



F1000108148B



SUOMI - FINLAND (FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 108148 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

30.11.2001

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

C12P 35/00, C12N 1/15, 15/52

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

941135

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

10.03.1994

(24) Alkuperä - Löpdrag

11.09.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

10.03.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/US92/07711

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

11.09.1991 US 757879 P

28.08.1992 US 933469 P

(73) Haltija - Innehavare

1 •DSM N.V., Het Overloon 1, 6411 TE Heerlen, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 •Conder, Michael J., 767 Northfield Court, Harrisonburg, VA 22801, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Crawford, Lorilee, 14049 91st. Place N.E., Bothel, WA 98011, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 •McAda, Phyllis C., 15611 173rd Avenue, N.E., Woodinville, WA 98072, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 •Rambossek, John A., 7701 17th Avenue, N.E., Seattle, WA 98115, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Uusi biomenetelmä 7-ADCA:n valmistamiseksi

Nytt bioförfarande för framställning av 7-ADCA

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: 74182 ATCC

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 341892 (C12N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tärkeää välituotetta kefalosporiiniantibioottien valmistamiseksi, 7-aminodesasetoksikefalosporaanihappoa (7-ADCA), valmistetaan uudella biomenetelmällä, jossa transformoitua Penicillium chrysogenum-kantaa viljellään adipaatravinteen läsnä ollessa adipoyyli-6-APA:n (6-aminopenisillaanihappo) tuottamiseksi; ja esim. Streptomyces clavuligeruksesta peräisin oleva, P. chrysogenumiin transformoitu ekspandaasigeeni in situ -ilmentämällä muutetaan adipoyyli-6-APA rengasta laajentamalla adipoyyli-7-ADCA:ksi. Lopputuote, 7-ADCA, valmistetaan sitten pilkkomalla adipoyylisivuketju adipoyylisylaasia käyttäen. Täten synteesi kokonaisuudessaan suoritetaan biomenetelmiä käyttäen ja on tehokas sekä taloudellinen.

Uppfinningen avser en viktig mellanprodukt för framställning av kefalosporin-antibiotika, varvid 7-aminodesasetoksikefalosporansyra (7-ADCA) framställs genom ett nytt bioförfarande, enligt vilket en transformerad Penicillium chrysogenum-stam odlas i närvaro av ett adipatmaterial för bildande av adipoyl-6-APA (6-aminopenicilliansyra); och expressionen in situ av en expandasgeen, t.ex. från Streptomyces clavuligerus, med vilken P. chrysogenum transformerats, omvandlar adipoyl-6-APA genom ringexpansion till adipoyl-7-ADCA. Den slutliga produkten 7-ADCA framställs sedan genom avspjälkning av adipoyl-sidokedjan under användande av ett adipoyl-acylas. I enlighet med detta utföres hela syntesen under användande av bioförfaranden och den är effektiv och ekonomisk.

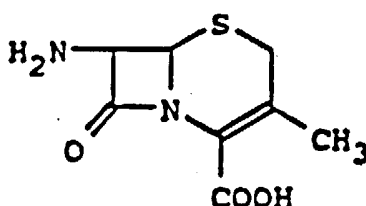
Uusi biomenetelmä 7-ADCA:n valmistamiseksi

Keksinnön tausta

1. Keksinnön aihepiiri

5 Esillä oleva keksintö koskee synteessimenetelmiä kaupallisten kefalosporiiniantibioottien valmistamiseksi, joita on tällä hetkellä olemassa huomattava joukko näiden
10 terapeuttisten aineiden ollessa nyt 4. polvessaan. Kaupallisissa kefalosporiineissa tavattujen sivuketjujen suuri vaihtelevuus ja kefalosporiinien huomattava taloudellinen merkitys ovat tehneet entistä tärkeämmäksi taloudellisempien ja tehokkaampien menetelmien saamisen keskeisten välituotteiden valmistamiseksi, jotka tekevät mahdolliseksi
15 eri kefalosporiinien vaivattoman synteessin.

Yksi näistä keskeisistä välituotteista on 7-amino-desasetoksikefalosporaanihappo (7-ADCA), joka voidaan
20 esittää seuraavalla kaavalla:



Tällä hetkellä 7-ADCA:ta tuotetaan penisilliini-G:stä ja
25 tarvitaan neljä tai viisi kemiallista vaihetta penisilliinirengassysteemin laajentamiseksi 5-jäsenisestä kefalosporiineille tunnusomaiseksi 6-jäseniseksi renkaaksi. Kuten on tyypillistä täysin kemialliselle synteetille, tällä menetelmällä on vakavia haittoja. Näitä ovat vaatimukset
30 monivaiheisesta ja mutkikkaasta menetelmästä, kalliit reagenssit, jätevesikäsittelyongelmiin johtavat huomattavat menetelmäsivutuotemäärät ja erittäin epäpuhtaan lähtömaterialin puhdistaminen ennen kemiallisen käsittelyn alkamista. Näin muodoin on jatkuvasti etsitty mikrobiologista
35 tai fermentatiivista menetelmää, jolla päästäisiin entsy-

maattiseen renkaan laajentamiseen ja sivuketjun pilkkomiseen 7-ADCA:n tuottamiseksi taloudellisemmin kuin tällä hetkellä käytetyllä kemiallisella menetelmällä.

5 Täten esillä oleva keksintö koskee erityisesti keskeisen kefalosporiinivälituotteen 7-ADCA valmistusta ja tarkemmin ottaen biomenetelmiä 7-ADCA:n valmistamiseksi.

10 Tähän mennessä onnistuneen biomenetelmän, etenkin kaupallista mittakaavaa edustavan, etsintä 7-ADCA:n valmistamiseksi on osoittautunut valtaosin turhaksi. Esimerkiksi, vaikkakin on ollut mahdollista valmistaa 6-aminopenisillaanihappoa (6-APA) suoralla fermentaatiolla ja/tai entsyymaattisesti käsittelemällä penisilliini-G:tä, jolloin 7-ADCA:n saamiseksi tarvitaan vain renkaan laajentaminen, on todettu, että valitettavasti Cephalosporium- tai
15 Streptomyces-entsyymit, jotka suorittavat renkaan laajentamisen näiden mikro-organismien normaaleilla metabolia-reiteillä, eivät hyväksy 6-APA:ta substraatiksi. Nämä entsyymit, joita alalla kutsutaan yhteisnimellä DAOCS tai ekspandaasientsyymi, määritellään entsyymeiksi, jotka ka-
20 talysoivat penisilliinityypin molekyyleissä tavattujen penamirengasrakenteiden laajenemisen kefalosporiineissa esiintyviksi kef-3-eemirenkaiksi. Tästä eteenpäin näitä entsyymejä kutsutaan "ekspandaasientsyymiksi".

25 Substraatti, jonka ekspandaasientsyymi kuitenkin hyväksyy, on penisilliini-N, josta renkaan laajetessa saadaan deasetoksikefalosporiini-C (DAOC). Tästä eteenpäin 7-ADCA:n saamiseksi tarvitsee vain pilkkoa (D)- α -aminoadi-poyylisivuketju, mutta tämä sivuketju on osoittautunut itsepintaisen vastustuskykyiseksi entsyymaattiselle pilkkomiselle, jolloin saadaan vain ei-hyväksyttävän matalia saantoja.

35 Esillä olevan keksinnön mukaan on ollut mahdollista päästä tehokkaaseen biomenetelmään, jossa penisilliiniyhdistettä (jossa on adipoyylisivuketju) tuotetaan uudella fermentointimenetelmällä korkein tiitterein, jol-

loin mainittu penisilliiniyhdiste on hyväksyttävä substraatti ekspandaasientsyymisysteemille, jonka tuottaa in situ sama mikro-organismi, joka tuottaa penisilliiniyhdisteen, koska tämä on transformoitu ilmentämään mainitun ekspandaasientsyymisysteemin. Ekspandaasientsyymi vaikuttaa sitten laajentamalla penisilliiniyhdisteen renkaan kefalosporiiniyhdisteeksi korkein saannoin. Lisäksi, mikä on tärkeää toisessa kriittisessä vaiheessa, penisilliiniyhdisteen, joka nyt on kefalosporiiniyhdiste, sivuketju voidaan poistaa toisella entsyymisysteemillä yllättävän korkein saannoin. Tämän ainutlaatuisen, esillä olevan keksinnön käsittämän biomenetelmän odottamaton tulos on 7-ADCA:n tuotanto yllättävän korkein saannoin.

