylový postranní řetězec adipoyl-7-ADCA se hydroxyluje in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodeacetylcefalosporanové, adipoyl-7-ADAC, působením hydroxylázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum* transformuje kódovou DNA pro enzym

hydroxylázu, pro niž je substrátem adipoyl-7-ADCA, přičemž u adipoyl-7-ADCA, produkované tímto kmenem, dojde k hydroxylaci in situ a ke vzniku adipoyl-7-ADAC a c) adipoyl-7-ADAC se in situ acetyluje za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminocetoxycetofalosporanové, adipoyl-7-ACA působením enzymu acetyltransferázy, přičemž uvedený kmen *P. chrysogenum* byl předběžně transformován kódovou DNA pro enzym acetyltransferázu, schopný působit na adipoyl-7-ADAC jako na substrát, v důsledku této exprese dochází k acetylaci adipoyl-7-ADAC, produkované tímto kmenem, in situ za vzniku adipoyl-7-ACA a 3) takto získaná adipoyl-7-ACA se uvede do styku s adipoylamidázou k odstranění adipoylového postranního řetězce a vytvoření 7-ACA, která se izoluje.

CZ 288979 B6

Biologický způsob výroby kyseliny 7-aminocefalosporanovéOblast techniky

5

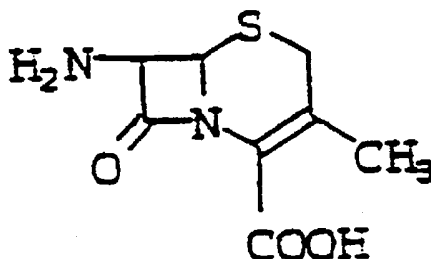
Vynález se týká biologické způsobu výroby kyseliny 7-aminocefalosporanové pěstováním transformovaného kmene *Penicillium chrysogenum* a vektoru pro expresi příslušné rekombinantní DNA.

10

Dosavadní stav techniky

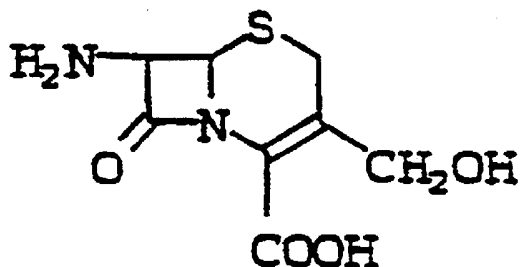
V současné době je známa již čtvrtá generace cefalosporinových antibiotik, která mají nesmírný léčebný význam. Velké množství různých postranních řetězců v běžně používaných a dodávaných cefalosporinech a velká hospodářská důležitost těchto antibiotik podněcuje snahy dosáhnout hospodárnějších a účinnějších postupů pro výrobu klíčových meziproduktů, z nichž je potom možno snadno vyrobit různé druhy cefalosporinů.

Jedním z těchto klíčových meziproduktů je kyselina 7-aminocefalosporinová, 7-ACA, kterou je možno vyjádřit následujícím vzorcem



V současné době se 7-ACA vyrábí z cefalosporinu C. Cefalosporin C je fermentační produkt, který je výchozí látkou pro téměř všechny běžně dodávané cefalosporiny. Avšak syntetické postupy pro výrobu těchto různých dodávaných cefalosporinů ve většině případů vycházejí z kyseliny 7-aminocefalosporanové, kterou je nejprve nutno z cefalosporinu C připravit odštěpením 7-aminoadipoylového postranního řetězce. Typické běžně dodávané cefalosporiny, které jsou takto synteticky odvozeny od 7-ACA a které tedy mají 3-acetyloxymethylenový postranní řetězec, jsou například cefotaxim, cefaloglycin, cefalotin a cefapirin.

Dalším z klíčových meziproduktů je kyselina 7-aminodeacetylcefalosporanová, 7-ADAC, kterou je možno vyjádřit následujícím vzorcem



V současné době je tato látka rovněž vyráběna z cefalosporinu C odstraněním 7-D-alfa-amino-adipoylového postranního řetězce se současnou přeměnou 3-acetyloxymethylenového postranního řetězce na 3-hydroxymethyl. 7-ADAC je užitečným meziproduktem pro výrobu

těch cefalosporinových derivátů, které obsahují modifikované substituenty na uhlíkovém atomu v poloze 3.

V současné době je při odštěpení 7-aminoadipoylového postranního řetězce metodou volby chemický postup. Při základním iminohalogenidovém postupu je nutno chránit aminoskupinu a karboxylovou skupinu na 7-aminoadipoylovém postranním řetězci, běžně se k tomuto účelu používá několik postupů. Chemické štěpení, v současné době užívané, však má několik vážných nevýhod. Jde o mnohastupňový a složitý postup, při němž je nutno používat velmi nízké teploty, nákladná reakční činidla, přičemž vzniká podstatné množství vedlejších produktů, které je nutno dále zpracovat a mimoto je nutno nečistý výchozí materiál před chemickým zpracováním čistit. V důsledku těchto nevýhod jsou stále vyvíjeny snahy navrhnout mikrobiologický nebo fermentační postup, jímž by bylo možno dosáhnout enzymatické deacylace cefalosporinu C tak, aby bylo možno získat kyselinu 7-aminocefalosporanovou hospodárnějším způsobem než současnými chemickými postupy.

Uvedené snahy nalézt úspěšný mikrobiologický postup byly však dosud do značné míry vynakládány marně. Předpokládalo se, že bude možno takový postup uskutečnit vzhledem ke stereochemii aminoadipoylového postranního řetězce v molekule cefalosporinu C a také vzhledem k tomu, že penicillin byl úspěšně deacylován enzymatickým štěpením při použití enzymu penicillin acylázy, která je produkována celou řadou mikroorganismů. Zprávy o úspěšnosti enzymatické deacylace cefalosporinu C v jednom stupni jsou na druhé straně v literatuře často nereprodukovatelné nebo poskytují jen malé výtěžky.

Vynález se tedy zvláště týká vyřešení úkolu, jak připravit klíčový meziprodukt 7-ACA a zvláště, jak je připravit biologickým postupem, tak, aby bylo možno hospodárněji vyrobit běžné cefalosporiny.

Jak již bylo uvedeno, byly až dosud snahy navrhnout biologický postup pro výrobu 7-ACA z větší části bezvýsledné, zvláště pokud jde o výrobu této látky ve velkém měřítku. Přestože například je možné připravit kyselinu 6-aminopenicillanovou, 6-APA, přímou fermentací a/nebo enzymatickým zpracováním penicillinu G, takže zbývá pouze expandovat kruh, aby bylo možno připravit 7-ADCA, bylo prokázáno, že naneštěstí enzymy *Cephalosporium* nebo *Streptomyces*, jimiž se provádí za obvyklých metabolických podmínek v těchto mikroorganismech expanze kruhu, nezpracovávají 6-APA jako substrát. Tyto enzymy, které se v oboru označují jako DAOCS nebo také jako expandázy, jsou definovány jako enzymy, které katalyzují expanzi penamového kruhu, to znamená, struktury, která se nachází v molekulách penicillinového typu až k cef-3-émovým kruhům, které se vyskytují v cefalosporinu. V průběhu přihlášky budou uvedené enzymy souhrnně označovány jako expandázy.

Substrát, který je expandázami zpracováván, je penicillin N, z něž po expanzi kruhu a po hydroxylaci vzniká kyselina deacetylcefalosporanová, DAC. Je pouze zapotřebí odštěpit (D)-alfa-aminoadipoylový postranní řetězec, aby bylo možno získat 7-ADAC, avšak právě tento postranní řetězec je nesmírně odolný k enzymatickému štěpení, takže je možno dosáhnout pouze nepříjemně nízkých výtěžků.

Při postupu, který je podle vynálezu navrhován, je možno dosáhnout účinného biologického postupu, při němž je produkována penicillinová sloučenina s adipoylovým postranním řetězcem ve vysokém množství pomocí nového fermentačního postupu, přičemž tato penicillinová sloučenina je současně přijatelným substrátem pro enzym expandázu, který je in situ produkován tímto mikroorganismem, který produkuje penicillinovou sloučeninu vzhledem k tomu, že byl transformován tak, aby u něj docházelo k expresi této expandázy. Produkovaná expandáza pak expanduje kruh penicillinové sloučeniny za vzniku cefalosporinové sloučeniny ve vysokých výtěžcích.

Adipoyl-7-ADCA, produkované působením enzymu expandázy in situ má 3-methylový postranní řetězec, zatímco 7-ACA, která je výsledným produktem, má 3-acetyloxymethylový ($-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$) postranní řetězec. Aby bylo možno převést 3-methylový postranní řetězec na 3-acetyloxymethylový postranní řetězec, dochází podle vynálezu také in situ k expresi dvou dalších enzymů mimo expandázu. Jde o hydroxylázu a o acetyltransferázu, oba tyto enzymy jsou vytvářeny na základě exprese genů, jimiž byl mikroorganismus, produkující penicillinovou sloučeninu také transformován. Enzym hydroxyláza převádí 3-ethylový postranní řetězec v adipoyl-7-ADCA na 3-hydroxymethylový řetězec a enzym acetyltransferáza převádí 3-hydroxymethylový postranní řetězec na 3-acetyloxymethylový postranní řetězec 7-ACA.

Je velmi důležité, že v posledním kritickém stupni způsobu podle vynálezu je postranní řetězec původní penicillinové sloučeniny, nyní cefalosporinové sloučeniny odstranitelný dalším enzymatickým systémem v neočekávaně vysokém výtěžku. Překvapujícím výsledkem tohoto biologického postupu je tedy příprava 7-ACA v neočekávaně vysokém výtěžku a s dostatečnou hospodárností tak, aby tento postup mohl být použit jako alternativní postup k současně používanému chemickému a biochemickému zpracování.

Nový biologický postup podle vynálezu je tedy jedinečným a překvapivě účinným postupem pro výrobu 7-ACA a je velmi hospodárnou alternativou současných chemických postupů. Úspěšnost tohoto postupu je velmi překvapující vzhledem k tomu, že až dosud byly všechny snahy navrhnout takový biologický postup opakovaně neúspěšné. Například v evropském patentovém spisu EP-A-0 422 790 se popisuje DNA, která je kódem pro izopenicillin N:acyl-CoA-acyltransferázu z *Aspergillus nidulans*, popisuje se rovněž použití tohoto enzymu pro přípravu cefalosporinu z plísní, produkujících penicillin, tento postup až dosud nebyl popsán. Tento postup je však popisován jako porušení nebo přesun genu pro acyltransferázu spolu s přidáním genů, které jsou kódem pro enzymy epimerázu a expandázu z organismů, produkujících cefalosporin. Při praktickém provedení postupu však nedošlo v dostatečném stupni ani k transformaci, ani k expresi. Mimoto i v případě, že by byla transformace úspěšná, byla by stále ještě nedostatečná pro účely vynálezu vzhledem k tomu, že by stále přetrvával problém, jak odstranit D-alfa-aminoadipoylový postranní řetězec. Tento nedostatečný pokus pro získání dostatečných výsledků při výrobě meziproduktů pro výrobu běžných cefalosporinů z kultur hub, produkujících penicillin je v kontrastu s výsledky, kterých je možno dosáhnout při použití způsobu podle vynálezu.

Prvním enzymatickým biologickým postupem při provádění způsobu podle vynálezu je expanze kruhu adipoyl-6-APA, která je prováděna enzymem expandázou, která je produktem exprese genu pro expandázu, jímž byl transformován nerekombinantní hostitel *P. chrysogenum*. Použití enzymu expandázy bylo již doporučováno v literatuře. Například v publikaci Cantwell a další, Curr Genet, 1990, 17:213-221, se doporučuje biologický postup pro výrobu 7-ADCA expanzí kruhu penicillinu V s následnou enzymatickou hydrolýzou výsledného deacetoxycefalosporinu V za vzniku 7-ADCA. Uvedený návrh je založen na dostupnosti klonovaného genu pro expandázu penicillinu N (cefE) ze *S. clavuligerus* podle publikací Kovacevic a další, J. Bacteriol., 1989, 171:754 - 70 a Ingolia a další, US 5 070 020. Avšak vzhledem k tomu, že expandáza působí na penicillin N, to znamená na svůj přírodní substrát, avšak nikoliv a penicillin V, je ještě zapotřebí genetického postupu k získání modifikovaného genu pro expandázu, schopnou způsobit expanzi kruhu penicillinu V. Této požadované modifikace nebylo podle publikace Cantwell a dalších dosaženo a autorům se pouze podařila transformace *Penicillium chrysogenum* při použití genu cef E ze *Streptomyces clavuligenus* a dosažení nízké úrovně exprese enzymu expandázy.

Expandázy byly velmi podrobně v oboru studovány, a to jak vzhledem ke své účinnosti, tak pokud jde o genetický řetězec. Například podle US patentových spisů č. 4 510 246 a 4 536 476 (Wolfe), byly odděleně izolovány enzymy cykláza, epimeráza a enzymy pro expanzi kruhu z bezbuněčného extraktu prokaryotických organismů, produkujících beta-laktamové sloučeniny včetně *Streptomyces clavuligerus* za získání stabilních enzymatických reakčních činidel.

- V US patentovém spisu č. 5 082 772, jemuž odpovídá EP-A 366 354 (Dotzla) se popisuje izolovaný a čištěný enzym expandáza z *S. clavuligerus*, jehož vlastnosti jsou plně popsány včetně terminálního zbytku a složení aminokyselin, přičemž se uvádí molekulová hmotnost přibližně 34 600. To je však v kontrastu s molekulovou hmotností 29 000, která je pro tentýž enzym
- 5 uváděna v US 4 536 476. EP-A-233 715 popisuje izolaci a restriční mapu endonukleáz pro gen pro expandázu, získaný ze *S. clavuligerus*, popisuje se rovněž exprese kódové DNA pro rekombinantní expandázu za dosažení účinné expandázy u kmene *S. clavuligerus*, který nemá schopnost produkovat cefalosporin. V US 5 070 020, jemuž odpovídá EP-A 341 892 (Ingolia a další) se popisuje řetězec kódové DNA pro enzym expandázu, získaný ze *S. clavuligerus*
- 10 a současně se popisuje také transformace kmene *P. chrysogenum* při použití vektoru pro expresi s obsahem uvedeného řetězce DNA a dosažení exprese enzymu expandázy. Uvádí se, že získaný enzym je použitelný pro expanzi substrátů, odlišných od penicillinu N, neuvádí se však žádný konkrétní výsledek pokusu o takovou expanzi.
- 15 Svrchu uvedené snahy se soustředily na enzym expandázu, odvozený od prokaryotického organismu *S. clavuligerus*. K expresi enzymu, který má zřejmě stejnou účinnost na expanzi kruhu, dochází také u kmenů eukaryotického organismu *Cephalosporium acremonium*, organismus se také označuje jako *Acremonium chrysogenum*. K expresi expandázy u těchto kmenů však dochází na základě přítomnosti bifunkčního genu, *cefEF*, který současně zajišťuje
- 20 expresi hydroxylázy DACS, jejíž přirozenou funkcí je přeměna kyseliny desacetoxycefalospóranové, DAOC, produktu enzymu expandázy, na deacetylcefalosporin C, DAC. Výsledkem uvedené exprese je jediný, avšak bifunkční enzym, který působí současně jako expandáza i jako hydroxyláza. Byly vyvíjeny snahy oddělit od sebe účinnosti těchto dvou produktů uvedeného genu, avšak tyto snahy až dosud nebyly úspěšné. Například v EP-A 281 391
- 25 se popisuje izolace a identifikace řetězce genu pro expandázu DAOCS a DACS, získaného z *C. acremonium* ATCC 11550 spolu s odpovídajícím řetězcem aminokyselin tohoto enzymu. Došlo k transformaci kmene *Penicillium* a k expresi uvedených enzymů, avšak nikdy nebyl uveden úspěšný výsledek pokusu o přeměnu penicillinů G a V na odpovídající cefalosporin. Mimoto přes myšlenku, že by genetickou technikou bylo možno od sebe oddělit genetickou informaci, která je
- 30 kódem pro DAOCS od kódové informace, pro DACS a pak dosáhnout oddělené exprese těchto enzymů nikdy nebyl uveden skutečný průkaz takového rozdělení.

- Enzym DAOCS/DACS, to znamená expandáza a hydroxyláza z *C. acremonium* byl rovněž v oboru důkladně prostudován, a to pokud jde o jeho účinnost, jeho vlastnosti i jeho genetický
- 35 řetězec. Například podle US patentových spisů č. 4 178 210, 4 248 966 a 4 307 192 (Demain) byly různé výchozí látky typu penicillinu zpracovávány bezbuněčným extraktem *C. acremonium*, čímž došlo k epimeraci a k expanzi kruhu za vzniku cefalosporinového antibiotika jako výsledného produktu. V US 3 753 881 (Wu-Kuang Yeh) se popisuje enzym z *C. acremonium*, pokud jde o jeho izoelektrický bod, molekulovou hmotnost, zbytky aminokyselin, poměr
- 40 účinnosti hydroxylázy k účinnosti expandázy a také peptidové fragmenty těchto enzymů.

- Enzym acetyltransferáza z *C. acremonium* byl rovněž podrobně popsán, pokud jde o jeho účinnost, vlastnosti, mapu s použitím restričních enzymů a řetězce nukleotidů a aminokyselin, výsledky byly uvedeny například v EP-A 437 378 a EP-A 450 758.
- 45

- Svrchu uvedený dosavadní stav techniky se zabývá pouze jedním hlediskem vynálezu, to znamená transformací kmene *P. chrysogenum* při použití genů pro expresi enzymu expandázy nebo enzymu expandázy/hydroxylázy, popisuje se také pokus pro dosažení exprese těchto enzymů. V dosavadním stavu techniky se však popisuje pouze použití enzymů, jejichž exprese
- 50 bylo dosaženo, k expanzi kruhu v případě penicillinu N, avšak nikoliv v případě penicillinů G a V. Avšak i v popsaném případě má penicillin N v poloze 7 postranní řetězec, který není možno odštěpit enzymatickým způsobem tak, aby v této poloze zbývala volná aminoskupina. Vynález je však založen na překvapujícím zjištění, že adipoylový postranní řetězec může být při použití kmene *P. chrysogenum* účinně navázán, že je možno použít enzym expandázu, jehož exprese se
- 55 dosahuje in situ k expanzi kruhu v získané sloučenině za vzniku adipoyl-7-ADCA, že enzymy

hydroxyláza a acetyltransferáza, jejichž exprese se rovněž dosahuje in situ, je možno využít k získání 3-acetoxymethylového postranního řetězce 7-ACA při použití adipoyl-7-ADCA jako substrátu a že je pak možno účinně odštěpit adipoylový postranní řetězec působením dalšího enzymu za vzniku 7-ACA. I když tedy je možno v dosavadním, stavu techniky nalézt různé izolované fragmenty poznatků, které jsou základem způsobu podle vynálezu, až dosud nebylo nikdy navrhováno, že by tyto poznatky bylo možno spojit k dosažení neočekávaných výsledků, kterých je způsobem podle vynálezu možno dosáhnout.

Například výroba kyseliny 6-adipoylpenicillanové je známa například z publikace Ballio A. a další, Nature, 1960, L85, 97 – 99. Enzymatická expanze kyseliny 6-adipoylpenicillanové, avšak pouze in vitro je rovněž známa například z publikace Baldwin a další, Tetrahedron, 1987, 43, 3009 – 3014 a EP-A 268 343. Konečně enzymatické odštěpení adipoylového postranního řetězce je rovněž známo například z publikace Matsuda a další, J. Bact., 1987, 169, 5815 – 5820.