2. Suppea kuvaus alan teknisestä tasosta

Cantwell et al. ovat julkaisussa Curr. Genet. 17 (1990) 213 - 221 esittäneet biomenetelmää 7-ADCA:n valmistamiseksi laajentamalla penisilliini-V:n rengasta, mitä seuraa saadun deasetoksikefalosporiini-V:n entsyymaattinen hydrolyysi 7-ADCA:n muodostamiseksi. Tämä ehdotus perustuu S. clavuligeruksesta kloonatun penisilliini-N-ekspandaasigeenin (cefE) saatavuuteen, Kovacevic et al., J. Bacteriol. 171 (1989) 754 - 760 ja US-patenttijulkaisu nro 5 070 020. Kuitenkin, koska ekspandaasi vaikuttaa luonnolliseen substraattiinsa penisilliini-N:ään, mutta ei penisilliini-V:hen, ehdotus edellyttää geenimanipulointia modifioitua ekspandaasigeenin tuottamiseksi, joka pystyy laajentamaan penisilliini-V-rengasta. Cantwell et al. eivät kuitenkaan päässeet tarvittavaan modifikaatioon ja he onnistuivat vain transformoimaan Penicillium chrysogenum cefE-geenillä Streptomyces clavuligeruksesta ja saamaan DAOCS (ekspandaasi) -entsyymien matalia ilmentymistasoja.

Alalla on laajalti tutkittu ekspandaasientsyymiä, sekä sen aktiivisuutta että sen geneettistä sekvenssiä. Esimerkiksi Wolfen US-patenttijulkaisuissa 4 510 246 ja

4 536 476 syklaasi-, epimeraasi- ja rengaslaajennusent-
syymejä eristettiin erikseen prokaryoottisten, β -laktaa-
mia tuottavien organismien, mukaan lukien Streptomyces
clavuligerus, soluvapaasta uutteesta stabiilien entsyymi-
5 reagenssien saamiseksi. EP-hakemusjulkaisussa 0 366 354
kuvataan S. clavuligeruksesta eristettyä ja puhdistettua
ekspandaasientsyymiä, jota karakterisoidaan mm. päässä si-
jaitsevalla tähteellä ja aminohappokoostumuksella, ja jon-
ka molekyylipainon sanotaan olevan noin 34 600 daltonia.
10 Tämä on kuitenkin ristiriidassa molekyylipainoon 29 000
nähdessä, joka määritettiin ilmeisestikin samalle entsyymil-
le US-patenttijulkaisussa 4 536 476. EP-hakemusjulkaisussa
0 233 715 julkistetaan S. clavuligeruksesta saadun ekspan-
daasientsyymien eristäminen ja endonukleasirestriktiokart-
15 takarakterisointi, mainitun entsyymien transformointi isän-
tään ja ilmentäminen siinä ja osoitetaan penisilliini-N-
substraatin renkaan laajentaminen mainittua entsyymiä
käyttäen. US-patenttijulkaisussa 5 070 020 julkistetaan S.
clavuligeruksesta saatua ekspandaasientsyymiä koodittava
20 DNA-sekvenssi ja kuvataan P. chrysogenum-kannan transfor-
mointia mainitun DNA-sekvenssin sisältävällä ilmentämis-
vektorilla, jolloin saadaan ekspandaasientsyymien ilmenty-
minen. Vaikka esitetään tämän entsyymien olevan käyttökel-
poisen muiden substraattien kuin penisilliini-N:n laajen-
25 tamiseksi, mitään tosiasiallista osoitusta tällaisesta
laajentamisesta ei anneta.

Edellä kuvattu työ on keskittynyt prokaryoottisesta
S. clavuligeruksesta peräisin olevaan ekspandaasientsyym-
miin. Tämän saman entsyymien, tai ainakin entsyymien, jolla
30 ilmeisesti on sama rengasta laajentava aktiivisuus, ilmen-
tävät myös eukaryoottisen Cephalosporium acremoniumin (jo-
ta kutsutaan myös Acremonium chrysogenumiksi) kannat. Kui-
tenkin tällaisissa kannoissa ekspandaasiaktiivisuuden il-
mentää bifunktionaalinen geeni (cefEF), joka ilmentää myös
35 DACS (hydroksylaasi) -aktiivisuuden, jonka luonnollinen

funktio on muuttaa ekspandaasientsyymien desasetoksikefalosporaanihappo (DAOC) -tuote deasetyylikefalosporiini-C:ksi (DAC). Tuloksena on yksittäinen mutta bifunktionaalinen ekspandaasi/hydroksylaasientsyymi. Vaikka on pyritty erottamaan näiden kahden geenituotteen aktiivisuudet, mikään yritysistä ei toistaiseksi ole onnistunut. Esimerkiksi EP-hakemusjulkaisussa 0 281 391 julkistetaan C. acremonium -kannasta ATCC 11550 saadun DAOCS/DACS-geenin eristäminen ja DNA-sekvenssi-identifikaatio yhdessä entsyymien vastaavien aminohapposekvenssien kanssa. Penicillium-kanta transformoidaan ja se ilmentää entsyymit, jolloin kuitenkin penisilliinien G ja V yritettyä muuttamista vastaaviksi kefalosporiineiksi ei koskaan osoiteta. Edelleen, huolimatta viittauksesta siihen, että geenin manipulaatiotekniikat antavat käyttöön helpon keinon DAOCS:ää koodittavan geneettisen informaation erottamiseksi DACS:ista ja niiden ilmentämiseksi erikseen, mitään tosiasiallista osoitusta tällaisesta erotuksesta ei anneta.

C. acremoniumin DAOCS/DACS (ekspandaasi/hydroksylaasi) -entsyymiä on samoin alalla laajalti tutkittu sekä sen aktiivisuuden että sen ominaispiirteiden ja geneettisen sekvenssin osalta. Esimerkiksi Demainin US-patenttijulkaisuissa 4 178 210; 4 248 966; ja 4 307 192 erilaisia penisilliinityypin lähtömateriaaleja käsitellään C. acremoniumin soluvapaalla uutteella, joka epimerisoi ja laajentaa renkaan siten, että saadaan kefalosporiiniantibioottituote. Wu-Kuang Yeh, US-patenttijulkaisu 4 753 881, kuvaa C. acremonium -entsyymien isoelektristä pistettä, molekyyllipainoja, aminohappotähteitä, hydroksylaasi- ja ekspandaasiaktiivisuuksien suhdetta ja peptidifragmentteja.

Edellä käsitelty alan tekninen taso käsittelee esillä olevan keksinnön vain yhtä näkökohtaa, eli P. chrysogenum -kannan transformointia ekspandaasientsyymien il-

mentävällä geenillä ja tuon entsyymin ilmentymisen saamista. Alalla on kuitenkin käytetty ilmennettyä entsyymiä vain penisilliini-N:n, ei penisilliinien G ja V, renkaan laajentamiseksi. Tuossakin tapauksessa penisilliini-N:ssä on aseman 7 sivuketju, jota ei voida pilkkoa entsyymaattisesti 7-ADCA:n saamiseksi, kuten esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä. Esillä oleva keksintö nojaa siihen yllättävään havaintoon, että P. chrysogemun -kanta kykenee tehokkaasti lisäämään adipoyylisivuketjun, että in situ -ilmennetty ekspandaasientsyymi kykenee käyttämään tuota yhdistettä tehokkaasti substraattina renkaan laajentamiseksi adipoyyli-7-ADCA:ksi ja että adipoyylisivuketju voidaan sitten poistaa tehokkaasti edelleen seuraavalla entsyymillä 7-ADCA:n saamiseksi. Vaikka esillä olevan keksinnön erilaisia erillisiä palasia voidaan löytää alan teknisestä tasosta, ei ole esiintynyt mitään viittauksia siitä, että ne voitaisiin yhdistää niiden odottamattomien tulosten saamiseksi, jotka saadaan esillä olevan keksinnön mukaisella menetelmällä.

Esimerkiksi 6-adipoyylipenisillaanihapon tuottaminen tunnetaan alalla; katso Ballio, A., et al., Nature 185 (1960) 97 - 99. 6-adipoyylipenisillaanihapon entsyymaattinen laajentaminen in vitro -pohjalla tunnetaan samoin alalla. Katso Baldwin et al., Tetrahedron 43 (1987) 3009 - 3014; ja EP-hakemusjulkaisu 0 268 343. Lisäksi adipoyylisivuketjujen entsyymaattinen pilkkominen tunnetaan alalla niinikään; katso Matsuda et al., J. Bact. 169 (1987) 5815 - 5820.

Adipoyylisivuketjun rakenne on seuraava: $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-$, kun taas likeistä sukua oleva sivuketjurakenne on glutaryyllillä, jonka kaava on seuraava: $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CO}-$. Glutaryyllisivuketjujen entsyymaattinen pilkkominen tunnetaan alalla. Katso esim. Shibuya et al., Agric. Biol. Chem. 45 (1981) 1561 - 1567; Matsuda ja Komatsu, J. Bact. 163 (1985) 1222 - 1228; Matsuda et al., J. Bact. 169

(1987) 5815 - 5820; julkaisu JP 53-086 084 (1978, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.); ja julkaisu JP 52-128 293 (1977, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd.).

5 Samoin julkaisussa EPA-A 0 453 048 kuvataan menetelmiä Pseudomonas-kannalla SY-77-1 tuotetun glutaryyli-asylaasin adipoyylisivuketjua pilkkovan aktiivisuuden parantamiseksi. Korvattaessa erilaisia aminohappoja tiettyihin kohtiin α -alayksikössä havaittiin 3 - 5 kertaa korkeampi adipoyylisivuketjun (adipoyyli-seriinistä) pilkkomisnopeus. Huomattakoon, että vaikka EP-hakemusjulkaisussa 10 0 453 048 ilmeisesti osoitetaan asylaasi, jonka aktiivisuus adipoyylisivuketjujen suhteen on aiempaa parempi, siinä ei kuvata mitään tapoja (joko kemiallisia menetelmiä tai biomenetelmää, joka olisi millään tavalla analoginen 15 esillä olevassa patenttiselityksessä kuvattuun nähden), joilla adipoyylikefalosporiini voitaisiin ensinnäkin saada.

 Silloin kun esiintyy (D)- α -aminoadipoyylisivuketju, alalla osataan ensin poistaa entsyymaattisesti aminoryhmä ja lyhentää sivuketjua (D)-aminoasidoksidaasilla, 20 jolloin jäljelle jää glutaryyli (GL-7) -sivuketju, joka glutaryylisivuketju poistetaan toisella entsyymillä (glutaryyliasylaasi). Tällainen kaksivaiheinen pilkkominen julkistetaan julkaisuissa Matsuda, US-patenttijulkaisu 25 3 960 662; EP-hakemusjulkaisu 0 275 901; julkaisu JP 61-218 057 (1988, Komatsu, Asahi Chemical Industry Co.); WO 90/12 110 (1990, Wong, Biopure Corp.); ja Isogai et al., Bio/Technology 9 (1991) 188 - 191.

 Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän ja 30 edellä käsiteltyjen viittauksien alan teknisen tason mukaisiin oppeihin tekemiseksi ymmärrettävämmiksi välittömästi seuraavaksi esitetään penisilliini-G:hen ja kefalosporiini-C:hen johtavien metaboliareittien eri vaiheet, välituotteet ja tarvittavat transformoinnit suorittavat 35 entsyymit.

L- α -aminoadipiinihappo +

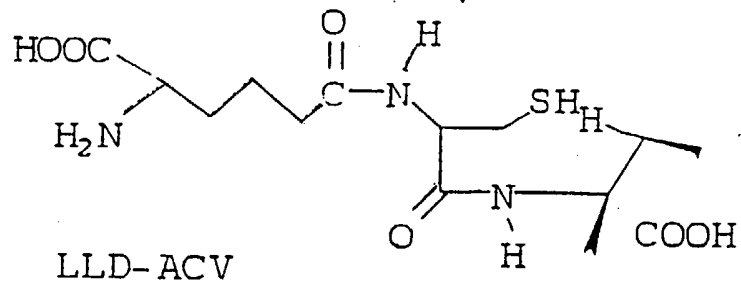
L-kysteiini + L-valiini

5

AVC-syntetaasi

10

(L)



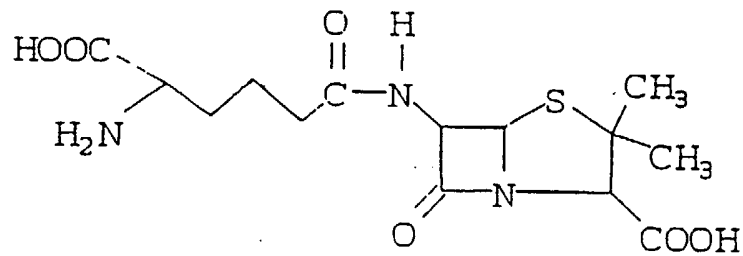
15

isopenisilliini-N-syntetaasi

(IPNS)

20

(L)



25

isopenisilliini-N

(IPN)

30

IPN-amidolyaasi

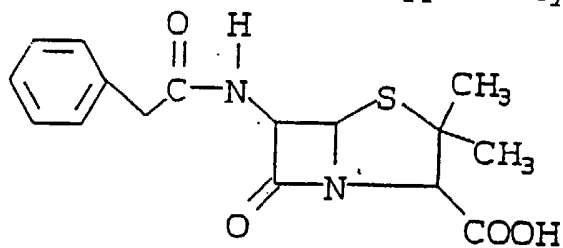
asyyli-CoA:6-APA-

asyyli transferaasi

5

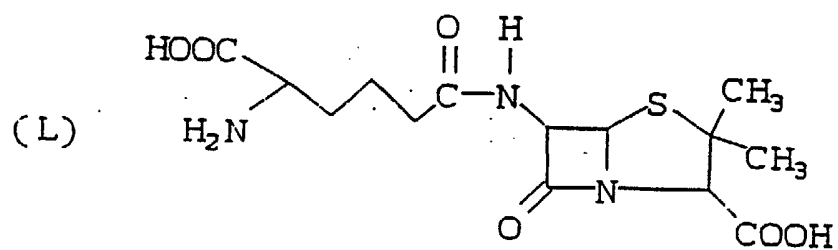
fenyyliasetyyli-CoA

10



penisilliini-G

15



20

isopenisilliini-N
(IPN)

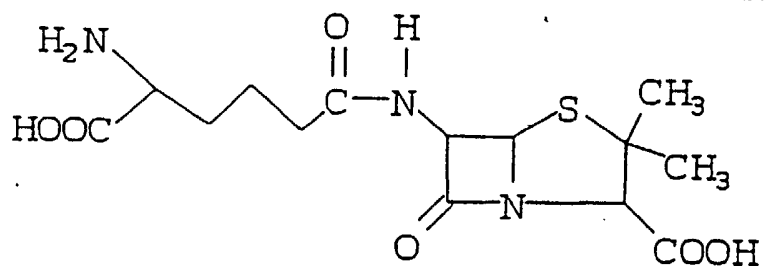
isopenisilliini-N

(IPN)

IPN-epimeraasi

(D)