Adipoylový postranní řetězec má následující strukturu: $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$, existují ještě dva další strukturálně příbuzné postranní řetězce, a to glutarylový řetězec se strukturou $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$ a

(D)-alfa-aminoadipoylový řetězec se strukturou $\text{COOH}-\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_3-$

$-\text{CO}-$. Enzymatické odštěpení glutarylového postranního řetězce je známo a bylo popsáno například v publikaci Shibuya a další, Agric. Biol. Chem., 1981, 45, 1561 – 1567 a US 3 960 662, dále Matsuda a Komatsu, J. Bact., 1985, 163, 1222 – 1228, Matsuda a další, J. Byct., 1987, 169, 5815 – 5820, japonský patentový spis 53-086084 (1978 – Banyu Pharmaceutical Co. Ltd.) a japonský patentový spis 52-128293 (1977 – Banyu Pharmaceutical Co. Ltd.). Také EP-A 453 048 popisuje způsob pro zlepšení účinnosti odštěpení adipoylového řetězce při použití enzymu glutarylacylázy, produkované Pseudomonas SY-77-1. Při náhradě různých aminokyselin v určitých polohách v alfa-podjednotce, bylo možno dosáhnout 3x až 5x vyšší rychlosti odštěpení adipoylové skupiny z adipoylserinu. Je nutno uvést, že v EP-A 453 048 se zjevně popisuje acyláza se zlepšenou účinností k adipoylovým postranním řetězcům, v žádném případě se nepopisuje chemický ani biologický postup, obdobný způsobu podle vynálezu, především takový, jímž by bylo možno vytvořit adipoylcefalosporin.

V případě, že je přítomen (D)-alfa-aminoadipoylový postranní řetězec, je známo nejprve enzymaticky odštěpit aminoskupinu a zkrátit tento postranní řetězec oxidázou (D)-aminokyselin, takže zbývá glutarylový postranní řetězec GL-7 a tento řetězec se pak odstraní dalším enzymem glutarylacylázou. Takový postup o dvou stupních je popsán v Matsuda, US 3 960 662, EP-A 275 901, japonský patentový spis 61-218057 (1988 – Komatsu, Asahi Chemical Industry Co.), WO 90/12110 (1990 – Wong, Biopure, Corp. a EP-A 436 355, Isogai a další, Bio/Technology, 1991, 9, 188 – 191.

Je také známo uskutečnit v jednom stupni odštěpení (D)-alfa-aminoadipoylového postranního řetězce, zvláště při použití rekombinantní techniky. Tento postup je popsán například v následujících publikacích:

Odštěpení (D)-alfa-aminoadipoylového řetězce v jednom stupni:

- Jap. 53-94093 (Meiji, Pseudomonas sp. BN-188),
- ap. 52-143289 (= US 4 141 790, Meiji, Aspergillus sp.),
- US 4 774 179 (Asji 1988, Pseudomonas sp. SE-83 a SE-495), = Jap. 61-21097 a Jap. 61-152286,
- Fr. pat. 2 241 557 (Aries 1975, Bacillus cereus var. fluorescens),
- Jap. 52-082791 (Toyo Jozo 1977, Bacillus megaterium NRRL B 5385),
- EP-A 321 849 (Hoechst, Pseudomonas, Bacillus subtilis, gamma-glutamyltranspeptidáza),
- EP-A 322 032, EP-A 405 846 a US 5 104 800 (Merck, Bacillus megaterium),

- EP-A 283 218 a US 4 981 789 (Merck, *Arthrobacter viscosus*), Rekombinantní postup v jednom stupni: Ceph C - 7-ACA:
- Jap. 60-110292 (Asahi 1985, *Comamonas*, rekombinantní kmen *E. coli* s genem z *Comamonas* sp. SY-77-1, přeměna v jednom stupni),
- 5 - Jap. 61-152-286 (Asahi 1986, *Pseudomonas*, rekombinantní kmen *E. coli* s genem z *Pseudomonas* sp. 5E83, jsou popsány genetické řetězce, postup v jednom stupni již byl uveden v US 4 774 179),
- Jap. 63-74488 (Asahi 1988, *Trigonopsis variabilis*, *Comamonas*, rekombinantní *E. coli*, exprese oxidázy D-aminokyseliny a acylázy GL-7-ACA jako genetické konstrukce),
- 10 - EP-A-475 652 (Fujisawa, acyláza cefalosporinu C a její výroba rekombinantní technologií).

V oboru jsou rovněž popsány různé způsoby pro výrobu 7-ADAC, například v publikacích US 3 304 236 a 3 972 774 (Eli Lilly a Co.), EP-A 454 478 (Shionogi a Co., Ltd.) a ve zveřejněné japonské patentové přihlášce č. 04 53 499 (Shionogi a Co., Ltd.).

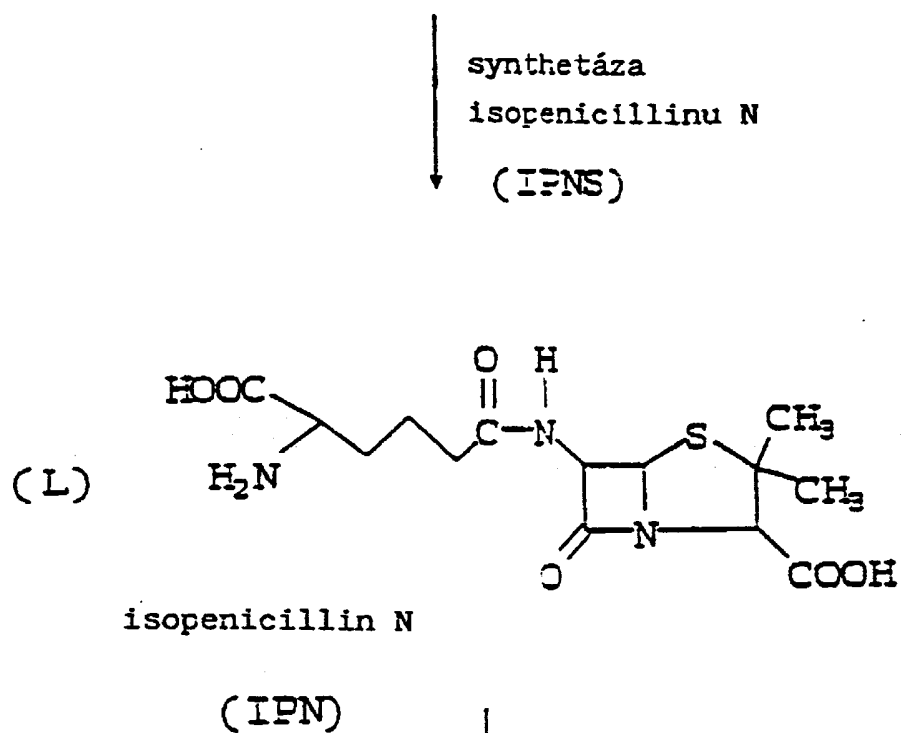
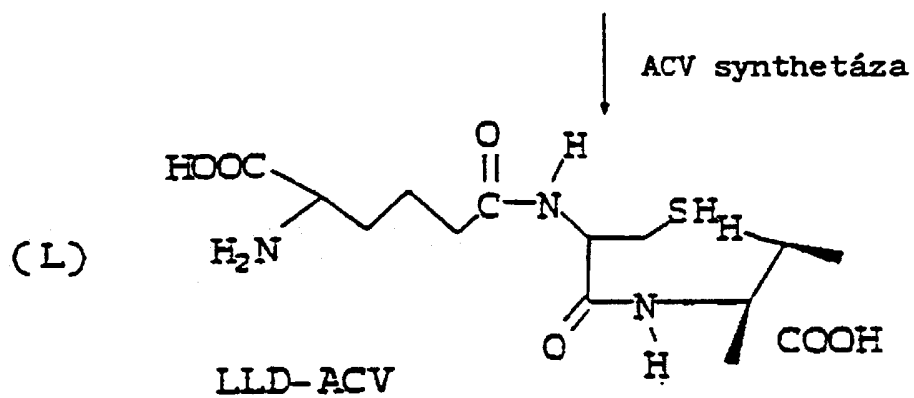
15

Odkaz na současně projednávanou patentovou přihlášku

- V této souvislosti je zapotřebí upozornit na současně projednávanou US patentovou přihlášku č. 07/933469, podanou 28. srpna 1992, v níž se popisuje biologický postup pro výrobu
- 20 17-ADCA, spočívající v expresi enzymu expandázy v transformovaném *P. chrysogenum* a celý biologický postup pro výrobu 7-ADAC a 7-ACA, tak jak je popsán v předmětné přihlášce. Avšak biologický postup v předmětné přihlášce spočívá ještě v dalších transformacích pro expresi dalších enzymů tak, že je nakonec dosaženo zcela odlišného rekombinantního metabolického postupu, vedoucího k odlišným výsledným produktům, z nichž žádný není
- 25 v uvedené přihlášce popsán.

- Aby bylo možno zajistit lepší porozumění způsobu podle vynálezu v souvislosti se svrchu popsanými postupy, které byly uvedeny ve známém stavu techniky, jsou dále uvedeny různé stupně metabolických postupů, které mohou vést k získání adipoyl-6-APA, adipoyl-7-ADCA,
- 30 adipoyl-7-ACA a 7-ACA, popsány jsou také meziprodukty a enzymy, jimiž je možno transformace uskutečnit.

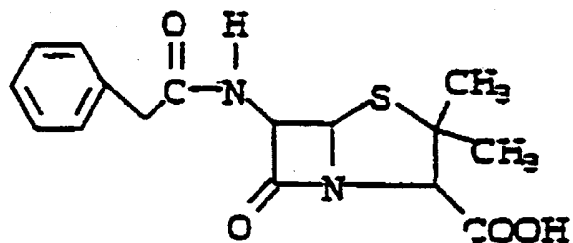
- Kyselina L-alfa-aminoadipová +
- 35 L-cystein + L-valin



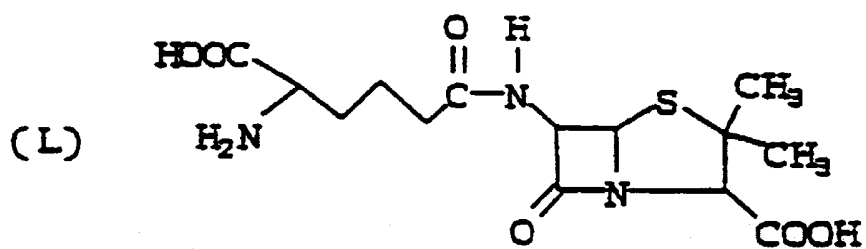
amidolyáza IPN

acyl CoA: 6-APA
acyltransferáza

fenylacetyl CoA



penicillin G



isopenicillin N

(IPN)

Isopenicillin N

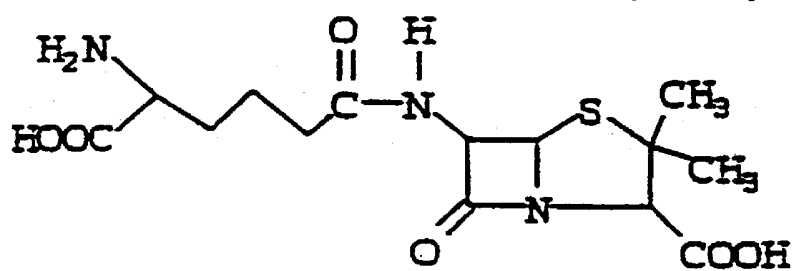
(IPN)

epimeráza IPN



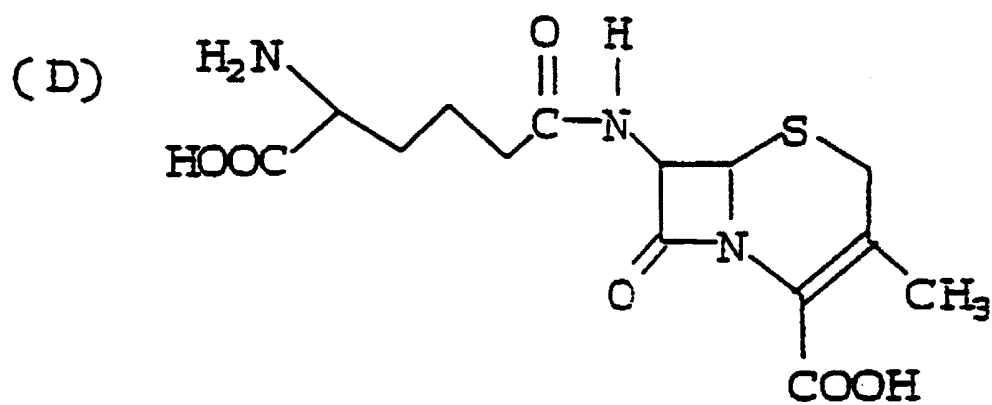
(D)

-fenylacetyl CoA

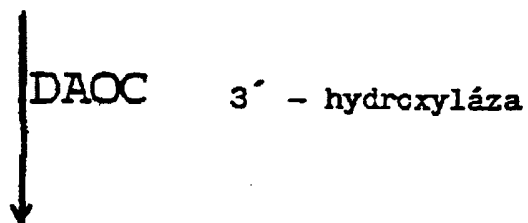


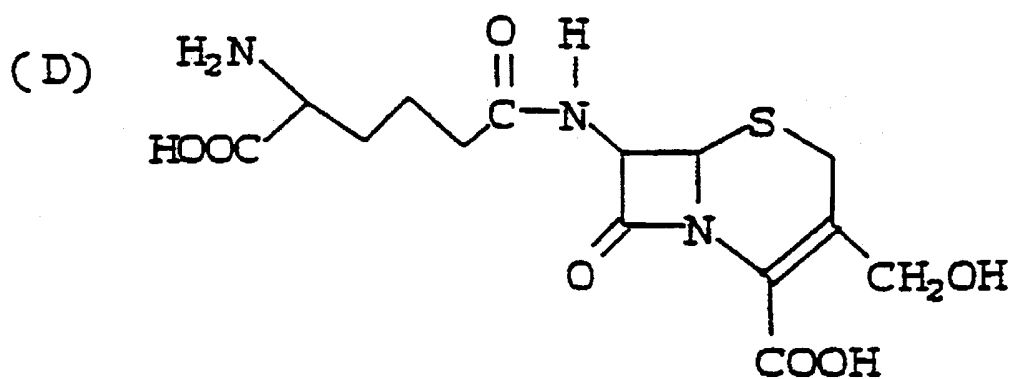
penicillin N

expandáza
penicillinu N



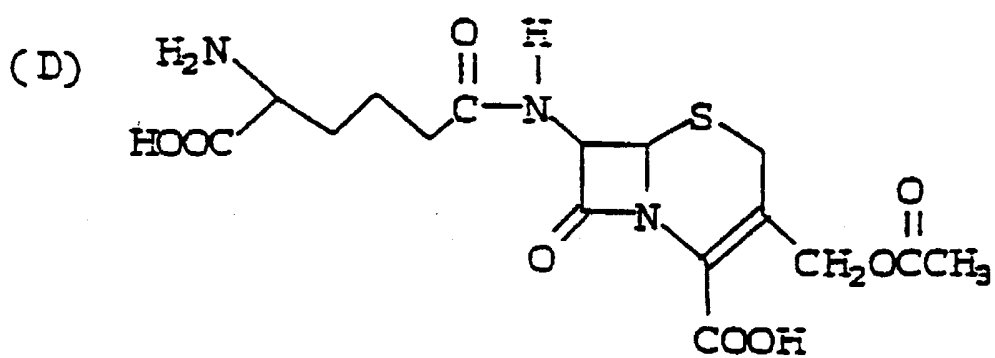
kyselina
desacetoxycefalosporanová
(DAOC)





kyselina
deacetylcefalosporanová
(DAC)

acetyltransferáza DAC



CEPHALOSPORIN C

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří biologický způsob výroby kyseliny 7-aminocefalosporinové, 7-ACA, který spočívá v tom, že se

5

1) v příslušném živném prostředí pěstuje kmen *Penicillium chrysogenum*, produkující izopenicillin N a do živného prostředí se přidává jako substrát adipát, a to kyselina adipová, její soli nebo její estery, asimilovatelné a využitelné použitým kmenem *Penicillium chrysogenum* za vzniku kyseliny adipoyl-6-aminopenicilanové, adipoyl-6-APA,

10

2) expresi odpovídajícího genu in situ se uskuteční následující přeměny:

15

a) expanze kruhu adipoyl-6-APA in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodesacetoxycefalosporanové, adipoyl-7-ADCA působením enzymu expandázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum*, transformuje kódovou DNA pro enzym expandázu, pro níž je substrátem adipoyl-6-APA, přičemž u adipoyl-6-APA, produkované uvedeným kmenem dojde in situ k expanzi kruhu a ke vzniku adipoyl-7-ADCA,

20

b) 3-methylový postranní řetězec adipoyl-7-ADCA se hydroxyluje in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodeacetylcefalosporinové, adipoyl-7-ADAC, působením hydroxylázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum* transformuje kódovou DNA pro enzym hydroxylázu, pro níž je substrátem adipoyl-7-ADCA, přičemž u adipoyl-7-ADCA, produkované tímto kmenem, dojde k hydroxylaci in situ a ke vzniku adipoyl-7-ADAC

25

c) adipoyl-7-ADAC se in situ acetyluje za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminocefalosporanové, adipoyl-7-ACA působením enzymu acetyltransferázy, přičemž uvedený kmen *P. chrysogenum* byl předběžně transformován kódovou DNA pro enzym acetyltransferázu, schopný působit na adipoyl-7-ADAC jako na substrát, v důsledku této exprese dochází k acetylaci adipoyl-7-ADAC, produkované tímto kmenem, in situ za vzniku adipoyl-7-ACA a

30

3) adipoyl-7-ACA se uvede do styku s adipoylamidázou za odstranění adipoylového postranního řetězce za vzniku 7-ACA, která se izoluje.

Jednotlivé pojmy, tak, jak byly svrchu použity, mají následující význam:

35

„7-ACA“ je kyselina 3-/(acetoxy)methyl/-7-amino-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo/4.2.0/okt-2-en-2-karboxylová,

40

„adipoyl-6-APA“ je kyselina /2S-(2alfa, 5alfa, 6beta)/-3,3-dimethyl-7-oxo-6-/(hexan-1,6-diol)amino/-4-thia-1-azabicyklo/3.2.0/heptan-2-karboxylová,

„adipoyl-7-ADCA“ je kyseliny 3-methyl-7-/(hexan-1,6-diol)amino/-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo/4.2.0/okt-2-en-2-karboxylová a

45

„adipoyl-7-ADAC“ je kyselina 3-hydroxymethyl-7-/(hexan-1,6-diol)amino/-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyklo/4.2.0/okr-2-en-2-karboxylová.

50

Vynález se zvláště týká nových biologických postupů pro přípravu kyseliny 7-aminocefalosporinové, 7-ACA, tak jak byly svrchu uvedeny, v těchto postupech se jako adipát s výhodou užije disodná sůl kyseliny adipové a DNA, která obsahuje kódový řetězec pro enzymy expandázu, hydroxylázu a acetyltransferázu se ve všech třech případech odvodí od *Cephalosporium acremonium*, řetězec pro adipoylacylázu je odvozen od rodu *Pseudomonas*.

Při provádění způsobu podle vynálezu se využívají vektory pro expresi, které obsahují kódovou rekombinantní DNA pro enzymy expandázy, hydroxylázu a acetyltransferázu, odvozené od

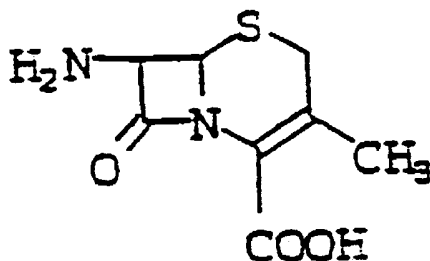
Cephalosporium acremonium a promotory, které řídí expresi genů pro tyto enzymy, vektor obsahuje plazmidy pPEN/CEPH-1, pPENCACT a pTS-8, jak bude dále vysvětleno.