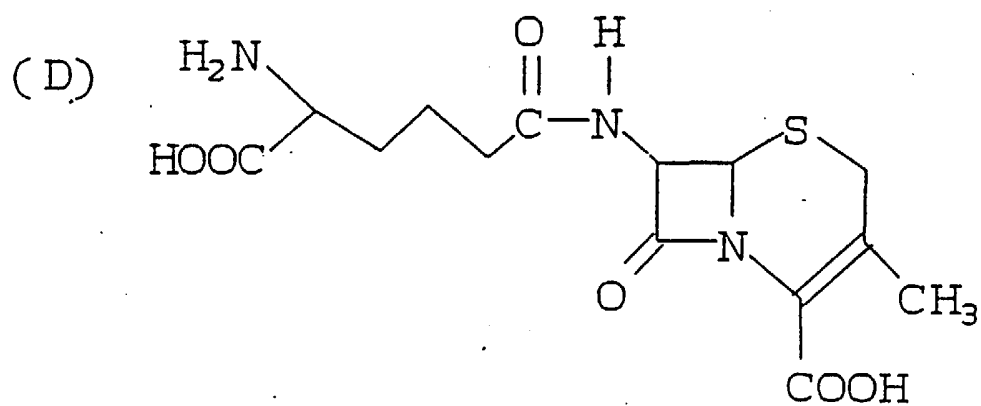
fenyyliasetyyli-CoA



penisilliini-N

penisilliini-N-

ekspandaasi

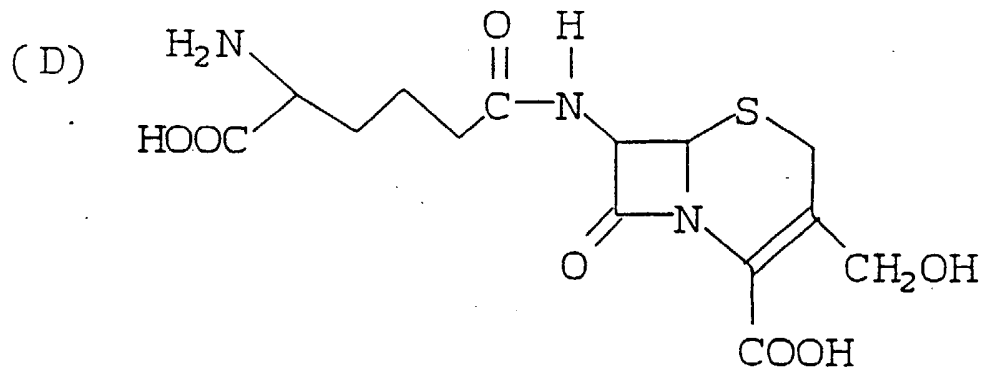


desasetoksi-
kefalosporaanihappo

(DAOC)

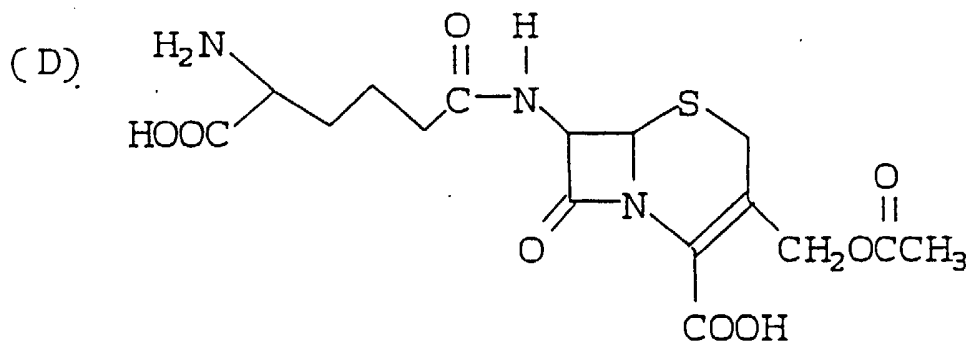
DAOC-3'-hydroksylaasi





desasetoksi-
kefalosporaanihappo
(DAC)

DAC-asetyyli transferaasi



kefalosporiini-C

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö koskee uutta biomenetelmää 7-aminodesasetoksikefalosporaanihapon (7-ADCA) valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- 5 1) isopenisilliini-N:ää tuottavaa Penicillium chrysogenum -kantaa pidetään sen kasvua ylläpitämään kykenevässä kasvualustassa ja mainittuun kasvualustaan lisätään adipaattiravinnetta, joka käsittää adipiinihappoa tai yhtä tai useampaa sen suolaa ja esterä, joita mainittu
- 10 Penicillium chrysogenum -kanta kykenee assimiloimaan ja käyttämään adipoyyli-6-aminopenisillaanihapon (adipoyyli-6-APA) tuottamiseksi, jolloin muodostuu mainittua adipoyyli-6-APA:aa;

jolloin mainittu Penicillium chrysogenum -kanta on

15 transformoitu DNA:lla, joka koodittaa mainitun adipoyyli-6-APA:n substraatiksi hyväksymään kykenevän ekspandaasientsyymin aktiivisuutta, jolloin tuloksena sen ilmentymisestä mainitun kannan tuottaman mainitun adipoyyli-6-APA:n rengas tulee myös sitten laajennetuksi in situ adipoyyli-

20 7-ADCA:n muodostamiseksi; ja

2) mainittu adipoyyli-7-ADCA saatetaan kosketuksiin adipoyyliasylaasin kanssa, jolloin adipoyylisivuketju poistuu ja 7-ADCA-tuote muodostuu; minkä jälkeen mainittu tuote eristetään.

25 Tässä käytettyinä seuraavilla ilmaisuilla on mainitut merkitykset:

"adipoyyli-6-APA" merkitsee [2S-(2 α ,5 α ,6 β)]-3,3-dimetyyli-7-okso-6-[(heksaani-1, 6-dioyyli)amino]-4-tia-1-atsabisyklo[3.2.0]heptaani-2-karboksyylihappoa; ja

30 "adipoyyli-7-ADCA" merkitsee 7-[(heksaani-1,6-dioyyli)amino]-3-metyyli-8-okso-5-tia-1-atsabisyklo-(4.2.0)-okt-2-eeni-2-karboksyylihappoa.

Erityisesti esillä oleva keksintö koskee edellä mainittua uutta biomenetelmää 7-aminodesasetoksikefalosporaanihapon (7-ADCA) valmistamiseksi, jossa menetelmässä

35

adipaattiravinne on dinatriumadipaatti, jossa ekspandaasi-entsyymin aktiivisuutta koodittava DNA on peräisin Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064 ja jossa adipo-
yyliasylaasi saadaan Pseudomonas-lajista.

5 Esillä oleva keksintö koskee lisäksi yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektoria, joka käsittää Streptomyces clavu-
ligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin olevan ekspandaasi-entsyymin aktiivisuutta koodittavan DNA:n sekä plasmidin
pPenFTSO käsittämän promoottorin, joka ohjaa mainitun eks-
10 pandaasiaktiivisuutta koodittavan DNA:n ilmentymistä jäl-
jempänä kuvatun mukaisesti.

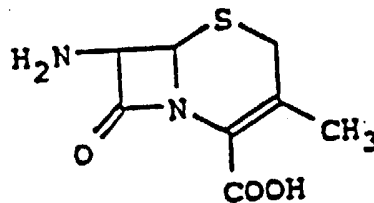
 Esillä oleva keksintö koskee lisäksi Penicillium
chrysogenum -isäntäsolua, joka on transformoitu yhdistel-
mä-DNA-ilmentämisvektorilla, joka käsittää Streptomyces
15 clavuligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin olevan ekspan-
daasientsyymin aktiivisuutta koodittavan DNA:n ja promoot-
torin, joka ohjaa mainitun ekspandaasiaktiivisuutta koo-
dittavan DNA:n ilmentymistä ja joka käsittää Penicillium
chrysogenum -IPNS-geenin promoottorin. Erityisesti esillä
20 oleva keksintö koskee Penicillium chrysogenum -isäntäso-
lua, joka on transformoitu yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektori-
n käsittävällä plasmidilla pPenFTSO, kuten jäljempänä
kuvataan.

 Esillä oleva keksintö koskee edelleen lisäksi me-
25 netelmää, joka käsittää vaiheen, jossa yhdistelmä-DNA-Pe-
nicillium chrysogenum -isäntäsolua viljellään geeni-ilmen-
tämiseen sopivissa olosuhteissa, jolloin mainittu yhdis-
telmä-DNA-isäntäsolu käsittää yhdistelmä-DNA-ilmentämis-
vektorin, joka käsittää Streptomyces clavuligerus -kannas-
30 ta ATCC 27064 peräisin olevan ekspandaasientsyymin aktii-
visuutta koodittavan DNA:n, ja promoottorin, joka ohjaa
mainitun ekspandaasiaktiivisuutta koodittavan DNA:n ilmen-
tymistä ja joka käsittää Penicillium chrysogenum -IPNS-
geenin promoottorin. Erityisesti esillä oleva keksintö
35 koskee menetelmää yhdistelmä-DNA-Penicillium chrysogenum

-isäntäsolun viljelemiseksi geeni-ilmentämiseen sopivissa olosuhteissa, jolloin mainittu yhdistelmä-DNA-isäntäsolu käsittää yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektorin käsittävän plasmidin pPenFTSO jäljempänä kuvatun mukaisesti.

5 **Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus**

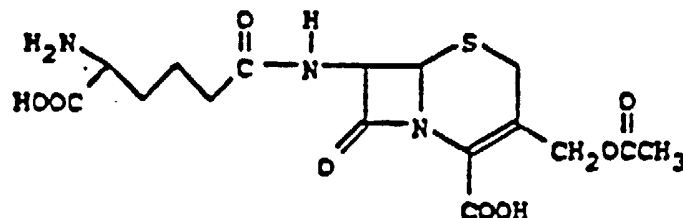
Esillä olevan keksinnön ensisijainen näkökohta on uusi biomenetelmä 7-aminodesasetoksekefalosporaanihapon (7-ADCA) valmistamiseksi, joka on keskeinen välituote syntetististen kaupallisten kefalosporiinien valmistamiseksi ja joka voidaan esittää seuraavalla rakennekaavalla:



15

Kefalosporiiniytimen lisäksi 7-ADCA:n tyypilliset piirteet ovat 7-aminoryhmä ja 3-metyyliryhmä. 7-aminoryhmä on ryhmä, joka voidaan muuttaa vaihtelevaksi joukoksi sivuketjujohdannaisia, ja se muodostaa siten perustan erilaisten kaupallisten kefalosporiinien syntetisoimiseksi. 3-metyyliryhmä täytyy tavallisesti, mutta ei aina kuten kefaleksiinin kohdalla, muuttaa joksikin muuksi sivuketjuksi kaupallisen kefalosporiinin syntetisoimiseksi.

25 Esillä olevan keksinnön mukaisen menetelmän 7-ADCA-tuote voidaan asettaa vastakkain kefalosporiini-C:n kanssa, joka on toinen keskeinen kefalosporiinivälituote, joka voidaan esittää seuraavalla rakennekaavalla:



30

35 Tälle välituotteelle 3-asetyyli-oksimetyyli-

sivuketju voi olla hyväksyttävä kaupallisiin kefalosporiineihin. 7-(D)- α -aminoadipoyylisivuketju ei kuitenkaan ole hyväksyttävä johdannaismuodostukseen jatkosynteesillä ja se on pilkottava hyväksyttävän 7-aminoryhmän saamiseksi. Valitettavasti 7-(D)- α -aminoadipoyylisivuketjun poistaminen on aina osoittautunut vaikeaksi yhtä hyvin kemiallisin kuin biokemiallisin keinoin.

Määritelmiä

Esillä olevassa patenttiselityksessä ja etenkin osassa, jonka otsikko on "Edullisten suoritusmuotojen kuvaus", käytettyinä seuraavilla ilmaisuilla on mainitut merkitykset:

	7-ADCA	7-aminodesasetoksikefalosporaanihappo
	6-APA	6-aminopenisillaanihappo
15	DAOC	desasetoksikefalosporaanihappo
	DAOCS	DAOC-syntetaasi
	DAC	deasetyylikefalosporiini-C
	DACS	DAC-syntaasi
	IPNS	isopenisilliini-N-syntetaasi
20	Tris	Tris[hydroksimetyyli]aminometaani
	EDTA	etyleenidiamiinitetraetikkahappo
	DEPC	dietyylipyrokarbonaatti
	TE	Tris/EDTA-puskuri
	SSC	suola- (natriumkloridi), natriumsitraatti-
: 25		puskuri
	SDS	natriumdodekyylisulfaatti
	PEG	polyetyleeniglykoli

Penicillium chrysogenum -viljelmä

Ensimmäinen vaihe esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käsittää vaiheen, jossa isopenisilliini-N:ää tuottavaa Penicillium chrysogenum -kantaa pidetään sen kasvua ylläpitämään kykenevässä kasvualustassa ja mainittuun kasvualustaan lisätään adipaattiravinnetta, joka käsittää adipiinihappoa tai sen suoloja ja estereitä. Adi-

paattiravinne voidaan lisätä kasvualustaan P. chrysogenum-
min siirrostamisen jälkeen mutta edullisesti se on jo lās-
nä kasvualustassa siirrostamisen ajankohtana. Adipiinihap-
po tai sen suolat ja esterit ovat sellaisia, että mainittu
5 P. chrysogenum -kanta kykenee assimiloimaan ja käyttämään
niitä adipoyyli-6-APA:n tuottamiseksi; jolloin mainittu P.
chrysogenum -kanta on transformoitu ekspandaasientsyymin
aktiivisuutta koodittavalla DNA:lla, jolloin tuloksena sen
ilmentymisestä mainitun adipoyyli-6-APA:n rengasta laajen-
10 netaan in situ adipoyyli-7-ADCA:n muodostamiseksi.

Chrysogenum-lajien ohella muutkin Penicillium-
suvun lajit tuottavat isopenisilliini-N:ää. Kuitenkin pe-
rinteisesti isopenisilliini-N:ää eniten tuottavat kannat
on kaikki kehitetty tutuilla kannan parannustekniikoilla
15 chrysogenum-lajeista. Käytännön vuoksi täten esillä oleva
keksintö on rajattu Penicillium chrysogenum -kantoihin,
vaikkakin sen sovellettavuus muihin lajeihin on ilmeinen.
Mikä tahansa talletuslaitokseen talletettu Penicillium
chrysogenum -kanta tai muu julkisesti saatavana oleva täl-
20 laisen kannan lähde on sopiva lähtökohta esillä olevan
keksinnön mukaisen menetelmän suorittamiselle.

Kasvualusta, joka kykenee ylläpitämään isopenisil-
liini-N:ää tuottavan Penicillium chrysogenum -kannan kas-
vua, edustaa tyyppiä, joka olisi varsin tuttu alan keski-
25 määräisellekin taitajalle. Esimerkiksi viljely voitaisiin
suorittaa aerobisen fermentoinnin submerssimenetelmällä ja
käytetty kasvualusta valittaisiin joukosta saatavana ole-
via sopivia kasvualustoja. Tyypillisissä kasvualustoissa
käytetään hiililähteinä sakkaroosia, glukoosia ja tärke-
30 lystä; tyypilähteinä soijajauhoa ja -jyvärouhetta, puuvil-
lansiemenöljyä, maapähkinäjauhoa ja erilaisia aminohappo-
ja, niiden seoksia ja peptoneja. Tuotantovaatimukset ko-
rostavat saantoa ja eristämisen helppoutta, jolloin edul-
linen kasvualusta tällaisissa tilanteissa voi olla melassi
35 hiililähteenä ja soijajauho ja aminohapot tyypilähteenä.

Kasvualustaan lisätään tavanomaisesti epäorgaanisia ravinnesuoloja, joita ovat suolat, jotka kykenevät antamaan käyttöön seuraavat ionirakenneosat: natrium, kalium, ammonium, kalsium, fosfaatti, sulfaatti, kloridi, bromidi, nitraatti, karbonaatti, rauta(3), rauta(2), magnesium, mangaani jne. Hivenaineet ovat samoin tavallisesti välttämättömiä Penicillium chrysogenumin kasvulle, kehitty miselle ja metaboli alalle, ja ne voidaan lisätä suoraan kasvualustaan, elleivät ne ole jo läsnä oleellisesti muita kasvualusta-ainesosia kontaminoivina aineina.

Penicillium chrysogenum -kantoja voidaan viljellä pienitilavuuksisissa laitteissa, kuten 1 litran ravistelukolvit, haluttaessa tuottaa vain pieniä 7-ADCA-määriä. Haluttaessa kuitenkin suurempia adipoyyli-7-ADCA-määriä käytetään suuren mittakaavan fermentointitankkeja aerobisen fermentoinnin submerssiolosuhteissa.