Při použití těchto vektorů se získají hostitelské buňky *Penicillium chrysogenum*, transformované vektory pro expresi rekombinantní DNA pro enzymy expandázu, hydroxylázu a acetyltransferázu, odvozené od *Cephalosporium acremonium* a promotor, řídící expresi této DNA s obsahem promotoru genu IPNS *Penicillium chrysogenum*. Pro vynález je zvláště možno využít hostitelských buněk *Penicillium chrysogenum*, transformovaných vektorem pro expresi rekombinantní DNA s obsahem plazmidů pPEN/CEPH-1, pPenCACT a pTS-8, jak bude dále popsáno.

Popsán bude také způsob pěstování rekombinantních hostitelských buněk *Penicillium chrysogenum* za podmínek, vhodných pro expresi genu, přičemž uvedené rekombinantní hostitelské buňky obsahují vektory pro expanzi rekombinantní hostitelské buňky obsahují vektory pro expresi rekombinantní DNA, které obsahují kódovou DNA pro enzymy expandázu, hydroxylázu a acetyltransferázu, odvozené od *Cephalosporium acremonium* a promotor, řídící expresi této kódové DNA pro uvedené enzymy s obsahem promotoru genu IPNS *Penicillium chrysogenum*. Postup se zvláště týká způsobu pěstování rekombinantních hostitelských buněk *Penicillium chrysogenum* za podmínek, vhodných pro expresi genu, přičemž rekombinantní hostitelské buňky obsahují vektory pro exprese rekombinantní DNA s obsahem plazmidů pPEN/CEPH-1, pPenCACT a pTS-8, jak bude dále popsáno.

Podrobnější popis výhodných provedení

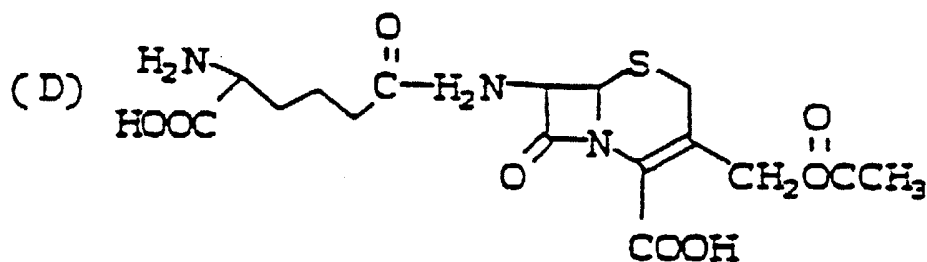
V jednom z výhodných provedení se vynález týká nového biologického postupu pro výrobu kyseliny 7-aminocefalosporinové 7-ACA, jde o klíčový produkt pro výrobu běžných syntetických cefalosporinů a je možno jej vyjádřit pomocí následujícího strukturního vzorce:



Kromě cefalosporinového jádra je význačnou vlastností 7-ACA její 7-aminoskupina a její 3-acetyloxymethylová skupina, často uváděná jako 3-acetoxymethylová skupina. 7-aminoskupina je skupina, kterou je možno převést na velký počet různých dalších postranních řetězců a tvoří proto základ pro výrobu dalších cefalosporinů.

3-acetyloxymethylová skupina se rovněž často převádí na jiný postranní řetězec za vzniku běžných cefalosporinů.

7-ACA jako výsledný produkt a adipoyl-7-ACA jako meziprodukt způsobu podle vynálezu je možno uvést do kontrastu s cefalosporinem C, jiným klíčovým meziproduktem při výrobě cefalosporinu, který je možno vyjádřit následujícím strukturním vzorcem



- V případě tohoto meziproductu není 7-(D)-alfa-amino-adipoylový postranní řetězec vhodný pro další syntetické manipulace a musí být odštěpen za vzniku požadované a přijatelné 7-amino-skupiny. Naneštěstí je odstranění uvedeného řetězce velmi obtížné, a to jak chemickým, tak biochemickým způsobem.

Vysvětlení zkratk

- V průběhu popisu, zvláště při popisu výhodných provedení jsou použity některé zkratky, které mají následující význam:

7-ACA	kyselina 7-aminocefalosporinová
7-ADAC	kyselina aminodeacetylcefalosporinová
15 7-ADCA	kyselina 7-aminodesacetoxycefalosporanová
6-APA	kyselina 6-aminopenicillanová
DAOC	kyselina desacetoxycefalosporinová
DAOCS	DAOC-syntetáza
DAC	deacetylcefalosporin C
20 DACS	DAC syntetáza
IPNS	izopenicillin N syntetáza
Tris	tris/hydroxymethyl/aminomethan
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
DEPC	diethylpyrokarbonát
25 TE	pufr tris/EDTA
SSC	chlorid sodný a citrát sodný ve směsi jako pufr
SDS	dodecylsírán sodný
PEG	polyethylenglykol.

- 30 Kultura *Penicillium chrysogenum*

- V prvním stupni způsobu podle vynálezu se udržuje v živném prostředí, schopném udržet jeho růst kmen *Penicillium chrysogenum*, produkující izopenicillin N, přičemž se k živnému prostředí přidává adipát, tvořený kyselinou adipovou, jejími solemi a jejími estery v jakékoliv směsi, tyto látky jsou kmenem *Penicillium chrysogenum* asimilovány a využívány za vzniku adipoyl-6-APA. Adipát je možno k živnému prostředí přidávat po jeho naočkování *P. chrysogenum*, avšak s výhodou je tento materiál v živném prostředí již přítomen v okamžiku očkovaní.

- I jiné rody než *Penicillium*, například *Aspergillus nidulans*, a také jiné organismy z rodu *Penicillium* kromě čeledi *chrysogenum* produkují izopenicilin N. Avšak historicky byly známým způsobem pro šlechtění kmenů vyvinuty kmeny s největší produkcí izopenicilinu N právě z čeledi *chrysogenum*. Z tohoto praktického důvodu je vynález spojován s kmenem *Penicillium chrysogenum*, přestože jeho použitelnost v případě jiných čeledí je zřejmá. Jakýkoliv již uložený kmen *Penicillium chrysogenum* nebo jakýkoliv jiný veřejně dostupný zdroj takového kmene je vhodným výchozím materiálem k provádění způsobu podle vynálezu.

Živné prostředí, schopné udržovat růst kmene *Penicillium chrysogenum*, produkujícího izopenicilin N je běžného typu, tak jak jsou tato prostředí v oboru známa. Je například možno

použít aerobní submerzní fermentace a živné prostředí vybrat z řady dostupných vhodných prostředí. Typická prostředí obsahují zdroje uhlíku, jako jsou sacharóza, glukóza a škrob, zdroje dusíku, například sojovou mouku nebo drť, olej z bavlníkových semen, arašídovou mouku, různé aminokyseliny, jejich směsi a peptony. Požadavky na produkci jsou zejména vysoký výtěžek a snadnost izolace a výhodným prostředím pro toto použití může proto být například melasa jako zdroj uhlíku a sojová mouka a aminokyseliny, jako zdroje dusíku.

K živnému prostředí se také běžně přidávají anorganické živné soli, jde o soli, které dodávají ve formě iontů následující složky: sodík, draslík, amonný ion, vápník, fosfát, sulfát, chlorid, bromid, dusičnan, uhličitán, železitý a železnaté ionty, hořčík, mangan a podobně. Pro růst, vývoj a metabolismus *Penicillium chrysogenum* jsou obvykle podstatné také stopové prvky, které je rovněž možno přímo přidávat do živného prostředí, pokud již nejsou přítomny jako znečištěniny jiných složek živného prostředí.

Kmeny *Penicillium chrysogenum* mohou být pěstovány v zařízení s malým objemem, například v třepacích lahvích s objemem 1 litr tam, kde je zapotřebí získat pouze malá množství adipoyl-7-ACA a popřípadě 7-ACA. V případě, že je žádoucí získat větší množství adipoyl-7-ACA, je však nutno použít fermentační tanky pro fermentaci ve větším měřítku, obvykle při submerzní aerobní fermentaci.

Pro přípravu adipoyl-7-ACA ve velkém měřítku se spory *Penicillium chrysogenum* udržují na šikmém agaru. Tyto spory ze šikmého agaru se pak použijí k naočkování vegetativního živného prostředí s malým objemem. Vegetativní prostředí se inkubuje za vzniku intenzivně rostoucí čerstvé kultury mikroorganismu. Tato kultura ve vegetativní růstové fázi se pak užije pro naočkování velkého množství živného prostředí ve fermentační produkční fázi. V některých případech může být žádoucí založit ještě další vegetativní kulturu jako očkovací materiál pro fermentační prostředí. Takový druhý stupeň vegetativního živného prostředí se běžně užívá v případě, že objem fermentačního prostředí je podstatně větší než objem prvního vegetativního prostředí. Postupuje se tedy tak, že se spory mikroorganismu nejprve pěstují v malém objemu vegetativního prostředí za získání očkovacího materiálu pro větší objem vegetativního prostředí. V tomto vegetativním prostředí s větším objemem je pak možno dosáhnout dostatečné koncentrace mikroorganismu k rychlému zahájení fermentace ve velkém měřítku ve fermentačním tanku. Vegetativní prostředí může mít stejné složení jako fermentační prostředí nebo může obsahovat ještě další složky k podpoře růstu a vývoje mikroorganismu v malém měřítku.

Kmeny *Penicillium chrysogenum*, užívané k provádění způsobu podle vynálezu se nejúčinněji pěstují při teplotách v rozmezí 20 až 30 °C, optimálních výtěžků je možno dosáhnout při teplotě 22 až 28 a zvláště 25 °C.

K maximální produkci adipoyl-7-ACA dochází při pěstování kmene *Penicillium chrysogenum* v tanku s velkým objemem po dobu 10 až 30, s výhodou 15 až 25 dnů. Avšak při pěstování v zařízení s menším objemem, například v třepacích lahvích s objemem 250 ml je růst mikroorganismu rychlejší a organismus produkuje adipoyl-7-ACA v kratší době, například v rozmezí 4 až 15 dnů, často 5 až 7 dnů.

V případě, že konečná hodnota pH při fermentaci v tanku ve velkém měřítku dosáhne 8,0 nebo ještě vyšší hodnoty, může být nepříznivě ovlivněn výtěžek adipoyl-7-ACA. V takovém případě je žádoucí v průběhu fermentace sledovat pH živného prostředí. V případě, že se ukáže, že pH dosáhne uvedených hodnot před dosažením maximální produkce adipoyl-7-ACA, je nutno hodnotu pH upravit přidáním vhodné kyseliny nebo pufru do fermentačního prostředí.

Produkci adipoyl-7-ACA je možno sledovat tak, že se vzorky fermentačního prostředí chromatografují.

Tak jak tomu je většině případů aerobní fermentace, nechává se živným prostředím procházet sterilní vzduch pro dosažení účinnějšího růstu kmene *Penicillium chrysogenum* a zvýšené produkce adipoyl-7-ACA. Objem vzduchu, který prochází živným prostředím je obvykle alespoň 2,0 objemu vzduchu za minutu na jeden objem živného prostředí. Zvýšení rychlosti průchodu vzduchu však může mít často příznivý vliv na rychlost produkce adipoyl-7-ACA.

Kmen *Penicillium chrysogenum* bude typicky produkovat kromě adipoyl-7-ACA řadu vedlejších produktů a metabolitů. Vzhledem k tomu, že některé z těchto sloučenin jsou labilní, v kyselém prostředí, je žádoucí při izolaci adipoyl-7-ACA z fermentačního prostředí postupovat tak, že se na celé fermentační prostředí působí po krátkou dobu kyselým pH tak, aby došlo k rozkladu alespoň některých současně produkovaných nečistot. Fermentační produkt, adipoyl-7-ACA se pak ze zfiltrovaného takto zpracovaného fermentačního prostředí oddělí a popřípadě je tuto látku možno oddělit od dalších složek fermentačního prostředí chromatografií na iontoměničové pryskyřici a v případě potřeby je možno produkt dále čistit před následným enzymatickým odštěpením adipoylového postranního řetězce. Dělení chromatografií na iontoměničce je možno uskutečnit také až po odštěpení postranního řetězce. Jedním z hlavních vedlejších produktů, které působí potíže při izolaci, je adipoyl-6-APA, tento vedlejší produkt je možno chemicky nebo enzymaticky rozložit tak, aby oddělování bylo snadnější. Na začátku je možno filtrát fermentačního prostředí předběžně čistit, což může zahrnovat počáteční extrakci organickým rozpouštědlem, nemísitelným s vodou, jako je n-butanol nebo amylacetát k odstranění nečistot. Extrahované živné prostředí je pak možno dále čistit předběžnou chromatografií na aktivovaném uhlí.

Přidávání adipátu

V době, kdy je fermentační kultura *Penicillium chrysogenum* připravena, to znamená před naočkováním se s výhodou k ostatním složkám fermentačního živného prostředí přidá jako substrát adipát: Adipát je případně možno přidávat také určitou dobu po naočkování fermentačního prostředí, například 1, 2 a/nebo 3 dny po naočkování. Adipát je definován jako jedna nebo větší počet složek ze skupiny kyselina adipová nebo soli nebo estery kyseliny adipové, které mohou být asimilovány a využívány pěstovaným kmenem *Penicillium chrysogenum* za získání adipoyl-6-APA. Kyselinu adipovou, její soli a její estery je možno použít jednotlivě nebo v jakékoliv kombinaci. Výhodná je disodná sůl, avšak použít je možno také draselnou sůl a směsné soli se sodíkem. Použitelný je methylester uvedené kyseliny, avšak ethylester je ve vodě nerozpustný. Sůl kyseliny adipové nebo její ester musí být takový, aby mohl být kmenem *Penicillium chrysogenum* asimilován a využíván k produkci adipoyl-6-APA. Je možno použít kyselinu adipovou jako takovou, přesto že je ve vodě nerozpustná, v případě, že se za vhodných podmínek pH vytváří asimilovatelná sůl.

Vhodné enzymy expandáza a/nebo hydroxyláza

Kmen *Penicillium chrysogenum*, který byl pěstován a který je schopen zpracovávat svrchu uvedený adipát tak, aby byl získán produkt adipoyl-6-APA, může být také takový kmen, který byl transformován pomocí kódovou DNA pro enzymy expandázu a hydroxylázu tak, že v důsledku této exprese dochází k expanzi kruhu v získaném produktu adipoyl-6-APA in situ za vzniku adipoyl-7-ADCA a současně také dochází k přeměně 3-methylového postranního řetězce na 3-hydroxymethylový řetězec.

Adipoyl-6-APA se tvoří nitrobuněčně při fermentaci *Penicillium chrysogenum*, pěstovaného v přítomnosti adipátu. Při této fermentaci dochází u transformovaného kmene *Penicillium chrysogenum* in situ také k expresi kódové DNA pro enzymy expandázu a hydroxylázu a tyto enzymy zpracovávají adipoyl-6-APA jako substrát, takže dochází k expanzi kruhu za vzniku adipoyl-7-ADAC a tento produkt je pak hydroxylován na adipoyl-7-ADAC, to znamená na kyselinu adipoyl-7-aminodeacetylcefalosporanovou.

Nový biologický způsob podle vynálezu v sobě zahrnuje také přeměnu kmene *Penicillium chrysogenum* svrchu uvedeného typu transformací s použitím jakékoliv kódové DNA pro enzymy expandázy a hydroxylázy, v důsledku této exprese dochází in situ k expanzi kruhu v adipoyl-6-APA za vzniku adipoyl-7-ADCA a pak v důsledku hydroxylace dochází ke vzniku adipoyl-7-ADAC. To znamená, že při expresi DNA, která se užije k transformaci použitého kmene *Penicillium chrysogenum* musí docházet ke tvorbě enzymů, které nejen mají účinnost enzymu expandázy, tak jak již byla popsána ve známém stavu techniky, to znamená schopnost expanze kruhu izopenicilinu N na DAOC, nýbrž také schopnost expandovat kruh adipoyl-6-APA za vzniku adipoyl-7-ADCA. Kromě toho musí být enzym hydroxyláza, který se tvoří v důsledku exprese DNA, použité k transformaci schopný způsobit hydroxylaci adipoyl-7-ADCA na požadovanou adipoyl-7-ADAC.

Pokud jde o zajištění účinnosti enzymu expandázy a hydroxylázy, je možno v rámci způsobu podle vynálezu použít dvou různých provedení. V jednom z těchto provedení, který je výhodným provedením, je možno zajistit funkce enzymů expandázy a hydroxylázy pomocí jediného, v podstatě bifunkčního genu kmene *Cephalosporium acremonium*, kterým se transformuje *P. chrysogenum*. Tento gen, v důsledku jehož exprese dochází společně k tvorbě expandázy a hydroxylázy bude dále označován jako gen pro expandázu/hydroxylázu podle svého produktu, kterým jsou enzymy expandáza a hydroxyláza. V případě transformace *P. chrysogenum* při použití kódové DNA z *C. acremonium* pro enzymy expandázu a hydroxylázu bude v typických případech exprese uvedené DNA řízena jediným promotorem, což je ukazatelem toho, že přítomen je pouze jeden gen.

V dalším možném provedení, které je rovněž vhodným provedením, dochází k transformaci *P. chrysogenum* jako hostitelského kmene při použití kódové DNA pro enzymy expandázu a hydroxylázu ve formě dvou odlišných genů na rozdíl od provedení, kdy je pro oba enzymy použit jediný gen. Je nutno uvést, že oddělené geny pro enzymy expandázu a hydroxylázu je možno nalézt v prokaryotických mikroorganismech, například u *S. clavuligerus* a nikoliv v eukaryotických mikroorganismech, jako je *C. acremonium*, kde je přítomen jediný gen pro oba enzymy, jak již bylo uvedeno svrchu.

Řetězec enzymu hydroxylázy z prokaryotických organismů a příslušné kódové nukleotidy byly popsány v publikaci Kovacevic a další, J. Bacteriol., 173(1), 398 – 400, 1991 a EP-A 465 189, popsány jsou také způsoby a prostředky pro izolaci těchto enzymů. Jak je v oboru dostatečně známo, je na základě řetězce pro hydroxylázu možno syntetizovat laboratorním způsobem nebo na automatických syntetizátorech DNA celou kódovou DNA pro enzym hydroxylázu. Tuto DNA nebo obdobné řetězce, které jsou kódovými řetězci pro stejný řetězec aminokyselin hydroxylázy nebo pro fragmenty nebo deriváty tohoto řetězce s odpovídající hydroxylázovou účinností je možno použít jako základ pro přípravu různých vektorů pro klonování a pro expresi po kombinaci s promotorem a s dalšími řídicími řetězci, celou konstrukci je pak možno použít k transformaci *P. chrysogenum* jako hostitelského organismu, v němž pak dochází k expresi genu pro hydroxylázu, s jehož pomocí je tedy možno uskutečnit způsob podle vynálezu. Je také možno postupovat tak, že se DNA užije jako sonda pro sériové vyšetření knihovny genomu určitého kmene, který potenciálně obsahuje použitelný enzym hydroxylázu a tímto způsobem se identifikuje na základě hybridizace příslušný homologní řetězec. Účinnost jakéhokoliv takto identifikovaného enzymu hydroxylázy je pak možno potvrdit při použití adipoyl-7-ADCA jako substrátu při provádění způsobu podle vynálezu, s následnou izolací získaných produktů této hydroxylace pomocí HPLC.