Suoritettaessa adipoyyli-7-ADCA:n valmistus suuressa mittakaavassa Penicillium chrysogenum -kannan itiöitä säilytetään agar-vinopinnalla. Itiöillä vinopinnalta siirrostetaan pienitilavuuksinen vegetatiivinen kasvualusta. Vegetatiivista kasvualustaa inkuboidaan mikro-organismin sakean, tuoreen, aktiivisesti kasvavan viljelmän tuottamiseksi. Tätä vegetatiivista kasvua käytetään sitten ympäinä suuren mittakaavan fermentointialustaan. Tietyissä tapauksissa saattaa olla toivottavaa sisällyttää vielä toinen vegetatiivinen kasvualusta ympiksi fermentointialustaan. Tällaisia toisen vaiheen vegetatiivisia kasvualustoja käytetään tavallisesti silloin kun fermentointialustan tilavuus on merkittävästi suurempi kuin ensimmäisen vegetatiivisen kasvualustan. Tällä tavalla mikro-organismien itiöitä viljellään ensin pienessä tilavuudessa vegetatiivista kasvualustaa ympin saamiseksi suuremman tilavuuden vegetatiiviselle kasvualustalle. Suuremman tilavuuden vegetatiivinen kasvualusta tuottaa sitten mikro-organismien riittävän pitoisuuden fermentoinnin

nopean alkamisen käynnistymiselle suuren mittakaavan fermentointitankissa. Vegetatiivisen kasvualustan koostumus voi olla sama kuin fermentointialustan tai se voi sisältää lisäaineesia mikro-organismien kasvun ja kehittymisen edistämiseksi pienessä mittakaavassa.

Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettyjä Penicillium chrysogenum -kantoja viljellään tehokkaimmin lämpötiloissa noin 20 - 30 °C, mutta optimaalisia saantoja saadaan lämpötilan ollessa noin 22 - 28 °C, edullisesti noin 25 °C.

Adipoyyli-7-ADCA:n maksimaalinen tuotanto saadaan viljeltäessä Penicillium chrysogenum -kantaa suuren mittakaavan tankeissa noin 10 - 30 päivän ajan, edullisesti 15 - 25 päivää. Kuitenkin viljeltäessä mikro-organismeä pienen mittakaavan laitteistossa, kuten 250 ml:n ravistelukoloveissa, sen kasvu on nopeampaa ja se tuottaa adipoyyli-7-ADCA:ta lyhyemmässä ajassa, esim. 4 - 15 päivässä, usein 5 - 7 päivässä.

Jos loppu-pH suuren mittakaavan fermentoinnissa kohoaa 8,0:aan tai korkeammalle, tällä saattaa olla kielteinen vaikutus adipoyyli-7-ADCA-saantoon. Tällaisissa tilanteissa kasvualustan pH:n tarkkaileminen koko fermentoinnin ajan on toivottavaa. Jos vaikuttaa siltä, että pH saavuttaa tällaiset tasot ennen adipoyyli-7-ADCA:n maksimaalisen tuotannon ilmenemisajankohtaa, pH:ta voidaan kätevästi säätää alaspäin lisäämällä fermentointialustaan sopivaa happoa tai puskuroivaa ainetta.

Adipoyyli-7-ADCA:n tuotantoa voidaan seurata testaamalla fermentointilieminäytteitä kromatografisesti.

Kuten useimmissa aerobisissa submerssifermentoinneissa, steriiliä ilmaa johdetaan kasvualustan läpi Penicillium chrysogenum -kannan tehokkaamman kasvun sekä adipoyyli-7-ADCA:n lisääntyneen tuotannon saamiseksi. Kasvualustan läpi johdetun ilman tilavuus on tavallisesti ainakin noin 0,2 tilavuutta ilmaa/min/kasvualustan tilavuus.

Kuitenkin ilman kulun lisätyllä nopeudella voi usein olla edullinen vaikutus adipoyyli-7-ADCA:n tuotantoon.

Penicillium chrysogenum -kanta tuottaa tyypillisesti adipoyyli-7-ADCA:n lisäksi monia sivutuotteita ja 5 metaboliitteja. Koska jotkin näistä ovat happolabiileja, adipoyyli-7-ADCA:ta fermentointialustasta talteen otettaessa on toivottavaa käsitellä fermentointiliientä kokonaisuudessaan happamassa pH:ssa lyhyen ajan joidenkin ohessa tuotetuksi tulleiden epäpuhtauksien tuhoamiseksi. 10 Adipoyyli-7-ADCA-fermentointituote otetaan talteen näin käsitelystä suodatetusta fermentointiliemestä ja se voidaan mahdollisesti erottaa fermentointialustan muista ainesosista kromatografisesti ioninvaihtohartsia käyttäen ja sitä voidaan tarvittaessa puhdistaa edelleen kromatografisesti ennen seuraavaa vaihetta, jossa adipoyylisivuketju lohkaistaan entsymaattisesti. On samoin mahdollista suorittaa tällainen ioninvaihtokromatografinen erotus sen jälkeen kun sivuketju on pilkottu pois. Yksi pääasiallisista erotusongelmia aiheuttavista sivutuotteista on adipoyyli-6-APA, ja tämä sivutuote on mahdollista hajottaa kemiallisesti tai entsymaattisesti erotuksen yksinkertaistamiseksi. Aluksi suodatettuun fermentointiliemeen kohdistetaan alustava puhdistusmenettely, johon voi sisältyä epäpuhtauksien poistamiseksi alustava uutto veteen 20 sekoittumattomalla orgaanisella liuottimella, kuten n-butanoli tai amyyliasetaatti. Uutettua lientä voidaan sitten puhdistaa edelleen alustavalla tavalla kromatografisesti aktiivihillellä. 25

Adipaattiravinteen lisääminen

30 Edullisesti ajankohtana, jolloin Penicillium chrysogenumia varten muodostetaan fermentointiviljelmä edellä kuvatun mukaisesti, eli ennen siirrostamista, fermentointialustan muihin ainesosiin lisätään adipaattiravinne. Adipaattiravinne voidaan mahdollisesti lisätä jonain ajankohtana siirrostuksen jälkeen, esim. 1, 2 ja/tai 3 päivän 35

kuluttua siirrosta. Adipaattiravinteeksi määritellään adipiinihappo tai adipiinihapon mikä tahansa yksi tai useampi suola tai esteri, jota adipoyyli-6-APA:n tuottamiseksi viljelty Penicillium chrysogenum -kanta kykenee assimiloimaan ja käyttämään. Adipiinihappoa, suoloja ja estereitä voidaan käyttää yksinään tai minä tahansa yhdistelmänä. Edullinen on dinatriumsuola, vaikkakin myös kalium- ja natriumsekasuolat olisivat samoin sopivia. Metyyliesteriä voitaisiin käyttää, mutta etyyliesteri ei ole vesiliukoinen. Adipiinihapposuolan tai -esterin on oltava sellainen, että Penicillium chrysogenum -kanta kykenee assimiloimaan ja käyttämään sitä adipoyyli-6-APA:n valmistamiseksi. Esimerkiksi itse adipiinihappo saattaisi olla sopiva, vaikka se ei ole vesiliukoinen, jos sopivissa pH-olosuhteissa muodostuu assimiloituva suola.

Sopivia ekspandaasientsyymejä

Penicillium chrysogenum -kanta, jota on viljelty antaen adipaattiravinnetta edellä kuvatun mukaisesti siten, että se tuottaa adipoyyli-6-APA:ta, on myös kanta, joka on transformoitu ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavalla DNA:lla, jolloin tuloksena tämän ilmentymisestä mainitun adipoyyli-6-APA:n rengas laajenee in situ adipoyyli-7-ADCA:n muodostamiseksi.

Adipaattiravinnetta käyttäen viljelty Penicillium chrysogenum tuottaa adipoyyli-6-APA:ta solunsisäisesti. Tuossa solunsisäisessä asetelmassa, eli in situ -pohjalta, transformoitu Penicillium chrysogenum samoin ilmentää ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavan DNA:n, jolloin entsyymi käyttää adipoyyli-6-APA:ta substraattina ja laajentaa sen renkaan siten, että muodostuu adipoyyli-7-ADCA:ta.

Esillä olevan keksinnön uuden biomenetelmän piiriin kuuluu edellä kuvattua tyyppiä edustavan Penicillium chrysogenum -kannan transformointi millä tahansa ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavalla DNA:lla, jolloin

tuloksena tämän ilmentymisestä adipoyyli-6-APA:n rengas laajenee in situ ja muodostuu adipoyyli-7-ADCA:ta. Täten DNA:n, jolla Penicillium chrysogenum transformoidaan, on ilmennettävä entsyymi, jolla ei ainoastaan ole ekspandaasientsyymien aktiivisuutta alalla ymmärrettyssä mielessä, eli kykyä laajentaa isopenisilliini-N:n rengas DAOC:ksi, vaan myös kyky laajentaa adipoyyli-6-APA-rengas adipoyyli-7-ADCA:ksi. Kuitenkin sivuketjun samankaltaisuuden perusteella arvellaan, että mikä tahansa ekspandaasientsyymi on käyttökelpoinen esillä olevan keksinnön uudessa biomenetelmässä.

Alan teknistä tasoa kuvaavassa osassa on jo mainittu, että Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin oleva ekspandaasientsyymi on täysin sekventoitu sekä karakterisoitu endonukleaasirestriktiokartoituksella. Kuitenkin S. clavuligerus -kannasta NRRL 3585 peräisin olevalla entsyymillä, joka vaikuttaisi samalta entsyymiltä, on raportoitu olevan eri molekyylipaino, mutta sitä ei ole sekventoitu.

Nämä alan teknisen tason puitteissa jo identifioidut ekspandaasientsyymit ovat käyttökelpoisia esillä olevan keksinnön mukaisessa uudessa biomenetelmässä. Muutkin ekspandaasientsyymit, joita ei ole vielä identifioitu ja jotka olisivat peräisin eri S. clavuligerus -kannoista tai jopa erisukuisista mikro-organismeista, saattavat myös osoittautua sopiviksi esillä olevan keksinnön uuden biomenetelmän suorittamiseksi. Menettelyt tällaisten uusien käyttökelpoisten mikro-organismikantojen ja -sukujen identifioimiseksi ja oletettujen ekspandaasientsyymien eristämiseksi sekä sen varmistamiseksi, että ne sopivat käytettäväksi esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä, ovat suoraviivaisia ja hyvinkin alan taitajan kykyjen puitteissa. Uusien käyttökelpoisten mikro-organismiehdokaskantojen ja -sukujen soluvapaiden uutteiden seulominen voidaan suorittaa luotettavalla ja toistettavalla tavalla

lisäämällä mainittuja uutteita adipoyyli-6-APA-substraattiin tunnettujen DAOCS-kofaktoreiden läsnä ollessa, joita ovat rauta(2) (Fe^{2+}) -ionit, askorbaatti, α -ketoglutaaraatti ja adenosiinitrifosfaatti (ATP). Adipoyyli-6-APA-substraattia voidaan valmistaa riittäviä määriä syöttämällä adipaattiravinnetta ei-transformoidulle Penicillium chrysogenumille jäljempänä yksityiskohtaisesti kuvattuun nähden analogisella tavalla. Haluttu ekspandaasientsyymi on läsnä, jos muodostuu adipoyyli-7-ADCA:ta, jonka läsnäolo voidaan todeta kromatografisesti.

Hyvin tunnettuja yhdistelmä-DNA-tekniikoita käyttäen on samoin mahdollista muodostaa DNA-koettimia S. clavuligeruksen ja C. acremoniumin ekspandaasisekvenssin nojalla esimerkiksi sellaisten ehdokasmikro-organismien DNA-sisällön seulomiseksi, jotka todennäköisesti tuottaisivat esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettäväksi sopivaa ekspandaasia.

Ekspandaasientsyymien mahdollisia lähteitä

Ekspandaasientsyymit, kuten jo mainittiin, ovat entsyymejä, jotka katalysoivat penamirengasrakenteiden (joita tavataan penisilliinityypin molekyyileissä) laajenemista kef-3-eemirenkaiksi (joita esiintyy kefalosporiineissa). Mikä tahansa organismi, joka tuottaa kefeemirengaan sisältäviä metaboliitteja, on siksi ekspandaasia koodittavan DNA:n mahdollinen lähde. Esimerkkejä tällaisista organismeista luetellaan alla, mutta tämä luettelo on vain esimerkkiluonteinen eikä sitä tulisi tulkita kattavaksi:

Sienet:

Cephalosporium acremonium
30 Cephalosporium sp.
Emericellopsis
Paecilomyces
Scopulariopsis
Diheterospora
35 Spiroidium

AnoxiopsisActinomycetes-organismit:Streptomyces clavuligerusS. lipmanii5 S. wadayamensisS. todorominensisS. filipinensis cephamyciniS. heteromorphusS. panayensis10 S. griseusS. cattleyaNocardia lactamdurans

Muut bakteerit:

Flavobacterium sp.15 Alcaligenes denitrificansMycoplana bullataProvidencia rettgeriLysobacter lactamgenus

Edellä lueteltujen organismien ekspandaasit ovat
 20 vain ehdokkaita jatkotutkimuksiin, ja saattaa osoittautua,
 etteivät ne kaikki sovi esillä olevan keksinnön mukaiseen
 uuteen menetelmään. Esimerkiksi niiden entsyymien käytös-
 tä, joilla on sekä ekspandaasi- että hydroksylaasiaktiivi-
 suutta, kuten C. acremonium-entsyymi, saattaisi seurata
 25 hydroksyloidun adipoyyli-7-ADCA:n, eli DAC:n, jossa on
 adipoyylisivuketju, synteesi.

**Ekspandaasiaktiivisuutta koodittavien DNA-
 fragmenttien eristäminen**

Sitten kun halutun ekspandaasientsyymien läsnäolo
 30 on todettu edellä kuvatulla tavalla, menettelyt ekspandaa-
 sientsyymiaktiivisuutta koodittavan DNA:n eristämiseksi
 ovat myös suoraviivaisia ja alalla hyvin tunnettuja. Ra-
 kennetaan DNA-koettimia, jotka perustuvat ekspandaasi-
 entsyymejä koodittavien geenien tunnettuihin sekvensseihin
 35 ja osasekvensseihin ja jotka hybridisoituvat eristet-

tävään, haluttua entsyymiä koodittavaan DNA:han. Tällaisten koettimien rakentaminen perustuu ekspandaasientsyymin aminohapposekvenssin ja sitä koodittavan nukleotidiemäsekvenssin sekä kyseessä olevan nimenomaisen mikro-organismin kodonipreferenssien tuntemiseen. Yksityiskohtainen kuvaus tyypillisistä tämäntyyppisistä menettelyistä sovellettuna Streptomyces clavuligerus -kannan ATCC 27064 genomi-DNA:han esitetään jäljempänä.

Ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavan DNA:n eristäminen suoritetaan käyttäen yhdistelmä-DNA-tekniologiassa hyvin tunnettuja restriktio- ja ligatointimenetelmiä. Jotta sopiva restriktiofragmentti voidaan tuottaa ja eristää, saatavilla on välttämättä kyseessä olevan mikroorganismin genomien endonukleasirestriktiokartta. Restriktiokarttoja S. clavuligerukselle ja C. acremoniumille on jo saatavana; täten ensin mainitulle käytetään restriktioentsyymejä BamHI ja SalI ja elektroforeettisesti saadaan halutut, kooltaan 1,8 - 2,2 ke:n fragmentit.

Penicillium chrysogenum -kannan transformointi

Sitten kun ekspandaasiaktiivisuutta koodittavat DNA-fragmentit on saatu, ne voidaan insertoida (ligatoida) plasmidiin tai muuhun ilmentämisvektoriin DNA-fragmenttien ohella, jotka käsittävät promoottorit, translaation aktivaatiosekvenssit, resistenssimerkit, säätösekvenssit, kosmidin muodostajat ja mitkä tahansa muut DNA-sekvenssit, jotka mahdollistavat transformoinnin tai edistävät sitä, ohjaavat geenituotteen ilmentymistä ja helpottavat transformanttien eristämistä. Näin rakennettua ilmentämisvektoria käytetään sitten Penicillium chrysogenum -kannan transformointiin ja ekspandaasientsyymin aktiivisuuden solunsisäiseen ilmentämiseen. Transformoinnin ja ilmentämisen saamiseksi käytetyt tekniikat ovat alalla hyvin tunnettuja, ja yksityiskohtainen kuvaus tyypillisistä tällaisista menettelyistä esitetään jäljempänä.