V případě, že se použije toto provedení způsobu podle vynálezu, to znamená exprese genu, který produkuje pouze enzym hydroxylázu, bude pak zapotřebí rovněž odděleně použít další DNA s kódovým řetězcem pro enzym expandázu, takže bude možno transformovat *P. chrysogenum* vhodným vektorem pro expresi, který zajistí in situ expresi genu pro enzym expandázu, takže dochází k expanzi kruhu při provádění způsobu podle vynálezu. Je známa celá řada typů

expandáz a na základě podobnosti postranních řetězců je možno předpokládat, že řada těchto omezení bude použitelná při provádění nového biologického postupu podle vynálezu.

- 5 Další výhodná provedení způsobu podle vynálezu jsou založena na skutečnosti, že k transformaci nerekombinantního kmene *P. chrysogenum* je možno použít DNA, obsahující kódový řetězec pro více než jednu expandázu a/nebo pro více než jednu hydroxylázu. V průběhu těchto provedení je pak možno získat zvýšenou účinnost typu expandázy a/nebo hydroxylázy vzhledem ke zvýšenému množství bílkoviny enzymu, k jehož expresi dochází.
- 10 V odstavcích, týkajících se známého stavu techniky již bylo uvedeno, že byl plně analyzován řetězec enzymu expandázy, odvozeného od kmene *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27074 a že tento řetězec byl charakterizován na základě mapy působení restričních endonukleáz. Avšak byly rovněž podány zprávy o enzymu, který se zdál být totožný enzymem a byl odvozen od *S. clavuligerus* NRRL 3585. U tohoto enzymu byla zjištěna odlišná molekulová hmotnost, avšak řetězec enzymu dosud nebyl analyzován. Ve svrchu uvedených odstavcích pro známý stav techniky je rovněž popsáno, že byl analyzován řetězec enzymu DAOCS/DACS z *Cephalosporium acremonium* ATCC 11550, jak je uvedeno v Samson a další, *Bio/Technology* (1987) 5: 1207 – 1214, a v EP-A 281 391.
- 20 Tyto expandázy, které již byly identifikovány a tvoří součást známého stavu techniky, je rovněž možno použít při provádění nového biologického postupu podle vynálezu. Může se ukázat, že i jiné expandázy, které dosud nebyly identifikovány, a mohou být odvozeny od odlišných kmenů *S. clavuligerus* nebo *C. acremonium*, nebo dokonce od mikroorganismů zcela odlišných rodů, mohou být rovněž vhodné pro uskutečnění nového způsobu podle vynálezu. Způsoby identifikace
- 25 takových nových kmenů a rodů vhodných mikroorganismů a způsoby izolace odpovídajících enzymů typu expandázy, jakož i zjištění, zda tyto enzymy jsou vhodné pro použití při provádění způsobu podle vynálezu spadají do běžné praxe v oboru. Sériové vyšetření bezbuněčných extraktů případných nových kmenů a rodů použitelných mikroorganismů je možno uskutečnit poměrně pohodlným a reprodukovatelným způsobem tak, že se tyto extrakty přidávají k adipoyl–6–
- 30 APA jako k substrátu v přítomnosti známých kofaktorů DAOCS, jako jsou železnaté ionty, askorbát, alfa–ketoglutarát a adenosintrifosfát, ATP. Adipoyl–6–ATA je možno v dostatečném množství připravit přidáváním adipátu jako substrátu k netransformovanému *Penicillium chrysogenum* způsobem, který bude dále podrobněji popsán. Požadovaná expandáza nebo expandáza i hydroxyláza jsou přítomny v tom případě, že se počne vytvářet adipoyl–7–ADCA
- 35 a/nebo adipoyl–7–ADAC, přítomnost těchto látek je možno snadno prokázat chromatograficky.

Při použití známé rekombinační techniky je také možno vytvořit sondy DNA na bázi nukleotidových řetězců genů pro expandázy například z *S. clavuligerus* a *C. acremonium*, například ke zjištění obsahu DNA ve vyšetřovaných mikroorganismech, které by mohly

40 produkovat expandázu, vhodnou pro použití při provádění způsobu podle vynálezu.

Potenciální zdroje expandázy, hydroxylázy nebo expandázy/hydroxylázy

- Expandázy, jak již bylo uvedeno, jsou enzymy, které katalyzují expanzi penamového kruhu, který se nachází v molekulách typu penicilinu na ceph–3–emový kruh, který se nachází
- 45 v cefalosporinech. Jakýkoliv organismus, produkující metabolity s obsahem cefemového kruhu je tedy potenciálním zdrojem kódové DNA pro expandázu. Stejně jakýkoliv organismus, který produkuje cefalosporin s obsahem 3–hydroxymethylové skupiny je potenciálním zdrojem kódové DNA pro hydroxylázu nebo expandázu/hydroxylázu. Příklady takových organismů budou dále
- 50 uvedeny, jde však pouze o příklady, které v žádném smyslu nejsou vyčerpávající.

Houby

- Cephalosporium acremonium
- 55 Cephalosporium sp.

- Emericellopsis
- Paecilomyces
- Scopulariopsis
- Diheterospora
- 5 Spiroidium
- Anoxiopsis

Aktinomycety

- 10 Streptomyces clavuligerus
- S. lipmanii
- S. wadayamensis
- S. todorominensis
- S. filipinensis cephamycini
- 15 S. heteromorphus
- S. panayensis
- S. griseus
- S. cattleya
- Nocardia lactamdurans

- 20 Jiné bakterie

- Flavobacterium sp.
- Alcaligenes denitrificans
- 25 Mycoplasma bullata
- Providencia rettgeri
- Lysobacter lactamgenus

- 30 Expandázy a hydroxylázy, produkované svrchu uvedenými organismy jsou prozatím pouze materiálem pro další výzkumy a je možné, že pouze některé z nich budou skutečně vhodné pro použití při provádění nového způsobu podle vynálezu.

Izolace kódových fragmentů DNA pro expandázu

- 35 Jakmile byl požadovaný enzym expandáza zjištěn svrchu uvedeným způsobem, je možno použít známé postupy pro izolaci kódové DNA pro takový enzym. Je zapotřebí zkonstruovat sondy DNA na bázi známých řetězců a částí řetězců kódových genů pro expandázy, tyto sondy pak budou hybridizovat s kódovou DNA pro požadovaný enzym, kterou je nutno izolovat.
- 40 Konstrukce takových sond je založena na znalosti řetězců aminokyselin a řetězců nukleotidových bází, které jsou kódovými řetězci pro enzym expandázu a také na preferencích kodonů u určitých mikroorganismů. Podrobný popis typického postupu tohoto typu, použitého v případě DNA genomu mikroorganismu Streptomyces clavuligerus ATCC 27064 bude dále podrobněji popsán.

- 45 Izolaci kódové DNA pro enzym expandázu je možno uskutečnit s použitím restrikce restrikčními enzymy s následnou opětovnou vazbou, tak jak je to dobře známo v technologii pro získávání rekombinantní DNA. Je zapotřebí znát mapu míst působení restrikčních endonukleáz genomu použitého mikroorganismu tak, aby bylo možno oddělit a izolovat příslušný restrikční fragment. Restrikční mapy pro S. clavuligerus a C. acremonium jsou již dostupné. V případě prvního mikroorganismu se užívají restrikční enzymy Bam HI a Sal I a elektroforézou se pak izolují
- 50 požadované fragmenty s velikostí 1,8 až 2,5 kb.

Zdroje enzymu acetyltransferázy a izolace kódových fragmentů DNA pro tento enzym

- 55 Klonování genů pro DAC acetyltransferázu z C. acremonium je možno uskutečnit podle dobře známých rekombinačních postupů, které budou nyní obecněji popsány.

Aby bylo možno klonovat gen pro acetyltransferázu, je nejprve nutno vytvořit mutanty *C. acremonium*, které nemají schopnost převádět kyselinu deacetylcefalosporanovou, DAC, na cefalosporin C. Tento postup spočívá v tom, že se buňky kmene *C. acremonium* podrobí působení mutagenů, například N-nitrosoguanidinu, NTG, kyseliny dusité nebo ultrafialového světla, pak se kmen pěstuje na vhodném růstovém prostředí a pak se například chromatografickým nebo biologickým způsobem sleduje nahromadění DAC.

Po identifikaci vhodné mutanty se v následujícím stupni pro identifikaci kódového genu pro acetyltransferázu izoluje DNA kmene *C. acremonium*, který produkuje cefalosporin C. Po odštěpení působením restriční endonukleázy nebo mechanickým způsobem se získají fragmenty s vhodnou délkou řetězce a gen se uloží do vektoru pro transformaci, například plazmidu nebo kosmidu, který také obsahuje vhodný dominantní značící gen, například gen pro odolnost proti hygromycinu nebo proti phleomycinu. Vektor by měl také obsahovat řetězce DNA, které mohou usnadnit následující zpětnou izolaci uložené DNA, například místa z řádu lambda, jako oblast *cos*, která dovoluje zpětnou izolaci klonované DNA *in vitro* po infekci *E. coli*, postup je možno provést známým způsobem.

Protoplasty mutovaného kmene, který původně neprodukoval acetyltransferázu se pak transformují při použití vektoru s obsahem statistických fragmentů DNA genomu a transformované buňky se podrobí selekci podle odolností proti antibiotikům. Transformované buňky je pak možno sledovat na opětné získání schopností produkce cefalosporinu C, což je ukazatelem úspěšné komplementace genem pro acetyltransferázu, obsaženým ve vektoru. Mutanty, které pravděpodobně obsahují klonované kopie genů je pak možno pěstovat, jejich DNA izolovat a izolovat také DNA z vektoru svrchu uvedeným způsobem. Skutečnost, že vektor obsahuje gen pro acetyltransferázu, je možno potvrdit subklonováním v *E. coli* při použití standardních postupů a snadno dostupných vektorů s následnou retransformací mutanty, která neprodukuje acetyltransferázu. Gen je pak možno izolovat, analyzovat jeho řetězec a popřípadě dále zpracovávat tak, jak bude dále uvedeno v příkladech provedení při použití běžně užívaných postupů v molekulární genetice.

Podle dalších postupů, které jsou v oboru rovněž známy, je možno například podle publikace Matsuda a další, izolovat a analyzovat řetězec kódového genu pro acetyltransferázu z *C. acremonium* a také odvodit příslušný řetězec aminokyselin enzymu, jak již bylo popsáno v EP-A 450 758. Tyto alternativní postupy spočívají v izolaci enzymu acetyltransferázy, analýze N-terminálního řetězce aminokyselin a z této informace se pak odvodí kódový řetězec nukleotidů pro tuto část řetězce celého enzymu. Na základě této informace je pak možno zkonstruovat sondy, které budou hybridizovat na celý kódový řetězec, což umožní jeho izolaci.

40 Transformace kmene *Penicillium chrysogenum*

Jakmile jsou získány kódové fragmenty DNA pro enzymy expandázu/hydroxylázu, expandázu a hydroxylázu a také pro acetyltransferázu, je možno tyto fragmenty uložit do plazmidu nebo do jiného vektoru pro expresi spolu s dalšími fragmenty DNA, které obsahují řetězce promotoru, řetězce pro aktivaci translace, řetězce pro odolnost jako značící řetězce, řídicí řetězce, řetězce pro tvorbu kosmidů a jakékoliv další řetězce DNA, které dovolují nebo mohou usnadnit transformaci a napomáhají expresi produktů genů nebo mohou usnadnit izolaci transformovaných buněk. Vektor pro expresi, který byl takto zkonstruován, je pak možno použít k transformaci kmene *Penicillium chrysogenum* a k nitrobuněčné expresi enzymů expandázy/hydroxylázy, expandázy, hydroxylázy a acetyltransferázy. Postupy, použité k dosažení transformace a exprese jsou v oboru dobře známy a podrobný popis typického postupu pro toto použití bude dále uveden.

Jak již bylo uvedeno svrchu, dochází u transformovaného kmene *Penicillium chrysogenum* k expresi enzymů expandázy/hydroxylázy, expandázy, hydroxylázy a acetyltransferázy uvnitř buněk a pak může *in situ* docházet v substrátu, kterým je adipoyl-6-APA k expanzi kruhu za

vzniku adipoyl-7-ADCA, tato látka je pak hydrolyzována na adipoyl-7-ADAC a tento produkt je pak acetylován za vzniku výsledné adipoyl-7-ACA.

Nový transformovaný mikroorganismus

5

Specifické transformanty *Penicillium chrysogenum*, u nichž dochází k expresi kódových genů pro enzymy expandázu/hydroxylázu a expandázu, hydroxylázu a acetyltransferázu, které tvoří výhodná provedení vynálezu, jsou nové, pokud jde srovnání s podobnými konstrukcemi, které byly již dříve popsány například v publikaci Cantwell a další, 1990, *Current Genetics*, 17, 213 – 221, a v EP-A 281 391 a EP-A 437 378. Při konstrukci podle Cantwella je gen pro expandázu ze *Streptomyces clavuligerus* uložen pod řízením promotoru *P. chrysogenum* pro izopenicilin-N-syntetázu, IPNS a tak se liší od konstrukce podle vynálezu tím, že chybí jakákoliv kódová DNA pro enzymy hydroxylázu nebo acetyltransferázu.

10

V EP-A 281 391 (Ingolia a další) se popisují vektory pro transformaci *P. chrysogenum*, které obsahují kódovou DNA pro bifunkční enzym expandázu/hydroxylázu *C. acremonium*, exprese se dosahuje při použití promotoru IPNS z *Penicillium*. V jedné z těchto konstrukcí, pP562, je gen pro expandázu/hydroxylázu napojen ve směru exprese genu a v rámci s genem pro hygromycin-fosfotransferázu. Produkt genu, kterým je složená bílkovina, hygromycin-fosfotransferáza spolu s expandázou/hydroxylázou je tedy zcela odlišný od produktu způsobu podle vynálezu, v němž je enzym expandáza/hydroxyláza v podstatě totožný s enzymem, produkovaným v *C. acremonium*. Další vektor, který byl popsán v EP-A 281 391 byl zkonstruován dlouhou sérií molekulových manipulací včetně použití syntetických spojovníků DNA. V konečné konstrukci, pP561 se využívá fragmentu *NcoI* o velikosti 1,2 kb z promotoru IPNS *Penicillium* k expresi genu pro expandázu/hydroxylázu a gen pro acetamidázu z *Aspergillus nidulans* se užívá jako značící gen pro selekci transformovaných buněk *Penicillium*. Řetězce kodonů 9 a 10 v genu pro expandázu/hydroxylázu, které jsou kódem pro arginin a leucin, jsou pozměněny na CGTCTC k CGCCTA, což nemění výsledný řetězec aminokyselin.

20

25

V konstrukci podle vynálezu je fragment promotoru IPNS po štěpení *NcoI* o velikosti 1,2 kb spojen s genem pro expandázu/hydroxylázu, aniž by přitom došlo ke změnám v přírodním řetězci genu pro expandázu/hydroxylázu. Promotor IPNS, použitý pro konstrukci podle vynálezu má dva opakující se řetězce čtyř bází ve srovnání s nativním promotorem, jeden z těchto řetězců se nachází v místě štěpení *Sall* 760 párů bází proti směru exprese kodonu ATG pro počátek, druhý z těchto řetězců se nachází v místě štěpení enzymem *XbaI* 5 párů bází proti směru exprese kodonu pro počátek v oblasti 5'-nepřenašeného vedoucího řetězce. Tyto změny nepůsobí žádné ovlivnění vysoké úrovně exprese genu pro expandázu/hydroxylázu.

35

Další rozdíl ve vektorech spočívá v genech použitých pro usnadnění příští selekce. Konstrukce, popsané v EP-A 281 391 používají k označení acetamidázu a hygromycin. To znamená velký rozdíl ve srovnání s vektorem pro transformaci *Penicillium* s obsahem genu pro expandázu a hydroxylázu, užívaným při provádění způsobu podle vynálezu, pPEN/CEPH-1, který obsahuje jako označení gen pro odolnost proti phleomycinu. Jeden z kmenů *Penicillium chrysogenum*, který byl transformován pomocí vektoru pPEN/CEPH-1 a byl schopen exprese genu pro expandázu/hydroxylázu byl označen PC200. Taxonomické vlastnosti tohoto kmenu typicky zahrnují tvorbu rozšiřujících se kolonií modro zelené až zelené želené barvy se sametovitým povrchem se žlutými kapkami, zadní strana kolonie je žlutá a kolonie difunduje do agarů, hlavy konidií jsou rozvětvené a všechny jejich části jsou hladké, konidie jsou vejčité až kulovité s délkou 3 až 4 mikrometry. Při pěstování *P. chrysogenum* je možno užít pevného prostředí, které obsahuje 1,5 % monohydratované laktózy, 0,5 % objemových kukuřičného výluhu, 0,5 % peptónu, 0,4 % chloridu sodného, 0,05 % síranu hořečnatého x 7H₂O, 0,6 % dihydrogen-fosforečnanu draselného, 0,0005 % chloridu železitého x 6H₂O, 0,0002 % síranu měďnatého x 5H₂O a 3,0 % agarů c 1 litru destilované vody o pH 4,8.

50

Není-li výslovně uvedeno jinak, jde vždy o procenta hmotnostní. Popsaný kmen *P. chrysogenum*, který byl označen jako PC200, byl uložen do veřejné sbírky kultur Americal Type Culture Collection, ATCC, 12301 Parklawb Drive, Rockville, Maryland 20852, pod číslem ATCC 74186, kmen byl uložen dne 23. září 1992.

5 Druhý nový transformovaný kmen *Penicillium chrysogenum* podle vynálezu, který je schopen produkce adipoyl-7-ACA je kmen, u něž dochází k expresi genu pro expandázu/hydroxylázu i pro acetyltransferázu po transformaci pomocí jediného vektoru pTS-8, který obsahuje kódovou DNA pro oba tyto enzymy. Uvedený vektor se však liší od vektorů pro transformaci *Penicillium*,
10 tak jak jsou uvedeny v EP-A 437 378, které obsahují kódovou DNA pouze pro acetyltransferázu *C. acremonium* nebo ve spojení s kódovým řetězcem DNA pro mutantu polypeptidu expandázy/hydroxylázy. V konstrukci pTS-8 jsou geny pro expresi expandázy/hydroxylázy a acetyltransferázy vždy pod působením oddělených kopií promotoru IPNS *P. chrysogenum* a třetí kopie promotoru IPNS je použita k uskutečnění transkripce genu pro odolnost proti phleomycinu, který je určen jako značení k usnadnění selekce.

V dalším možném provedení vynálezu je možno geny pro expandázu/hydroxylázu a pro acetyltransferázu uložit do oddělených vektorů a použít v hostitelském kmeni *Penicillium* postupně. Pořadí, v němž se ukládají kódové fragmenty DNA pro enzymy expandázu/hydroxylázu a pro acetyltransferázu je důležité pouze z praktického hlediska. S výhodou se
20 postupuje tak, že se nejprve uloží gen pro enzymy expandázu/hydroxylázu a pak se kmen *Penicillium* transformuje genem pro acetyltransferázu vzhledem k tomu, že jde o pořadí, v němž jednotlivé enzymy zpracovávají substrát in vivo. To znamená, že takto transformovaný organismus je pak nutno sledovat na expresi genu pro expandázu/hydroxylázu sledováním produkce adipoyl-7-ADAC. Tato sloučenina je pak substrátem pro enzym acetyltransferázu a expresi kódového genu pro acetyltransferázu, je tedy možno prokázat na základě produkce adipoyl-7-ACA. Při použití vhodné zkoušky in vitro na acetyltransferázu je možno transformovat kmen *Penicillium* nejprve genem pro acetyltransferázu, expresi tohoto genu prokázat zkouškou in vitro a pak teprve uložit gen pro expandázu/hydroxylázu. Každý z obou
30 uvedených postupů tedy představuje vhodné provedení způsobu podle vynálezu pro přípravu 7-ACA.

Ve výhodném provedení však je možno uložit kódové řetězce pro všechny tři enzymy současně s použitím konstrukce jediného vektoru ve formě plazmidu, který obsahuje kódové řetězce jak
35 pro expandázu/hydroxylázu, tak pro acetyltransferázu *C. acremonium*. Kmen *Penicillium chrysogenum*, transformovaný takovým vektorem ve formě plazmidu, označeným jako vektor pTS-8 byl identifikován jako PC300. U tohoto kmenu dochází jak k expresi genu pro expandázu/hydroxylázu, tak k expresi genu pro acetyltransferázu. Taxonomické vlastnosti tohoto kmene jsou obdobné jako vlastnosti svrchu uvedeného kmene PC200. Přijatelné podmínky pěstování pro PC300 jsou stejné jako podmínky, které byly svrchu uvedeny pro pěstování PC200.
40 Kmen *P. chrysogenum*, označený PC300, byl uložen do veřejné sbírky kultur American Type Culture Collection ATCC, 12301 Parklawb Drive, Rockville, Maryland 20852 pod číslem ATCC 74187, kmen byl uložen 23. září 1992.

45 Specifický kmen *Penicillium chrysogenum* transformovaný vektorem pPenFTSO pro expresi genu pro expandázu *S. clavuligerus*, který představuje výhodné provedení vynálezu, je nový ve srovnání s dříve popsánými konstrukcemi, tak jak byly popsány například v publikaci Cantwell a další, 1990, Current Genetic., 17, 213 – 221. V obou konstrukcích se užívá vyvolání mutace in vitro pro spojení promotoru s genem pro expandázu. V Cantwellově konstrukci dochází při
50 manipulaci k zavedení místa působení pro NdeI v kodonu ATG genu pro expandázu, který je navázán na místo působení XbaI na 3'-zakončení promotoru IPNS při použití spojovníku XbaI/NdeI. V konstrukci podle vynálezu je vytvořeno místo působení NcoI v kodonu ATG genu pro expandázu s vazbou na místo působení NcoI na 3'-zakončení spojovníku IPNS. Tímto způsobem dochází k vytvoření následujících řetězců, sousedících v těchto konstrukcích s místem spojení příslušného promotoru a genu:

	Xbal	Ncol	
IPNS promotor	5'	TCTAGACACATGG 3'	řetězec č. 1
Strep. expandáza	5'	GTGAGAGTTGATGGAC 3'	řetězec č. 2
5 Cantwell	5'	TCTAGACACTATGGAC 3'	řetězec č. 3
podle vynálezu	5'	TCTAGACACCATGGAC 3'	řetězec č. 4

10 V Cantwellově konstrukci je jeden zbytek C nahrazen zbytkem T, zatímco při konstrukci podle vynálezu je uvedený zbytek C zachován. To znamená, že řetězec promotoru IPNS, který bezprostředně sousedí s kodonem ATG pro počátek přesně odpovídá řetězci v přírodním genu IPNS. Je možné, že promotor, který byl dříve používán, přestože se lišil pouze jedinou nukleotidovou bází, mohl vést k nižší účinnosti translace a v důsledku toho i k nižší úrovni exprese genu pro expandázu.

15 Další rozdíly je možno nalézt v oblasti promotoru nebo genu, který je do konstrukce uložen. Cantwellova konstrukce obsahuje oblast 5' BamHI až Xbal 3' promotoru IPNS, zatímco vektor podle vynálezu obsahuje oblast 5' Ncol až Ncol 3' podle Diez a další, 1990, J. Biol. Chem., 265, 16358 až 16365. To znamená, že se v Cantwellově konstrukci nachází na 5'-zakončení promotoru IPNS přibližně 250 přídavných bází. Tato oblast se však nachází v otevřeném čtecím
20 rámci genů pro syntetázu ACV proti směru translace genu IPNS.

Cantwellova konstrukce obsahuje také gen ze *Streptomyces* od ATG do místa BamHI 3' genu, zatímco vektor podle vynálezu obsahuje ATG v bezprostředním sousedství místa Sall 3' genu podle Kovacevic a další, 1989, J. Bacteriol., 171, 754 – 760. To znamená, že Cantwellova
25 konstrukce obsahuje na 3'-zakončení řetězce přibližně 1000 párů bází navíc. Konstrukce podle vynálezu stále ještě obsahuje oblast genu pro expandázu proti směru jeho translace v sousedství místa BamHI 5' ATG, tato oblast je však oddělena od čtecího rámce genu pro expandázu promotorem IPNS.

30 Další rozdíl v konstrukci pPenFTSO podle vynálezu ve srovnání se známými konstrukcemi se týká použitého označení pro selekci. Použití promotoru IPNS z *Penicillium* a spojení s genem pro odolnost proti phleomycinu v konstrukci podle vynálezu dovoluje selekci na integraci mnohočetných kopií nebo integraci v místech, které dovolují vysokou úroveň exprese, takže může vzniknout větší počet transformovaných buněk, u nichž dochází k vysoké úrovni exprese
35 genu pro expandázu.

Odštěpení adipoylového postranního řetězce

40 Posledním stupněm nového biologického postupu podle vynálezu je odštěpení adipoylového postranního řetězce z adipoyl-7-ADAC nebo z adipoyl-7-ACA, tento postup znamená nutnost zpracování produktu z předchozích stupňů enzymem adipoylamidázou. Jak již bylo svrchu uvedeno, je jednou z podstatných výhod způsobu podle vynálezu možnost uskutečnit všechny stupně, vedoucí ke tvorbě adipoyl-7-ADAC a adipoyl-7-ACA v jediné fermentační kultuře. Tímto způsobem je možno dosáhnout výjimečně vysoké účinnosti vzhledem k tomu, že není
45 nutné izolovat a částečně čistit meziprodukty stupeň od stupně. V posledním stupni však není přítomen enzym adipoylamidáza vzhledem k tomu, že nebyl vytvořen in situ v původní fermentační kultuře přírodní ani rekombinantní exprese genů *P. chrysogenum*.

50 V případě, že nový biologický postup podle vynálezu je prováděn po vsázkách, bude nezbytné izolovat a částečně čistit produkt z prvního stupně, svrchu již byly popsány předběžné postupy k tomuto účelu.

Způsob podle vynálezu je však možno provádět jakýmkoliv způsobem, při němž se účinně dostává do styku adipoylamidáza s adipoyl-7-ADAC nebo adipoyl-7-ACA tak, že může dojít

k enzymatické přeměně této sloučeniny na 7-ADAC nebo 7-ACA. Jde tedy o „vedení do styku“ v nejširším smyslu. Je možné použít bezbuněčné živné prostředí s obsahem surových produktů adipoyl-7-ADAC nebo adipoyl-7-ACA a toto prostředí zpracovává po jednotlivých vsázkách pomocí surového prostředí s obsahem adipoylamidázy. Tento postup je poměrně účinný vzhledem k tomu, že nemusí být provedeno počáteční čištění reakčních složek. Jsou však možné určité modifikace. Je například možno reakční složky předběžně čistit do jakéhokoli požadovaného stupně před vzájemným uvedením do styku. Je také možné provádět způsob kontinuálně a nikoliv po vsázkách. Vlastní styk reakčních složek může být modifikován různým způsobem k dosažení lepšího průběhu postupu. Je například možno použít imobilizovaný enzym, například ve formě sloupce, který obsahuje adipoylacylázu a pak je možno nechat procházet sloupcem adipoyl-7-ADAC nebo adipoyl-7-ACA. Imobilizovaný enzym je také možno přidat k roztoku adipoyl-7-ADAC nebo adipoyl-7-ACA ve formě suspenze. Imobilizovaný enzym poskytuje výhodu snadné zpětné izolace enzymu a jeho opakovaného použití. Dalším příkladem technologie může být reaktor, opatřený membránou. Nejvýhodnějším postupem pro styk s reakčními složkami je však sloupec s imobilizovaným enzymem.

Adipoylamidázy, vhodné pro štěpení

Existuje řada enzymů se známou specifičností pro adipoylové postranní řetězce. V následujících příkladech budou uvedeny výsledky, které byly získány s běžně dodávanými adipoylamidázami (RAEV Corp.). V literatuře se uvádí ještě sedm dalších enzymů, schopných odstranit adipoylové postranní řetězce z molekul cefalosporinového typu. Šest z těchto sedmi enzymů je z čeledi *Pseudomonas* a sedmý z čeledi *Bacillus*. Mezi enzymy z *Pseudomonas* jsou některé podobnosti, všechny se však fyzikálně/biologicky poněkud liší. Dále budou uvedeny některé jejich vlastnosti.

Enzym (kmeny <i>Pseudomonas</i> a <i>Bacillus</i>)	Literární údaj	Přibližná mol hmotnost (podjednotka)
P. SY-77-1 (Toyo Jozo)	Shibuya a další, (1981)	jeví se stejná jako pro GK16
P. GK 16 (Asahi)	Matsuda, Komatsu (1985)	16 000 54 000
P. SE83 (acyl) (Asahi)	Matsuda a další (1987)	38 200 19 900
P. SE83 (acyll) (Asahi)	Matsuda a další, (1987)	25 400 58 200
P. diminuta N176 (Fujisawa)	Aramori a další, (1991a) ^x	58 000 26 000
P. diminuta V22 (Fujisawa)	Aramori a další, (1991a) ^x	? ?
<i>Bacillus lapterosporus</i> J1 (Fujisawa)	Aramori a další, (1991b) ^{xx}	70 000 (monomerní)
<i>Pseudomonas</i> sp. (RAEV Corp.)	—	16 000 54 000

^x Aramori a další, J. Ferment. Bioeng., 1991, 72: 232–243

^{xx} Aramori a další, J. Bacteriol., 1991, 173: 7848–7855.

Všechny uvedené adipoylamidázy je možno použít při novém biologickém postupu podle vynálezu.

Další adipoylamidázy, použitelné při provádění způsobu podle vynálezu je možno snadno zjistit tak, že se případné enzymy zkouší na adipoyl-7-ACA a adipoyl-7-ADAC jako na substrátu. Pozitivní výsledek je tedy průkazem, že uvedený enzym je skutečně možno při provádění způsobu podle vynálezu použít. Substrát je možno připravit reakcí anhydridu kyseliny adipové se

7-ACA při použití modifikace podle publikace Szewczuk a Wellman-Bednawska, Clin. Chim. Acta, 1978, 84, 19 až 26. Je také možno upravit postup, popsany v Agric. Biol. Chem., 1981, 45(7), 1561 – 1567 pro přípravu glutaryl-7-ACA- Anhydrid kyseliny adipové je možno připravit podle publikace Albertson a Lundmark, J. Macromol. Sci. Chem., 1990, A27, 397 – 412. Substrát 7-ACA je dostupný z řady běžných zdrojů včetně Sigma Chemical Co.

V případě, že je zapotřebí rychle sériově vyšetřit řadu enzymů při použití kolorimetrických postupů, je možno místo adipoyl-7-ACA použít kolorimetrický substrát, například adipoyl-PABA, kyselinu paraaminobenzoovou nebo adipoyl-pNA, paranitroanilin. Postup je pak možno upravit podle postupu, popsaného pro gamma-glutamyl PABA v publikaci Szewczuk a další, Clinica Chimica Acta, 84, 1978, 19 – 26. Odštěpením postranního řetězce vzniká zbarvení, jehož přítomnost a koncentraci je možno snadno stanovit při použití kolorimetru.

Podrobnější informace o této metodě i o dalších vhodných postupech je možno nalézt v publikacích Marelli L. P., 1968, J. Pharm. Sci., 57: 2172 – 2173, Szasz G., 1969, Clin. Chem., 15, 124 – 136, Szewczuk A. a další, 1980, Anal. Biochem. 103, 166 – 169 a Reyes F. a další, 1989, J. Pharma. Pharmacol., 41, 136 – 137.

Bylo provedeno srovnání N-terminálního řetězce aminokyselin v enzymu RAEV s velkými podjednotkami enzymů acyll a GK16 ze svrchu uvedené tabulky. Výsledky tohoto srovnání jsou dále uvedeny, přičemž zbytky v závorkách označují zbytky, které pravděpodobně nejsou rozhodující.

RAEV – řetězec č. 5:
(S) N (S) (G) A V A P G K T A N G N A L (L) L Q N (P)

GK16 – řetězec č. 6:
S N S W A V A P G K T A N G N A L L L Q N P

acyll – řetězec č. 7:
S N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D P

Ze svrchu uvedených řetězců je zřejmé, že všechny tři peptidy jsou příbuzné. Avšak bílkovina s N-terminálním řetězcem, podobným uvedeným řetězcům nemusí mít nezbytně účinnost adipoylamidázy, tak, jak tomu je v případě acylázy penicillinu G, která je produkována kmenem Arhtrobacter. Na druhé straně existují adipoylamidázy, použitelné při provádění způsobu podle vynálezu, u nichž nelze prokázat významnou homologii se svrchu uvedenými N-terminálními řetězci. Například acylázy acyl (Asahi) a B. laterosporus JI (Fujisawa) ze svrchu uvedené tabulky, které mají určitou účinnost při odštěpení adipoylového řetězce za adipoyl-7-ACA, nemají žádnou homologii řetězce s ostatními uvedenými enzymy. Je tedy zřejmé, že při provádění způsobu podle vynálezu je použitelnost adipoylamidázy v posledním stupni nového postupu určována pouze tím, zda enzym je schopen odštěpit adipoylový postranní řetězec z adipoyl-7-ACA, což je možno snadno uskutečnit, jak již bylo svrchu uvedeno.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Podmínky pěstování Penicillium chrysogenum

Kmeny *Penicillium chrysogenum*, použité při těchto postupech byly udržovány na plotnách, obsahujících prostředí LCSB, které obsahovalo 1,5 % monohydratované laktózy, 0,5 % objemových kukuřičného výluhu, 0,5 % peptonu, 0,4 % chloridu sodného, 0,05 % síranu hořečnatého x 7H₂O, 0,06 % dihydrogen, fosforečnanu draselného, 0,0005 % chloridu železitého x 6H₂O, 0,0002 % síranu měďnatého x 5H₂O, a 3,0 % agaru v 1 litru destilované vody o pH 4,8.

Všechny procentuální údaje jsou hmotnostní, není-li uvedeno jinak. Po 12 dnech pěstování při teplotě 25 °C při relativní vlhkosti 65 % byly jednotlivé kolonie odděleny a přidány do 2 ml sterilizované vody ve zkumavce se šroubovacím víčkem, obsahující skleněné kuličky. Po rozrušení kultury homogenizací byla suspenze použita k naočkování tak zvaných rýžových lahví.

Tyto lahve obsahovaly při objemu 250 ml celkem 25 g přírodní dlouhozrnné rýže Uncle Ben's, která byla předem 7 minut promývána třemi až čtyřmi objemy destilované vody za promíchávání každých 30 sekund a pak byla uložena na síto na tak dlouho, až voda, zadržená v rýži představovala přibližně 25 %. Po 12 dnech při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 65 % byly spóry z rýže vymyty při použití 50 ml sterilní vody. Suspenze spór pak byla použita k naočkování kapalných kultur a část kultury byla rovněž lyofilizována a pak skladována při teplotě 4 °C. Postup byl uskutečněn tak, že spory byly smíseny se stejným objemem 5% odstředěného mléka a směs byla lyofilizována ve sterilních ampulích.

Pro produkci penicilinů nebo pro produkci mycelia jako zdroje RNA nebo DNA, byla užita fermentace kmene ve dvou stupních v třepacích lahvích. Očkovací stupeň byl zahájen přidáním 1 x 10⁸ spor do lahve s objemem 500 ml, obsahující 50 ml živného prostředí, obsahujícího 3,0 % glukózy, 1,0 % pharmamedia, 3,0 % objemových kukuřičného výluhu, 0,2 % síranu amonného, 0,5 % uhličitanu vápenatého, 0,05 % bezvodého dihydrogenfosfátu draselného, 1,0 % laktózy a 1,0 % primárních sušených kvasnic v 1 litru destilované vody. Všechny procentuální údaje jsou hmotnostní, není-li uvedeno jinak. Směs byla inkubována při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 65 % na rotační třepače s výkyvem 70 mm při 220 ot/min. Po 48 hodinách inkubace bylo zahájeno produkční pěstování přenesením 2 ml vegetativního očkovacího materiálu do lahve s objemem 500 ml a s obsahem 35 ml živného prostředí s následujícím složením: 0,05 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 % síranu draselného, 1,0 % síranu amonného, 12,0 % laktózy, 2,75 % pharmamedia, 1,0 % sráženého uhličitanu vápenatého, 1,0 % objemových oleje v 1 litru destilované vody o pH 6,6. Všechny procentuální údaje jsou hmotnostní, není-li uvedeno jinak. Po sterilizaci v autoklávu, avšak před naočkováním byl přidán ještě sterilní 25% adipát sodný při pH 6,6 tak, aby konečná koncentrace adipátu sodného byla 2,5 % hmotnostních. Pak byla kultura inkubována za stejných podmínek jako očkovací kultura 5 až 7 dnů.

V případě, že má být získáno mycelium a protoplasty pro transformaci nebo jako zdroje DNA, je vhodné kmen pěstovat v lahvích s objemem 250 ml s obsahem 50 ml úplného prostředí CM se složením: 50 ml 20x Clutterbuckových solí (120 g Na₂NO₃, 10,4 g KCl, 10,4 g MgSO₄ x 7H₂O, 30,4 g KH₂PO₄), 2,0 ml Vogelových stopových prvků (0,3 M kyselina citronová, 0,2 M ZnSO₄, 25 mM Fe(NH₄)₂ x 6H₂O, 10 mM CuSO₄, 3 mM MnSO₄, 8 mM kyseliny borité a 2 mM Na₂MoO₄ x 2H₂O), 5 g tryptonu, 5 g extraktu z kvasnic a 10 g glukózy v 1 litru destilované vody. Kultura byla inkubována při teplotě 25 °C na rotační třepače při 220 ot/min.

45 Příklad 2

Pěstování *Cephalosporium acremonium*

Kmeny *C. acremonium* byly udržovány na šikmém agaru, který obsahoval úplně živné prostředí se složením: 20 g sacharózy, 20 g agaru, 4 g peptonu, 4 g extraktu z kvasnic, 3 g dusičnanu sodného, 0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g chloridu draselného, 0,5 g síranu hořečnatého x 7H₂O, 0,01 g síranu železnatého x 7H₂O v 1 litru destilované vody o pH 6,6. Po 10 dnech růstu při teplotě 28 °C a relativní vlhkosti 66 % bylo k šikmému agaru přidáno 6 ml sterilizované vody a kultura byla s povrchu agaru seškrabána.

Výsledná suspenze byla přenesena do sterilní zkumavky se šroubovacím uzávěrem, obsahující

skleněné kuličky. Po homogenizaci několik minut bylo 3,5 ml výsledné suspenze použito k naočkování kapalných kultur. Suspenze byla také užita k získání lyofilizované kultury pro skladování při teplotě 4 °C. Suspenze kultury přitom byla odstředěna, usazenina byla znovu uvedena do suspenze v 5% odstředěném mléce a podíly získané suspenze byly lyofilizovány ve sterilních ampulích.

Pro produkci cefalosporinu a také pro produkci mycelia jako zdroje DNA a RNA byla užita fermentace kmenů ve dvou stupních v třepacích lahvích. Očkovací kultura byla založena přidáním očkovacího materiálu do lahví s objemem 250 ml, obsahujících 15 ml živního prostředí s následujícím složením: 5 g glukózy, 40 g sacharózy, 30 g kukuřičného škrobu, 50 g řepné melasy, 65 g sojové mouky, 15,8 g síranu vápenatého $\times 2\text{H}_2\text{O}$, 8 g octanu amonného, 5 g sráženého uhličitanu vápenatého, 7,5 g síranu amonného, 3,5 g síranu hořečnatého $\times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g dihydrogenfosforečnanu draselného, a 0,15 ml sojového oleje v 1 litru destilované vody při pH 6,2. Kultura byla inkubována při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti 65 % na rotační třepačce s výkyvem 70 mm při 220 ot/min. Po 96 hodinách inkubace byla zahájena produkční kultura přenesením 2 ml vegetativního očkovacího materiálu do lahve s objemem 250 ml a s obsahem 15 ml čerstvého svrchu uvedeného živního prostředí. Inkubace pak byla prováděna dalších 96 hodin za stejných podmínek.

V případě, že je zapotřebí získat mycelium jako zdroj DNA pro transformaci, je možno kmeny pěstovat v lahvi s objemem 500 ml a s obsahem 100 ml úplného živního prostředí, které obsahuje 20 g glycerolu, 4 g peptónu, 4 g extraktu z kvasnic, 0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g chloridu draselného, 1 g síranu hořečnatého $\times 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g dusičnanu sodného a 0,01 g síranu železnatého $\times 7\text{H}_2\text{O}$ v 1 litru destilované vody. Kultura se pěstuje při teplotě 30 °C na rotační třepačce při 200 ot/min.

Příklad 3

30 Izolace DNA genomu a celkové RNA *Penicillium* a *Cephalosporium*

Vegetativní mycelium z kultury, připravené svrchu uvedeným způsobem a pěstované 48 hodin bylo odděleno filtrací přes mul, zmrazeno v kapalném dusíku a lyofilizováno přes noc. Sušené mycelium se drtí spolu s pískem při použití moždíře a tlouhu a pak se znovu uvede do suspenze ve 25 ml 100 mM LiCl, 50 mM EDTA, 10 mM tris o pH 8,0 se 4 % SDS. Po zahřátí suspenze na teplotu 50 až 55 °C na vodní lázni s teplotou 60 °C se směs nejprve extrahuje při použití, 1M tris o pH 8, nasyceného fenolem a pak při použití tris, nasyceného směsí fenolu a chloroformu v objemovém poměru 1:1 a nakonec se směs extrahuje chloroformem. RNA se sráží z vodné fáze přidáním stejného objemu chladného 6 M LiCl a pak se nechá směs 2 až 3 hodiny při teplotě -20 °C. Po odstředění při 12 000 g celkem 20 minut při teplotě 4 °C se k supernatantu přidá do 66 % objemových ethanol a směs se 15 minut chladí na -20 °C k vysrážení DNA. Po odstředění stejným způsobem jako svrchu se usazenina DNA promyje 70% ethanolem, vysuší a znovu uvede do suspenze v pufru TE (10 mM tris-HCl o pH 7,5, 1 mM EDTA). Koncentrace DNA se stanoví srovnáním se známým standardem DNA při barvení ethidiumbromidem elektroforézou na agarózovém gelu.

Pro extrakci RNA se kultury *Penicillium chrysogenum* a *Cephalosporium acremonium*, popsané v příkladech 1 a 2, pěstují 96 hodin ve 35 ml fermentačního prostředí za svrchu uvedených podmínek při teplotě 25 °C na rotační třepačce při 220 ot/min. Mycelium se oddělí filtrací přes filtr Whatman 1 za sníženého tlaku a promyje se přibližně 50 ml vody. Pak se mycelium okamžitě sejme z filtru, znovu se uvede do suspenze v 5 ml pufru pro rozrušení buněk (50 mM tris-HCl o pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA o pH 8,0 a 5 % SDS), zmrazí se v kapalném dusíku a lyofilizuje. Po lyofilizaci přes noc se přidá 5 ml vody, obsahující 0,1 % DEPC a 5 ml směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu 50:50:1 s 1 M tris o pH 8 a směs se nechá 20 minut za protřepávání tát při teplotě 37 °C. Pak se směs odstředí při 12 000 x g

10 minut při teplotě 4 °C vodná vrstva se oddělí a znovu extrahuje nejprve při použití směsi fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu, 50:50:1 s 1 M tris o pH 8 a pak fenolem, nasyceným 1 M tris o pH 8 a nakonec chloroformem. Ke konečné vodné vrstvě se přidá stejný objem 6 M LiCl a roztok se nechá stát nejméně 4 hodiny při teplotě 20 °C. Celková RNA se odstředí při 12 000 g celkem 20 minut při teplotě 4 °C a usazenina se rozpustí v 0,3 ml pufru TE s 0,03 ml 3 M octanu sodného a pak se přidá 2,5 objemu ethanolu k opětovnému vysrážení RNA. Konečná usazenina se rozpustí v 0,1 ml pufru TE a koncentrace RNA se stanoví spektrofotometricky při využití absorpce při 260 nm.

10

Příklad 4

Konstrukce genové banky *Cephalosporium acremonium* a izolace genů pro expandázu/hydroxylázu a pro acetyltransferázu z *C. acremonium*

15

Izolace genu pro expandázu/hydroxylázu *C. acremonium*

DNA genomu *C. acremonium* byla částečně rozštěpena pomocí enzymu Sau3AI za vzniku průměrné velikosti fragmentu 10 až 20 kb, rozštěpený materiál byl odstředěn při použití hustotního gradientu s obsahem 5 až 20 % chloridu sodného. DNA *C. acremonium* přes vazbu do místa působení BamHI vektoru lambda 2001, uložení do částic fágu při použití Gigapak (Stratagene) s následnou infekcí *E. coli*. Výsledné plaky byly přeneseny na nitrocelulosu a sériově vyšetřeny hybridizací s komplementární oligonukleotidovou sondou na 3'-zakončení známého řetězce genu pro expandázu/hydroxylázu (Samson a další, 1987). Sonda byla koncově označena pomocí (τ - ^{32}P /ATP při použití T4-polynukleotidkinázy. Positivní klony byly izolovány, byla zkonstruována mapa působení restričních endonukleáz a orientace genu byla určena hybridizací Southern blot při použití svrchu uvedeného oligonukleotidu a dalšího oligonukleotidu s řetězcem, komplementárním k 5'-zakončení genu.

30

Izolace genu pro acetyltransferázu z *C. acremonium*

Přestože nejde o postup, použitý pro izolaci genu pro acetyltransferázu pro konstrukci vektoru, popsaného v příkladech 11 a 12, je možno použít následující postup s použitím známé DNA. Postupuje se tak, že se z genomové banky *C. acremonium*, připravené svrchu uvedeným způsobem vybere klon, obsahující kód pro acetyltransferázu na základě hybridizace s použitím syntetických oligonukleotidových sond, komplementárních k řetězci pro acetyltransferázu způsobem podle publikace Matsuda a další, 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun., 182, 995 – 1001.

40

Příklad 5

Podmínky pěstování *Streptomyces clavuligerus*

K pěstování byl použit *Streptomyces clavuligerus* kmen ATCC 27064. Tento kmen byl udržován na plotnách, které obsahovaly 4 g extraktu z kvasnic, 10 g sladového extraktu, 4 g glukózy, 20 g agarů v 1 litru destilované vody o pH 7,2. Po pěti dnech růstu při teplotě 30 °C byly k plotnám přidány 2 ml sterilní vody a kultury byly seškrábány s povrchu agarů. Výsledná suspenze byla přenesena do sterilních zkumavek se šroubovacími uzávěry, obsahujících skleněné kuličky. Po homogenizaci kultury míchání byla suspenze použita k naočkování kapalného živného prostředí. Suspenze byla užita také k uskladnění při teplotě -70 °C po přidání glycerolu do 15 % konečného objemu.

55

V případě, že bylo zapotřebí získat mycelia pro přípravu protoplastů pro transformaci nebo jako zdroj DNA, byly kmeny pěstovány v lahvích s objemem 1 litr s obsahem 200 ml živného

prostředí YEME, které obsahuje 3 g extraktu z kvasnic, 5 g peptonu, 3 g sladového extraktu, 10 g glukózy, 340 g sacharózy, 1,02 g chloridu hořečnatého $\times 6H_2O$, 5 g glycinu, 18 g agaru v 1 litru destilované vody. Kultura se inkubuje při teplotě 28 °C na rotační třepačce při 220 ot/min.

5

Příklad 6

Izolace DNA genomu *Streptomyces*

- 10 Vegetativní kultura po pěstování svrchu uvedené kultury 48 hodin se odstředí při 22 100 g celkem 10 minut. Buněčný materiál se znovu uvede do suspenze v 10 ml pufru TE, přidá se 10 mg lysozymu a směs se inkubuje 15 minut při teplotě 30 °C. Pak se přidá 1 ml 20% SDS a pak ihned ještě 10 ml fenolu, nasyceného TE o pH 8 a 1,5 ml 5 M roztoku chloridu sodného a směs se 20 minut opatrně míchá převrácením. Fáze se oddělí odstředěním při 12 000 g po dobu 15 10 minut, pak se vodná vrstva oddělí a přenesou do čerstvé zkumavky. Přidá se stejný objem chloroformu a směs se 10 minut opatrně míchá převrácením zkumavky. Pak se fáze opět oddělí odstředěním 10 minut při 12 000 g, vodná vrstva se oddělí a přenesou se do čisté zkumavky. Opatrně se přidají dva objemy izopropanolu a vysrážená DNA se znovu rozpustí v co nejmenším objemu pufru TE. Pak se přidá RNA-áza A do konečné koncentrace 20 mikrogramů/ml a roztok se 1 hodinu inkubuje při teplotě 50 °C. Pak se přidá proteáza K do konečné koncentrace 20 20 mikrogramů/ml spolu se 100 mM NaCl a 0,4% SDS, a směs se inkubuje další hodinu při teplotě 37 °C. Roztok se pak znovu extrahuje stejným objemem fenolu, nasyceného TE o pH 8 a znovu se extrahuje chloroformem. DNA se oddělí po přidání dvou objemů izopropanolu a koncentrace se stanoví spektrofotometricky při odečtení absorpce při 260 nm.

25

Příklad 7

- 30 Konstrukce genové banky a izolace fragmentů DNA, obsahujících geny pro expandázu a hydroxylázu *Streptomyces clavuligerus*

Izolace genu pro expandázu *S. clavuligerus*

- 35 DNA genomu *Streptomyces clavuligerus*, získaná svrchu uvedeným způsobem se rozštěpí restrikčními enzymy BamHI Sall. Rozštěpená DNA se podrobí elektroforéze na 0,8% agarózovém gelu a fragmenty o velikosti 1,8 až 2,2 kb se vymyjí a naváží na DNA pUC18, předem rozštěpenou týmiž enzymy. Zředění podíly získané směsí po vazbě se užijí k transformaci buněk. JM109 při použití otevření pórů elektrickým proudem při použití zařízení Gene Pulser (Bio-Rad, Richmond, CA). Příprava buněk a otevření pórů elektrickým proudem se 40 provádí podle doporučení výrobce. Transformovaný materiál se nanese na plotny LB, obsahující 100 mikrogramů/ml ampicilinu a 75 mikrolitrů 2% X-Gal. Po inkubaci přes noc při teplotě 37 °C se rekombinantní kolonie inkubují podle svého bezbarvého vzhledu vzhledem k inaktivaci genu pro beta-galaktósidázu ve vektoru. Bezbarvé kolonie se přenesou na čerstvou plotnu s prostředím LB s obsahem 100 mikrogramů/ml ampicilinu. Po pěstování přes noc při teplotě 37 °C se kolonie 45 přenesou na nitrocelulosu a hybridizují při použití sondy, získané pomocí PCR-reakce, odpovídající řetězci známého genu pro expandázu *Streptomyces clavuligerus*, báze 52 až 918 podle publikace Kovacevic a další, 1989, J. Bacteriol., 171, 754 – 760 a podle US 5 070 020 (Ingolia a další). Značení reakčního produktu PCR-reakce je možno uskutečnit extensí statistickým primerem při použití 32P dCTP a zkušebního balíčku Oligolabelling Kit, podle 50 návodu výrobce (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Hybridizační reakce se provádí v přítomnosti radioaktivně značené sondy (106 impulsů za minutu), 30% formamidu, 5x SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M citronanu sodného o pH 7), 0,1 % SDS, 5x Denhardt (5 g ficoll, 5 g polyvinylpyrrolidonu a 5g BSA na 500 ml 50x zásobního roztoku) a 100 mikrogramů/ml DNA z telecího brzlíku přes noc při teplotě 37 °C. Několik transformovaných kolonií silně 55 hybridizovalo se sondou. Bylo potvrzeno, že jedna z kolonií obsahuje vektor, nesoucí gen pro

expandázu, analýza byla prováděna pomocí restrikčních enzymů. Zjištěný plazmid byl označen pFTSO-1.

Izolace genu pro hydroxylázu *S. clavuligerus*

5 DNA genomu *Streptomyces clavuligerus* byla částečně rozštěpena enzymem BamHI a navázána na vektor lambda Dash II (Stratagene). Výsledná genomová banka byla sériově sledována hybridizací na oligonukleotid, obsahující 30 bází, s totožným řetězcem, jako prvních 30 bází známého řetězce genu pro hydroxylázu z publikace Kovacevic a Miller, 1991, J. Bact., 173:398.
10 Po provedení hybridizace Southern blot při použití DNA ze dvou pozitivních klonů fágu po rozštěpení enzymem BamHI byl získán očekávaný fragment o velikosti 6 kb, který byl subklonován. Z tohoto subklonu byla získána po rozštěpení enzymem KpnI řada fragmentů v souladu se zveřejněnou mapou působení restrikčních enzymů pro gen pro hydroxylázu podle Kovacevic a Miller, 1991.

Příklad 8

Izolace DNA plazmidu

20 Kultury *Escherichia coli*, obsahující požadovaný plazmid, byly pěstovány v 500 ml prostředí LB s obsahem 20 g/litr základu pro kapalně prostředí LB (Gibco, Paisley, Skotsko) s obsahem 15 mikrogramů/ml tetracyklinu na rotační třepačce při 220 ot/min 12 až 16 hodin při teplotě 37 °C. Buňky byly odděleny odstředěním při 4000 g celkem 10 minut při 4 °C. Usazenina buněk
25 byla znovu uvedena do suspenze v 18 ml pufru s glukózou (50 mM glukózy, 25 mM tris o pH 8,0 a 10 mM EDTA) a 2 ml 40 mg/ml lysozymu (Sigma, St. Louis, MO) v glukózovém pufru, po smísení byla směs 15 minut inkubována při teplotě místnosti. Pak bylo přidáno 40 ml čerstvě připraveného roztoku 0,2 N NaOH, 1 % SDS, směs byla opatrně promíchána a uložena na 10 minut do ledu. Pak bylo přidáno 30 ml 5 M octanu draselného o pH 4,8 a po promíchání byla
30 směs uložena ještě na 10 minut do ledu. Buněčná drť pak byla usazena odstředěním při 4000 g na 10 minut při 4 °C a výsledný supernatant byl zfiltrován přes vrstvu mulu. K vyčištění supernatantu bylo přidáno 0,6 objemu izopropanolu k vysrážení DNA plazmidu, sraženina se tvořila 20 minut v průběhu inkubace při teplotě místnosti. DNA plazmidu byla usazena odstředěním 20 minut při 4000 g při teplotě 4 °C, pak byla promyta 70% ethanolom a krátce
35 sušena. Usazenina pak byla znovu uvedena do suspenze v 9 ml pufru TE a pak bylo přidáno 10 g CsCl a 0,387 ml roztoku ethidiumbromidu s obsahem 10 mg/ml. Tento roztok byl odstředěn 24 hodin při 313 100 g. Výsledný pás plazmidu v gradientu chloridu cesného byl vizualizován pomocí ultrafialového světla, oddělen a ethidiumbromid byl odstraněn extrakcí butanolem, nasyceným vodou. Pak byl chlorid cesný odstraněn dialýzou proti pufru TE a nakonec byla DNA
40 koncentrována při použití PEG s molekulovou hmotností 8000. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky odečtením absorpce při 260 nm.

Příklad 9

Konstrukce vektoru pPenFTSO pro transformaci *Penicillium*

Uložení genu pro odolnost proti phleomycinu

50 Vektor pro transformaci *Penicillium* byl zkonstruován při použití genu pro odolnost proti phleomycinu jako dominantního označení pro příští selekci. Nejprve byl izolován fragment s velikostí 660 bp s obsahem genu pro odolnost proti phleomycinu (šlo o gen pro bílkovinu, která váže phleomycin z *Streptoalloteichus hindustanus*) a byla provedena jeho vazba na terminátor cytochromu C1 z kvasinek při použití plazmidu pUT713, rozštěpeného enzymy BamHI/BglII
55 (CAYLA, Toulouse Cedex, Francie), postup byl prováděn při použití elektroforézy s následnou

eluci z agarózového gelu. Izolovaný fragment byl uložen do místa štěpení BamHI vektoru pSELECT[®] 1 (Promega Corporation) a orientace genu byla ověřena analýzou restričními enzymy. Jediné místo působení HindIII výsledného plazmidu byla odstraněna rozštěpením enzymem HindIII, vyplněním vzniklých zakončení Klenowovou polymerázou a opětným navázáním. Pak byl uložen fragment Pst I s velikostí 550 bp a s obsahem lambda cos., který umožňuje použití vektoru pro tvorbu kosmidu v případě, že se použije pro uložení fragmenty s příslušnou velikostí. Tento vektor byl označen pSCP4.

DNA genomu *P. chrysogenum* byla částečně rozštěpena enzymem Sau3A a použita k přípravě banky fagu lambda EMBL3 jako vektoru. Klon, obsahující gen pro syntetázu izopenicilinu N, IPNS byl z banky izolován a užit pro přípravu řady subklonů, z nichž jeden obsahoval fragment o velikosti 3,6 kb z prvního místa působení BamHI proti směru translace genu IPNS až k prvnímu místu působení HindIII po směru translace tohoto genu. Jediné místo působení Sall v tomto subklonu bylo odstraněno rozštěpením Sall, vyplněním vzniklých zakončení Klenowovou polymerázou a opětným navázáním. Pak bylo obdobným způsobem odstraněno jediné místo působení XbaI rozštěpením pomocí XbaI, vyplněním míst a opětnou vazbou. Výsledný plazmid byl označen pSXF-1. Zkonstruovaný promotor IPNS byl na gelu izolován z plazmidu pSXF-1 jako fragment po štěpení enzymem NcoI o 1,2 kb a byl uložen do místa NcoI ve svrchu popsaném plazmidu pSCP4, Orientace, stanovená rozštěpením restričními enzymy byla zvolena tak, že promotor byl spojen s genem pro odolnost proti phleomycinu v místě kodonu ATG pro start. Tento plazmid byl označen pUTZ-2.

Uložení genu pro expandázu *S. clavuligerus*

Fragment o velikosti 1 645 kb, obsahující gen pro expandázu *Streptomyces clavuligerus* byl čištěn z materiálu, získaného z pFTSO-1, tak, jak byl svrchu popsán, enzymy BamHI a Sall, čištění bylo prováděno elektroforézou a eluci z 0,8% agarózového gelu. Izolovaný fragment byl uložen do vektoru pSELECT (Promega Corporation), rovněž rozštěpeného enzymy BamHI a Sall. Vzniklý vektor byl označen pFTSO-8. Nové místo působení NcoI bylo vytvořeno u kodonu ATG pro počátek genu pro expandázu cílenou mutagenézou pFTSO-8 při použití prostředku pro mutagenézu in vitro Altered Sites[®] (Promega Corporation). Mutace byla vyvolána podle návodu výrobce. Byl zkonstruován oligonukleotid, komplementární ke kódovému řetězci oblasti DNA u kodonu ATG pro počátek ze zveřejněného řetězce genu pro expandázu *Streptomyces*, tak jak byl popsán v publikaci Kovacevic a další, 1990, Journal of Bacteriology, 171, str. 3952 – 3958. Tento oligonukleotid byl syntetizován kyanoethylfosforemiditovým postupem při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacia), oligonukleotid měl následující řetězec:

řetězec č. 8:

3' CGAGAGGATCAGTGAGAGTCCATGGACACGACGG 5'

Vznik mutace byl potvrzen analýzou restričním enzymem. Pak byl izolován fragment NcoI o 1,2 kb z plazmidu pUTZ-2, obsahující konstrukci promotoru IPNS z *P. chrysogenum* pomocí restričního enzymu NcoI s následnou elektroforézou na agarózovém gelu. Oblast promotoru IPNS byla navázána do vektoru pFTSO-8 v novém místě působení NcoI, které bylo vytvořeno mutací na kodonu ATG pro počátek genu pro expandázu. Orientace promotoru vzhledem ke genu pro expandázu byla ověřena analýzou restričními enzymy. Kazeta, obsahující promotor IPNS a gen pro expandázu pak byla vyjmuta jako fragment BamHI/Sall a uložena do vektoru pUTZ-2 po jeho rozštěpení BamHI/Sall k jeho transformaci, šlo o svrchu uvedený vektor *Penicillium*. Konečná konstrukce byla označena pPenFTSO.

Příklad 10

Konstrukce vektoru pPEN/CEPH-1 pro transformaci *Penicillium*

Uložení promotorové oblasti IPNS

Oblast promotoru IPNS byla izolována z plazmidu pUTZ-2, popsaného v příkladu 9 rozštěpením enzymy XhoI/SmaI. Vektor pUTZ-2 byl rozštěpen enzymem BamHI a vzniklá zakončení byla vyplněna při použití dNTP a Klenowova fragmentu za vzniku vyplněných zakončení a pak byl materiál rozštěpen pomocí enzymu XhoI a izolované fragmenty promotoru IPNS po štěpení enzymy XhoI/SmaI byly uloženy do tohoto rozštěpeného vektoru, čímž vznikla konstrukce, obsahující dvě oblasti promotoru IPNS. Tento vektor byl označen pUTZ-7.

Uložení genu pro expandázu/hydroxylázu *C. acremonium*

Jedna z oblastí promotoru IPNS pak byla izolována elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu z plazmidu pUTZ-7 jako fragment po štěpení XhoI/XbaI a uložena do vektoru pBluescript II SK (Stratagene, La Jolla, CA) po jeho rozštěpení enzymy XhoI/XbaI. Tento vektor byl označen pIPNSp/blue.

Gen pro expandázu/hydroxylázu *Cephalosporium* byl izolován elektroforézou a elucí z agarózového gelu jako fragment s velikostí 1,6 kb po štěpení HindIII/XbaI z jednoho svrchu identifikovaného klonu genomu a byl uložen do místa HindIII/XbaI rozštěpeného vektoru pSELECT. Nové místo BspHI bylo vytvořeno v místě kodonu ATG genu pro expandázu/hydroxylázu cílenou mutací při použití systému pro tvorbu mutace in vitro, Altered SitesTM. (Promega Corporation). Mutace byla vytvořena podle instrukcí výrobce. Byl zkonstruován oligonukleotid, komplementární ke kódovému řetězci oblasti DNA v místě kodonu ATG pro počátek z uveřejněného řetězce genu pro expandázu/hydroxylázu *Cephalosporium acremonium* podle publikace Samson a další, Bio/Technology, sv. 5, listopad 1987. Oligonukleotid byl syntetizován při použití kyanoethylfosforamiditového postupu při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacia), oligonukleotid měl tento řetězec:

řetězec č. 9:

3' GTTTTGGTGTCTAGTAGTACTGAAGGTTCCAG 5'

Vznik mutace byl potvrzen analýzou pomocí restrikčních enzymů. Pak byl elektroforézou a elucí z agarózového gelu izolován gen pro expandázu/hydroxylázu *Cephalosporium acremonium* jako fragment BspHI/XbaI a byl uložen do vektoru pIPNSp/blue, rozštěpeného NcoI/XbaI, tak jak byl popsán v předchozích odstavcích. Tento vektor tedy nyní obsahoval promotor IPNS *Penicillium* v místě kodonu ATG genu pro expandázu/hydroxylázu *Cephalosporium acremonium*. Vektor byl označen pIPNSp/EXP/blue.

Tato kazeta s obsahem promotoru IPNS a genu pro expandázu/hydroxylázu byla částečně rozštěpena enzymem XhoI a úplně rozštěpena enzymem XbaI a fragment byl izolován elektroforézou a elucí z agarózového gelu a uložen do místa XhoI/XbaI rozštěpeného vektoru pUTZ-2, tak jak byl popsán svrchu, čímž vznikl výsledný vektor pro transformaci, pPEN/CEPH-1.

Příklad 11

Konstrukce vektoru pro transformaci *Penicillium* tak, aby došlo k expresi obou genů pro expandázu a pro hydroxylázu *S. clavuligerus*

Gen pro beta-tubulin *P. chrysogenum* byl klonován z banky genomu fágu lambda při použití genu pro beta-tubulin *Aspergillus niger* jako hybridizační sondy. Fragment o velikosti 2,0 kb po štěpení XbaI/HindIII, obsahující promotor pro beta-tubulin *Penicillium* byl uložen do místa XbaI/HindIII plazmidu pSELECT (Promega). Místo působení NcoI bylo vytvořeno v místě kodonu ATG pro počátek cílenou mutagenézí řetězce AAAATGCGT na řetězec ACCATGGGT.

Z výsledného vektoru byl na gelu izolován po štěpení BamHI/NcoI fragment o 1,4 kb, který byl uložen mezi místa BamHI a NcoI svrchu popsaného plazmidu pUTZ-2 za vzniku vektoru pCI-6. Z klonu genomu *P. chrysogenum* byl na gelu izolován fragment Sall o velikosti 5,1 kb, obsahující jak IPNS, tak gen pro acyltransferázu a tento fragment byl uložen do místa Sall plazmidu pUTZ-2 za vzniku plazmidu pUTZ-5. Z plazmidu pUTZ-5 byl izolován 3' terminátorový řetězec genu IPNS restrikcí enzymy BamHI a HindIII s následnou izolací fragmentu o velikosti 1,3 kb na gelu, fragment byl pak uložen mezi místa BamHI a HindIII svrchu popsaného plazmidu pCI-6 za vzniku plazmidu pCI-23. Jediné místo působení Sall v blízkosti místa BamHI v plazmidu pCI-13 bylo odstraněno restrikcí, vyplněním pomocí Klenowovy polymerázy a opětnou vazbou. Nové místo působení Sall bylo vytvořeno na druhé straně místa BamHI cílenou mutagenezou řetězce GGAAGACG za vzniku řetězce GGTCGACG. Pak byl z plazmidu odstraněn gen pro odolnost proti ampicilinu restrikcí enzymem PvuI, izolací většího fragmentu a opětnou vazbou za vzniku plazmidu pCI-15. Nakonec byla kazeta, obsahující promotor IPNS a gen pro expandázu izolována z plazmidu pPENFTSO na gelu jako fragment o velikosti 2,4 kb po štěpení BamHI/Sall a kazeta byla uložena do plazmidu pCI-15 za vzniku plazmidu pEXP-1.

Konstrukce vektoru pro expresi obou genů, genu pro hydroxylázu i genu pro expandázu *S. clavuligerus*, zahrnuje následující stupně. Fragment o velikosti 2,9 kb po štěpení Kpn T, obsahující gen pro hydroxylázu se subklonuje v plazmidu pSELECT tak, že místo EcoRI v polyspojovníku se nachází směrem 5' v bezprostřední blízkosti genu. Jediné místo NcoI v plazmidu se odstraní cílenou mutagenezí řetězce TCCATGGGC za vzniku řetězce TCGATGGGC a současně se vytvoří v místě kodonu pro počátek nové místo působení NcoI změnou řetězce AACATGGC na řetězec ACCATGGC. Obě změny uchovávají výsledný řetězec aminokyselin. Fragment o velikosti 1,0 kb po štěpení AcoRI/NcoI, obsahující zkonstruovaný promotor IPNS se izoluje na gelu z plazmidu pUTZ-2 a uloží mezi místa působení EcoRI a NcoI svrchu uvedeného vektoru, obsahujícího pozměněný gen pro hydroxylázu. Pak se jediné místo působení EcoRI ve výsledném vektoru změní na místo působení HindIII cílenou mutagenezí. Konstrukce, obsahující spojený gen pro hydroxylázu a 5'-IPNS se z výsledného vektoru izoluje jako fragment po působení enzymu HindIII a tento fragment se uloží do jediného místa působení enzymu HindIII ve svrchu popsaném vektoru pEXP-1. Výsledný vektor obsahuje gen pro expandázu a gen pro hydroxylázu, přičemž každý z těchto genů je pod řízením promotoru IPNS, mimoto obsahuje tento vektor značící gen pro odolnost proti phleomycinu pod řízením promotoru pro beta-tubulin.

Příklad 12

Konstrukce vektoru pPenCACT pro transformaci *Penicillium*

Uložení genu pro odolnost proti hygromycinu

Byl zkonstruován vektor pro transformaci *Penicillium* s obsahem genu pro odolnost proti hygromycinu jako dominantního značení pro selekci. Gen pro fosfotransferázu hygromycinu B z *E. coli*, byl izolován elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu jako fragment o velikosti 1,15 kb po štěpení vektoru pHph-1 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) enzymem BamHI a gen byl pak uložen do vektoru mp19 po jeho rozštěpení BamHI. Orientace genu pro odolnost proti hygromycinu v mp19 byla stanovena analýzou RF DNA pomocí restrikčních enzymů. 5'-místo působení BamHI se nachází blízko kodonu ATG pro počátek v genu pro odolnost proti hygromycinu. Aby bylo možno usnadnit uložení jiného promotoru do tohoto 5' BamHI místa, bylo 3' BamHI místo odstraněno cílenou mutagenezí při použití balíčku pro cílenou mutagenezi, MutátorTM (Stratagene, La Jolla, CA). Mutace byla vytvořena podle pokynů výrobce. Byl zkonstruován nukleotid, komplementární k oblasti DNA v místě 3'-BamHI ze zveřejněného řetězce genu pro fosfotransferázu hygromycinu B *E. coli* (Gritz L., a Davies J.,

1983, Gene 25, 179). Tento oligonukleotid byl syntetizován při použití kyanoethylfosforamiditového postupu při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacia) a měl následující řetězec:

řetězec č. 10:

5' TACCCGGGGTTCCCGCGAACT 3'.

Vznik mutace byl potvrzen analýzou pomocí restrikčních enzymů. Mutovaný gen pro odolnost proti hygromycinu byl pak izolován elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu jako fragment po působení enzymů SmaI/XbaI a byl uložen do vektoru pUC 18 po jeho rozštěpení působením enzymu SmaI/XbaI.

Promotor IPNS z *Penicillium* byl izolován elektroforézou a následnou elucí z agarózového gelu jako fragment o velikosti 1,2 kb ze svrchu popsaného vektoru pUTZ-2 po jeho rozštěpení enzymem NcoI. Syntetické oligonukleotidové spojovníky byly syntetizovány k vytvoření místa působení BamHI z míst působení NcoI na koncích fragmentu promotoru IPNS tak, aby promotor IPNS byl uložen v místě 5' BamHI blízko kodonu ATG genu pro odolnost proti hygromycinu. Oligonukleotidy byly syntetizovány kyanoethylfosforamiditovou metodou při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacia) a měly následující řetězce:

řetězec č. 11:

5' CATGAAGAAG 3'

řetězec č. 12:

3' TTCTTCCTAG 5'

Tento řetězec zachovává přírodní řetězec promotoru IPNS, avšak přidává dvě aminokyseliny v genu pro odolnost proti hygromycinu. Oligonukleotidy byly spojeny, fosforylovány a uloženy do fragmentu promotoru TPNS do místa po rozštěpení NcoI, čímž došlo ke vzniku míst působení BamHI na 5' i 3' zakončení fragmentu promotoru IPNS. Takto modifikovaný promotor byl uložen do genu pro odolnost proti hygromycinu, rozštěpeného enzymem BamHI v plazmidu pUS18 a orientace byla potvrzena analýzou pomocí restrikčních enzymů. Tato kazeta s obsahem promotoru IPNS a genu pro odolnost proti hygromycinu pak byla izolována elektroforézou a elucí z agarózového gelu jako fragment o velikosti 2,1 kb po rozštěpení enzymy XhoI/SalI (místo XhoI je uloženo na 5'-zakončení promotoru IPNS a místo působení SalI pochází z polyspojovníku pUC) a fragment se uloží do vektoru pSELECT, rozštěpeného SalI. Orientace kazety se ověří analýzou restrikčním enzymem. Takto získaný vektor byl označen pIPNS/HYG.

Uložení genu pro acetyltransferázu *Cephalosporium acremonium*

Gen pro acetyltransferázu *Cephalosporium* byl izolován ze svrchu popsaného klonu genomu jako fragment o velikosti 1,8 kb po štěpení BgIII/SalI, izolace byla uskutečněna elektroforézou a elucí z agarózového gelu. Gen pro acetyltransferázu byl uložen do rozštěpeného vektoru pSELECT do místa po štěpení BamHI/SalI. Aby bylo usnadněno uložení promotoru IPNS *Penicillium* do místa kodonu ATG genu pro acetyltransferázu *Cephalosporium*, bylo vytvořeno nové místo působení enzymu NcoI v kodonu ATG genu pro acetyltransferázu a místo působení enzymu NcoI uvnitř strukturního genu bylo odstraněno cílenou mutagenézou při použití systému pro mutagenézi in vitro, Altered SitesTM (Promega Corporation). Mutace byla vyvolána podle návodu výrobce. Byly zkonstruovány oligonukleotidy, komplementární ke kódovému řetězci příslušných oblastí DNA z řetězce genu pro acetyltransferázu *Cephalosporium*, tak jak byly svrchu uvedeny jako řetězce č. 1 a 2. K odstranění vnitřního místa působení enzymu NcoI ve strukturním genu byly použity následující oligonukleotidové řetězce:

řetězec č. 13:

3' GTCGGCGCATCGATGGGTGGAAT 5'

Oligonukleotidový řetězec, použitý k vytvoření nového místa NcoI v kodonu ATG pro počátek translace měl následující složení:

5 řetězec č. 14:

3' CGCCACCATGGCGCCTCAGAT 5'.

Tyto oligonukleotidy byly syntetizovány kyanoethylfosforamiditovou metodou při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacia). Vznik mutace byl potvrzen analýzou pomocí restrikčních enzymů. Získaný vektor byl označen pMUTACT.

Promotor IPNS *Penicillium* byl izolován elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu jako fragment s velikostí 1,2 kb po štěpení enzymem NcoI z vektoru pUTZ-2, který byl podrobněji popsán svrchu. Uvedený fragment promotoru byl pak uložen do vektoru pMUTACT do místa působení enzymu NcoI po rozštěpení vektoru tímto enzymem. Tímto způsobem se dostává promotor IPNS do polohy kodonu ATG genu pro acetyltransferázu *Cephalosporium acremonium*. Orientace promotoru byla ověřena analýzou pomocí restrikčních enzymů. Uvedená kazeta s obsahem promotoru IPNS a genu pro acetyltransferázu byla rozštěpena enzymy XhoI/Sall (místo XhoI se nachází na 5'-zakočení promotoru IPNS a místo Sall se nachází na 3'-zakočení genu pro acetyltransferázu) a pak byla uložena do vektoru pSELECT po jeho rozštěpení enzymem Sall. Orientace fragmentu byla ověřena analýzou restrikčními enzymy. Takto připravený vektor byl pak označen pMUTACT/IPNS.

Mutací, která byla použita k vytvoření nového místa působení NcoI v kodonu ATG genu pro acetyltransferázu došlo ke změně druhé aminokyseliny ze serinu na alanin. Aby bylo možno udržet kódový řetězec, totožný s přírodním genem, byla uskutečněna ještě jedna cílená mutace při použití systému pro vytvoření mutace in vitro Altered SitesTM. Oligonukleotid byl zkonstruován jako komplementární ke kódovému řetězci příslušné oblasti DNA řetězce genu pro acetyltransferázu, tyto řetězce byly uvedeny svrchu jako řetězce č. 1 a 2. Ke změně druhé aminokyseliny z alaninu na serin byl užit oligonukleotid s následujícím řetězcem:

řetězec č. 15:

3' TCTAGCTAGACACCATGTCGCCTOAGAT 5'.

Oligonukleotid byl syntetizován při použití kyanoethylfosforamiditové metody a zařízení Gene Assembler (Pharmacia). Vznik mutace byl potvrzen analýzou řetězce DNA při použití balíčku pro stanovení řetězce DNA, USB Sequenase Version 2.0 (USB, Cleveland, Ohio). Primery pro analýzu řetězce byly syntetizovány kyanoethylfosforamiditovou metodou a zařízením Gene Assembler (Pharmacia). Získaný vektor byl označen pMUTACT/IPNS-2.

Kazeta, obsahující promotor IPNS a gen pro odolnost proti hygromycinu se vyjme z vektoru pIPNS/HYG jako fragment po štěpení XbaI a uloží se do vektoru pMUTACT/IPNS-2, rozštěpeného XbaI za vzniku výsledného vektoru pro transformaci, označeného pPenCACT. Orientace kazety pro odolnost proti hygromycinu se stanoví analýzou restrikčními enzymy.

Příklad 13

Konstrukce vektoru p-TS-8 pro transformaci *Penicillium* tak, aby docházelo k expresi genu pro expandázu/hydroxylázu i genu pro acetyltransferázu z *Cephalosporium acremonium*

Gen pro acetyltransferázu *Cephalosporium* byl izolován elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu jako fragment o velikosti 1,8 kb klonu genomu po rozštěpení enzymu BglII/Sall a byl uložen do vektoru pSELECT (Promega Corporation), rozštěpeného BamHI/Sall. K usnadnění vhodného uložení promotoru IPNS *Penicillium* do kodonu ATG genu pro

acetyltransferázu *Cephalosporium* se vytvoří nové místo působení NcoI v kodonu ATG, uloženého u báze -42 (Mathison a další, Current Genetics, v tisku) a odstraní se vnitřní místo NcoI ve strukturním genu vyvoláním cílené mutace při použití systému pro vyvolání mutací in vitro, Altered Sites (Promega Corporation). Mutace byla vyvolána podle návodu výrobce.

5 Oligonukleotidy byly zkonstruovány tak, aby byly komplementární ke kódovým oblastem v příslušné části řetězce DNA, avšak byly zařazeny některé změny tak, aby došlo k vytvoření nebo odstranění místa působení enzymu NcoI. Oligonukleotid, použitý k odstranění vnitřního místa působení NcoI ve strukturním genu měl následující řetězec:

10 řetězec č. 16:

3' GTCGGCGCATCGATGGGTGGAAT 5'.

Oligonukleotid, použitý k vytvoření nového místa působení enzymu NcoI v kodonu ATG u báze -42 měl následující řetězec:

15

řetězec č. 17:

5' CTCCGATAGGGCGTGGTACCCGGCCCTACTCTTAT 3'

Oligonukleotidy byly syntetizovány kyanoethylfosforamiditovou metodou při použití zařízení Gene Assembler (Pharmacie). Vznik obou mutací byl potvrzen analýzou restrikčními enzymy. Získaný vektor byl označen pMUTACT. Promotor IPNS *Penicillium* byl izolován elektroforézou a následnou elucí z agarózového gelu jako fragment o velikosti 1,2 kb z vektoru pUTZ-2, který byl podrobněji popsán svrchu, po jeho rozštěpení enzymem NcoI. Tento fragment promotoru pak byl uložen do vektoru pMUTACT po jeho rozštěpení enzymem NcoI, promotor IPNS byl nyní

20 uložen přímo v -42 ATG genu pro acetyltransferázu *Cephalosporium*. Orientace promotoru byla potvrzena analýzou restrikčními enzymy. Takto získaný vektor byl označen pMUTAC/IPNS. Z vektoru pMUTACT/IPNS byl elektroforézou s následnou elucí z agarózového gelu izolován fragment o velikosti 2,5 kb štěpením XhoI/Sall, tento fragment obsahoval kazetu s promotorem IPNS a genem pro acetyltransferázu, tato kazeta pak byla uložena do svrchu popsaného vektoru

25 pUTZ-2, rozštěpeného Sall. Tento vektor, vytvořený jako meziprodukt byl pak rozštěpen enzymem XbaI a navázán na fragment XbaI o velikosti 2,1 kb ze svrchu popsaného vektoru pPEN/CEPH-1, obsahujícího kazetu s promotorem IPNS a genem pro expandázu/hydroxylázu, čímž byl získán výsledný vektor pro transformaci, který byl označen pTS-8.

35

Příklad 14

Transformace *Penicillium chrysogenum*

40 Protoplasty ze svrchu uvedeného kmene *Penicillium chrysogenum* byly vytvořeny naočkováním 50 ml kapalného živného prostředí CM s použitím 1×10^7 spór na 67 hodin, po tuto dobu bylo prostředí udržováno na teplotě 25 °C na rotační třepačce při 220 ot/min. Mycelium bylo odděleno filtrací přes vrstvu mulu, přeneseno do lahví s objemem 500 ml a znovu uvedeno do suspenze ve 25 ml prostředí KMP s obsahem 0,7M KCl, 0,8M mannitolu, 0,02M KPO_4 o pH 6,3, mimoto

45 obsahovalo prostředí 100 mg prostředku Novozyme 234 (Novo BioLabs, Bagsvaerd, Dánsko), pak bylo prostředí inkubováno při 30 °C a 100 ot/min. Sferoplasty byly odděleny filtrací přes vrstvu mulu a skelné vaty a usazeny odstředěním 10 minut při 350 g. Pak byly sferoplasty třikrát promyty 10 ml pufru KMP a znovu uvedeny do suspenze v KMPC (KMP s 50 mM CaCl_2) do koncentrace 5×10^7 buněk/ml a směs byla ponechána 20 minut při teplotě místnosti. Pro transformaci *Penicillium* bylo 200 mikrolitrů suspenze sferoplastu přidáno k DNA (5 mikro-

50 gramů DNA vektoru v 6,2 mikrolitrech KMPC s 5 mg/ml heparinu) s 50 mikrolitry PPC (40% PEG s molekulovou hmotností 3500, 20 mM KPO_4 o pH 6,3, 5% CaCl_2 byl přidán těsně před použitím) a výsledná směs byla inkubována v ledu celkem 30 minut. Pak byl přidán 1 ml čerstvě připraveného PPC a směs byla přenesena do 50 ml agaru pro regeneraci s teplotou 50 °C (CM plus 1,3 M mannitolu a 3 % agaru). Transformační směs pak byla rozdělena do pěti Petriho

55

misek. Po regeneraci 24 hodin při 25 °C byly plotny převrstveny OL (1% pepton v 1% agaru) s obsahem 100 mikrogramů/50 ml phleomycinu. Množství materiálu pro převrstvení bylo stejné jako množství agaru pro regeneraci. Plotny pak byly inkubovány 7 až 14 dnů při 25 °C a byla pozorována tvorba kolonií transformovaného organismu.

5

Příklad 15

Zkoušky na biologickou účinnost

10

Biologická zkouška s difuzí v agaru byla použita ke stanovení antibiotické účinnosti fermentačních produktů adipoyl-6-APA a adipoyl-7-ADCA, izolovaných pomocí HPLC. 20 mikrolitrů izolovaného produktu bylo nanášeno na kotouče s průměrem 5 mm na plotně agaru LB (20 g/litr základního bujonu LB s 3% agarem, Gibco, Paisley, Skotsko), agar byl naočkován kmenem *Bacillus subtilis* ATCC 33677 nebo *E. coli*, supersensitivním kmenem (Prof. Arnold L. Demain, MIT). *Bacillus subtilis* byl použit jako indikátorový kmen k zajištění adipoyl-6-APA a supersensitivní kmen *E. coli* byl použit jako indikátorový kmen pro zjištění adipoyl-7-ADCA. Po 15 hodinách inkubace při teplotě 37 °C bylo možno pozorovat halo inhibice růstu indikátorové bakterie kolem kotouče, což znamená, že produkty měly biologickou účinnost. Jako kontroly v tomto pokusu byly použity deacetoxycefalosporin C, cefalosporin C, penicillin V a agar s obsahem nebo bez obsahu penicilinázy jako kontrola pro potvrzení beta-laktamové struktury.

15

20

25

Příklad 16

Metoda HPLC pro současnou analýzu adipoyl-6-APA, -7-ADCA, -7-ADAC a -7-ACA

Fermentační produkty z transformovaných kmenů *Penicillium*, adipoyl-6-APA, adipoyl-7-ADCA, adipoyl-7-ADAC a adipoyl-7-ACA byly současně analyzovány vysokotlakou kapalinovou chromatografií, HPLC. Systém HPLC byl tvořen následujícími složkami (Waters): systém pro přívod rozpouštědla 625, detektor vlnové délky 409E (nastavený na 220 nm a 260 nm), systém pro maximální údaje 825. Stacionární fáze byla slisovaná radiální náplň Nova-Pak C¹⁸ s rozměry 5 x 100 mm s vloženým systémem Nova-Pak C¹⁸ Guard-Pak. Při rychlosti průtoku 1 ml/min byla mobilní fáze tvořena lineárním gradientem, který se po 10 minutách měnil z počátečního složení 5 % methanolu a 95 % 10 mM KPO₄ o pH 5 na 40 % methanolu a 60 % KPO₄ o pH 5. Adipoyl-6-APA byla kvantitativně stanovena srovnáním se standardní křivkou pro penicillin N při 220 nm. Expandované produkty byly kvantitativně stanoveny srovnáním se standardními křivkami pro syntetickou adipoyl-7-ADCA a adipoyl-7-ACA při 260 nm.

35

40

Příklad 17

Zkoušky na enzym RAEV

45

Chemicky syntetizovaná adipoyl-7-ADCA a adipoyl-7-ACA byly použity jako substráty pro stanovení specifické účinnosti enzymu RAEV (běžně dodáván RAEV Corp.). Reakční směs obsahovala 10 mM substrátu, 1 mikrogram enzymu RAEV, 5 % glycerolu v 0,16 M KH₂PO₄ v celkovém objemu 50 mikrolitrů, směs byla inkubována při 37 °C. Optimálnější reakční podmínky zahrnují použití alespoň 20 mM substrátu ve 20 až 50 mM pufru s fosforečnanem draselným. Podíly po 5 mikrolitrech se odebírají v čase 0 a po 1, 3, 5, 10, 20 a 30 minutách, zředí se 35 mikrolitry 0,01 M KH₂PO₄ o pH 3,5 a zmrazí se na -70 °C před analýzou pomocí HPLC za svrchu uvedených podmínek.

50

Účinnost enzymu RAEV na kyselinu adipoyl-p-aminobenzoovou jako na kolorimetrický substrát byla stanovena při použití 5 mM substrátu, 8,25 mikrogramů enzymu RAEV, 10 % glycerolu v 0,065 M KH_2PO_4 o pH 7,0 v celkovém objemu 50 mikrolitrů celkem 30 minut při 37 °C. Reakce byla prováděna při použití mikrotitrační plotny s 96 vyhloubeními. K ukončení reakce bylo přidáno 50 mikrolitrů ředění 1:100 1M NaNO_2 v 0,25 M kyselině octové a reakční směs byla ponechána 3 minuty při teplotě místnosti. Pak bylo přidáno 100 mikrolitrů ředění 1:100 hydrátu monosodné soli kyseliny 4-amino-5-hydroxy-2,7-naftalendisulfonové s obsahem 10 mg/ml ve vodě v 0,5 M uhličitanu sodném a vznik zbarvení byl okamžitě sledován při 515 nm při použití odečítacího zařízení EL 312 Bio-kinetics (BioTek Instruments).

Příklad 18

Stanovení alternativních adipoylacyláz

Kromě zkoušek s použitím enzymu RAEV k odstranění adipoylového postranního řetězce z adipoyl-7-ADCA nebo jiných adipoylových sloučenin byly užity také další enzymy, produkované celou řadou mikroorganismů. Při počátečních zkouškách byly pěstovány kmeny *Pseudomonas* sp., SE-83 a SE-495 (Asahi), uložené ve sbírce Fermentation Research Institute pod číslem FERM BP-817 a FERM BP-818 a kmen *Pseudomonas* SY-77-1 (Toyo Jozo), uložený ve sbírce Northern Regional Research Laboratory pod číslem NRRL B-8070 celkem 72 hodin v prostředí, které obsahovalo 2,0 % HyCase SF, 0,5 % monosodné soli kyseliny glutamové, 0,5 % extraktu z kvasnic, 0,2 % pevného podílu kukuřičného výluhu, 0,5 % oleje z bavlníkových semen a 0,1 % kyseliny glutarové, jde vždy o procenta hmotnostní. Buňky byly odděleny odstředěním, promyty 50 mM fosfátovým pufrům o pH 8,0 a pak znovu uvedeny do suspenze v pufru a vnější membrány byly zpracovány působením malého objemu chloroformu, čímž se staly propustnými. Pak byl podíl buněčné suspenze smísen s adipoylparanitroanilidem (ad-pNA) a inkubován při teplotě 30 °C celkem 2 až 18 hodin. Po inkubaci byly směsi okyseleny přidáním 10 % objemových kyseliny octové. Uvolněný p-nitroanilin pak byl prokazován kolorimetricky po jeho přeměně na diazosloučeninu použitím reakčních činidel, dodávaných ve formě zkušebního balíčku pro stanovení gamma-glutamyltransferázy (Sigma Chemical Company č. 545-A). Relativní účinnost uvedených tří kmenů bylo 100 % pro SE-495, 85,5 % pro SE-83 a 48 % pro SY-77-1. Při použití podobných zkoušek jako s enzymem RAEV svrchu, byla také prokazována účinnost enzymů SE-83 a SE-495 na adipoyl-7-ADCA jako na substrát. Produkt se betalaktamázy kmenem SY-77-1 zabránilo stanovení deacylační účinnosti tohoto kmene na adipoyl-7-ADCA.

Obdobným způsobem byla také prokázána produkce adipoylacylázy pro dva kmeny hub, *Alternaria* sp. MA-133, ATCC č. 20492 a *Aspergillus* sp. MA-13, ATCC č. 20491, kmen je uveden v US 4 141 790 (Meiji Seika Kaisha Ltd.) a také pro tři další bakteriální kmeny, *Brevibacterium* ATCC č. 14 649, *Achromobacterium* ATCC č. 14 648 a *Flavobacterium* ATCC č. 14 650, tyto kmeny byly popsány jako kmeny, produkující acylázu cephalosporinu C v US 3 239 394 (Merck & Co., Inc.).

Dále budou uvedeny v seznamu řetězců obecné informace o přihlášce a podrobnější údaje, týkající se řetězců které byly v průběhu přihlášky popsány.

Seznam řetězců

1) Obecná informace

i) přihlašovatel: Conder Michael J.

McAda, Phyllis
Rambossek John

Reeves, Cristopher D.

5 ii) název vynálezu: Biologický způsob výroby kyseliny 7-aminodeacetyl-falosporanové,
způsob pěstování rekombinantních buněk *Penicillium chrysogenum* a vektor pro
expresi rekombinantní DNA

iii) počet řetězců: 17

10 iv) adresa pro korespondenci:

A) adresát: Merck a Co., Inc.
B) ulice: 126 E. Lincoln Ave
C) město: Rahway
D) stát: New Jersey
E) země: USA
15 F) ZIP: 07065

v) forma pro odečtení počítačem:

A) typ prostředí: Floppy disk
B) počítač: IBM PC kompatibilní
20 C) operační systém: PC-DOS/MS-DOS
D) Software: PatentIn Release 1,0, verze 1,25

vi) údaje o přihlášce:

A) číslo přihlášky: PCT IUS 92/08585
25 B) den podání: 8. 10. 1992
C) klasifikace: C 12 N 15/52, 1/15, C 12 P 35/02

viii) Informace o zástupci:

A) jméno: Speer Raymond M.
30 B) číslo registrace: 26 810
C) číslo spisu: 18572IA

ix) Telekomunikační informace:

A) telefon: (908) 594-4481
35 B) telefax: (908) 594-4720

2) Informace pro řetězec č. 1:

40 i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 14 párů bází
B) druh: nukleová kyselina
C) typ: dvojitý
45 D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 1:

50 ACTAGACACC ATGG

14

2) Informace pro řetězec č. 2:

55 i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 16 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: dvojitý
- D) topologie: lineární

5

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 2:

10

GTGAGAGTTG ATGGAC

16

2) Informace pro řetězec č. 3:

15

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 16 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: dvojitý
- D) topologie: lineární

20

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 3:

25

TCTAGACACT ATGGAC

16

2) Informace pro řetězec č. 4:

30

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 16 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: dvojitý
- D) topologie: lineární

35

ii) Typ molekuly: DNA (genomu)

xi) Popis řetězce č. 4:

40

TCTAGACACC ATGGAC

16

2) Informace pro řetězec č. 5:

45

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 22 aminokyselin
- B) druh: aminokyseliny
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

50

ii) typ molekuly: peptid

xi) vlastnosti řetězce č. 5:

Ser Asn Ser Gly Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala
1 5 10 15

Asn Gly Asn Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro
20

5

2) Informace pro řetězec č. 6:

10

- i) vlastnosti řetězce:
A) délka: 22 aminokyselin
B) druh: aminokyselina
C) typ: jednoduchý
D) topologie: lineární

15

- ii) typ molekuly: peptid

- xi) vlastnosti řetězce č. 6:

20

Ser Asn Ser Trp Ala Val Ala Pro Gly Lys Thr Ala Asn
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Gln Asn Pro
20

25

2) Informace pro řetězec č. 7:

30

- i) vlastnosti řetězce:
A) délka: 22 aminokyselin
B) druh: aminokyselina
C) typ: jednoduchý
D) topologie: lineární

35

- ii) typ molekuly: peptid

- xi) vlastnosti řetězce č. 7:

40

Ser Asn Asn Trp Ala Val Ala Pro Gly Arg Thr Ala
1 5 10 15

Thr Gly Arg Pro Ile Leu Ala Gly Asp Pro
20

45

2) Informace pro řetězec č. 8:

50

- i) vlastnosti řetězce:
A) délka: 34 párů bází
B) druh: nukleová kyselina
C) typ: jednoduchý
D) topologie: lineární

55

- ii) typ molekuly: DNA (genomu)

xi) vlastnosti řetězce č. 8

CGAGAGGATC AGTGAGAGTC CATGGACACG ACGG

34

5

2) Informace pro řetězec č. 9:

i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 33 párů bází

10 B) druh: nukleová kyselina

C) typ: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

15

xi) vlastnosti řetězce č. 9:

GTTTTGGTGT CGTAGTAGTA CTGAAGGTTC CAG

33

20

2) Informace pro řetězec č. 10:

i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 21 párů bází

25 B) druh: nukleová kyselina

C) typ: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

30

xi) vlastnosti řetězce č. 10:

TACCCGGGGT TCCCGCGAAC T

21

35

2) Informace pro řetězec č. 11:

i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 10 párů bází

40 B) druh: nukleová kyselina

C) typ: jednoduchý

D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

45

xi) vlastnosti řetězce č. 11:

CATGAAGAAG

10

50

2) Informace pro řetězec č. 12:

i) vlastnosti řetězce:

A) délka: 10 párů bází

55 B) druh: nukleová kyselina

- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

xi) vlastnosti řetězce č. 12:

TTCTTCCTAG

10

2) Informace pro řetězec č. 13:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 23 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

xi) vlastnosti řetězce č. 13:

GTCGGCGCAT CGATGGGTGG AAT

23

2) Informace pro řetězec č. 14:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 22 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

xi) vlastnosti řetězce č. 14:

CGCCCACCAT GGCGCCTAG AT

22

2) Informace pro řetězec č. 15:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 22 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) typ molekuly: DNA (genomu)

xi) vlastnosti řetězce č. 15:

TCTAGCTAGA CACCATGTGCG CCTCAGAT

28

2) Informace pro řetězec č. 16:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 23 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: cDNA až mRNA

xi) vlastnosti řetězce č. 16:

GTCGGCGCAT CGATGGGTGG AAT

23

2) Informace pro řetězec č. 17:

i) vlastnosti řetězce:

- A) délka: 35 párů bází
- B) druh: nukleová kyselina
- C) typ: jednoduchý
- D) topologie: lineární

ii) Typ molekuly: cDNA až mRNA

xi) vlastnosti řetězce č. 17:

CTCCGATAGG GCGTGGTACC CGGCCCTACT CTTAT

35

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Biologický způsob výroby kyseliny 7-aminocefalosporanové, 7-ACA, vyznačující se tím, že se

1) v příslušném živném prostředí pěstuje kmen *Penicillium chrysogenum*, produkující izopenicillin N a do živného prostředí se přidává jako substrát adipát, a to kyselina adipová, její soli nebo její estery, asimilovatelné a využitelné použitým kmenem *Penicillium chrysogenum* za vzniku kyseliny adipoyl-6-aminopenicilanové, adipoyl-6-APA,

2) expresí odpovídajícího genu in situ se uskuteční následující přeměny:

a) expanze kruhu adipoyl-6-APA in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodesacetoxy-cefalosporanové, adipoyl-7-ADCA působením enzymu expandázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum* transformuje kódovou DNA pro enzym expandázu, pro niž je substrátem adipoyl-6-APA, přičemž u adipoyl-6-APA, produkované uvedeným kmenem dojde in situ k expanzi kruhu a ke vzniku adipoyl-7-ADCA,

b) 3-methylový postranní řetězec adipoyl-7-ADCA se hydroxyluje in situ za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminodeacetylcefalosporanové, adipoyl-7-ADAC, působením hydroxylázy tak, že se použitý kmen *P. chrysogenum* transformuje kódovou DNA pro enzym hydroxylázu, pro niž je substrátem adipoyl-7-ADCA, přičemž u adipoyl-7-ADCA, produkované tímto kmenem, dojde k hydroxylaci in situ a ke vzniku adipoyl-7-ADAC a

5 c) adipoyl-7-ADAC se in situ acetyluje za vzniku kyseliny adipoyl-7-aminocefalo-
sporanové, adipoyl-7-ACA, působením enzymu acetyltransferázy, přičemž uvedený kmen
P. chrysogenum byl předběžně transformován kódovou DNA pro enzym acetyltransferázu,
schopný působit na adipoyl-7-ADAC jako na substrát, a v důsledku této exprese dochází
k acetylaci adipoyl-7-ADAC, produkované tímto kmenem, in situ za vzniku adipoyl-7-
ACA a

3) takto získaná adipoyl-7-ACA se uvede do styku s adipoylamidázou k odstranění adipoyl-
ového postranního řetězce a vytvoření 7-ACA, která se izoluje.

10

2. Biologický způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se jako adipát přidává
disodná sůl kyseliny adipové.

15

3. Biologický způsob podle nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se jako kódová
DNA pro expandázu, hydroxylázu a acetyltransferázu užije DNA z Cephalosporium acre-
monium.

20

4. Biologický způsob podle nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že se k provedení
způsobu užije jediný bifunkční enzym expandáza/hydroxyláza.

5. Biologický způsob podle nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že se užije adipoyl-
amidáza, odvozená od mikroorganismu rodu Pseudomonas.

25

Konec dokumentu