Kuten edellä jo yksityiskohtaisesti esitettiin,

transformoitu Penicillium chrysogenum -kanta ilmentää ekspandaasientsyymin aktiivisuuden solunsisäisesti, minkä jälkeen mainittu aktiivisuus vaikuttaa in situ adipoyyli-6-APA-substraattiin laajentaen sen renkaan adipoyyli-7-ADCA:ksi.

Uusi transformantti

Ekspandaasigeenin aktiivisuuden ilmentävä spesifinen Penicillium chrysogenum -transformantti, joka on esillä olevan keksinnön edullinen suoritusmuoto, on uusi verrattuna alan teknisen tason mukaisiin tällaisiin rakenteisiin, kuten rakenne julkaisussa Cantwell et al., Current Genetics 17 (1990) 213 - 221. Molemmissa rakenteissa käytetään mutagenisointia in vitro promoottorin yhdistämiseksi ekspandaasigeeniin. Cantwellin rakenteessa manipuloinnilla ekspandaasigeenin ATG:hen viedään NdeI-kohta, joka ligatoidaan XbaI-kohtaan IPNS-promoottorin 3'-päässä XbaI/NdeI-liittäjällä. Esillä olevan keksinnön mukaisessa rakenteessa ekspandaasigeenin ATG:hen luodaan NcoI-kohta, joka ligatoidaan NcoI-kohtaan IPNS-liittäjän 3'-päässä. Näin luodaan seuraavat sekvenssit promoottori-geeniyhtymäkohtien ympärille näissä rakenteissa:

	<u>XbaI</u>	<u>NcoI</u>	
IPNS-promoottori	5' TCTAGACACCATGG	3' sekv. tunnusnro 1	
25 <u>Strep</u> -ekspandaasi	5' GTGAGAGTTGATGGAC	3' sekv. tunnusnro 2	
Cantwell	5' TCTAGACACTATGGAC	3' sekv. tunnusnro 3	
ko. keksintö	5' TCTAGACACCATGGAC	3' sekv. tunnusnro 4	

Cantwell-rakenteessa C korvataan T:llä, kun taas esillä olevan keksinnön mukaisessa rakenteessa C säilytetään; täten välittömästi ATG-aloituskodonin viereisen IPNS-promoottorin sekvenssi sopii tarkalleen yhteen sekvenssin kanssa, joka tavataan luonnollisesti esiintyvässä IPNS-geenissä. On mahdollista, että alan teknisen tason mukainen promoottori, vaikkakin se eroaa vain yhdessä yk-

sittäisessä nukleotidiemäksessä, saattaa johtaa translaatiotehon matalampaan tehokkuuteen ja siten ekspandaasigeeni-ilmentymisen matalampaan tasoon.

5 Muut erot ovat rakenteisiin sisältyvän promoottorin tai geenin alueilla. Cantwell-rakenne sisältää IPNS-promoottorin 5'BamHI → XbaI3'-alueen, kun taas esillä olevan keksinnön mukainen vektori sisältää promoottorin 5'NcoI → NcoI3'-alueen [Diez et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 16358 - 16365]. Tämä johtaa noin 250 ylimääräiseen
10 ep:hen IPNS-promoottorin 5'-päässä Cantwell-rakenteessa. Kuitenkin tämä alue on ACV-syntetaasigeenin avoimella lukualueella ylävirtaan IPNS-geenistä.

Cantwell-rakenne sisältää myös Streptomyces-geenin ATG:stä BamHI-kohtaan 3' geenistä, kun taas esillä olevan
15 keksinnön mukainen vektori sisältää alueen ATG:stä SalI-kohtaan 3' geenistä [Kovacevic et al., J. Bacteriol. 171 (1989) 754 - 760]. Tämä johtaa noin 1 000 ep:hen ylimääräistä 3'-pään sekvenssiä Cantwell-rakenteessa. Esillä olevan keksinnön mukainen rakenne sisältää edelleen eks-
20 pandaasigeenin ylävirran alueen BamHI-kohtaan 5' ATG:stä; kuitenkin sen erottaa ekspandaasigeenin lukualueesta IPNS-promoottori.

Toinen esillä olevan keksinnön mukaisen rakenteen ero verrattuna alan teknisen tason puitteissa kuvattuun
25 liittyy käytettyyn valikointimerkkiin. Penicillium-IPNS-promoottori: fleomysiinigeenifuusion käyttäminen esillä olevan keksinnön mukaisessa rakenteessa on taipuvainen johtamaan valintaan monikopioiden integraation suhteen tai integraation suhteen kohdissa, jotka mahdollistavat korkean ilmentämistason, ja siten sillä mahdollisesti voidaan
30 saada suurempi prosentuaalinen osuus transformantteja, jotka ilmentävät runsaasti ekspandaasigeeniä.

Uusi edellä kuvatun tyyppinen transformantti on PC100:ksi identifioitu Penicillium chrysogenum. Sen taksonomisiin ominaispiirteisiin kuuluu tyypillisesti laajalle
35

levinneiden pesäkkeiden tuotanto, jotka ovat väriltään sinivihreästä vihreään, tasaisen samettimaisia käsittäen keltaisia pisaroita; kääntöpuolella agariin diffundoituvaa keltaista; haarautuneita konidiapäitä, joiden kaikki osat
5 ovat tasaisia; ellipsin muotoisesta pallomaiseen vaihtelevia konidioita, joiden pituus on 3 - 4 mm. Hyväksyttävissä viljelyolosuhteissa P. chrysogenumille käytetään kiinteää kasvualustaa, joka käsittää monohydratoitua laktoosia 1,5 % (w/v), maissin liotusvettä 0,5 % (v/v); peptonia
10 0,5 % (w/v); NaCl:ää 0,4 % (w/v); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$:ta 0,05 % (w/v); KH_2PO_4 :ää 0,06 % (w/v); $FeCl_3 \cdot 6H_2O$:ta 0,0005 % (w/v); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$:ta, 0,0002 % (w/v); agaria 3,0 % (w/v); yhdessä litrassa tislattua vettä, pH 4,8. Juuri kuvattu ja PC100:ksi nimetty P. chrysogenum on talletettu talletus-
15 laitokseen the American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, jossa se on saanut hakunumeron ATCC 74182 (talletuksen pvm: vastaanotettu 21. elokuuta 1992, elinkelpoisuus vahvistettu 27. elokuuta 1992).

20 **Adipoyylisivuketjun pilkkominen**

Seuraava vaihe esillä olevan keksinnön mukaisessa uudessa biomenetelmässä on adipoyylisivuketjun pilkkominen adipoyyli-7-ADCA:sta, mikä edellyttää edeltävästä vaiheesta saadun tuotteen käsittelyä adipoyyliasylaasientsyymisysteemillä. Kuten jo mainittiin edellä, esillä olevan keksinnön yksi merkittävä saavutus on, että kaikki adipoyyli-7-ADCA:n muodostumiseen johtavat vaiheet pystytään suorittamaan yhdessä fermentointiviljelmässä. Tällä saavutuksella päästään poikkeuksellisesti parantuneeseen tehokkuuteen, koska välituotteita ei tarvitse eristää ja osittain puhdistaa vaihe vaiheelta menetelmässä. Tässä viimeisessä vaiheessa adipoyyliasylaasientsyymisysteemi ei kuitenkaan ole läsnä, eli sitä ei ole muodostunut in situ alkuperäisessä fermentointiviljelmässä.

35 Jos esillä olevan keksinnön mukainen uusi biomene-

telmä suoritetaan erämuodossa, on välttämätöntä eristää ja osittain puhdistaa ensimmäisen vaiheen tuote ja alustavia menettelyjä tämän suorittamiseksi on jo edellä kuvattu.

Kuitenkin esillä olevan keksinnön mukainen menetelmä voidaan suorittaa millä tahansa tavalla, joka saattaa adipoyyliasylaasin tehokkaasti kosketuksiin adipoyyli-7-ADCA:n kanssa, jotta tuon yhdisteen entsymaattinen konversio 7-ADCA:ksi voi tapahtua. Tämä on ilmaissun "kosketuksiin saattaminen" määritelmä laajimmassa mielessään.

10 On mahdollista käyttää epäpuhtaan adipoyyli-7-ADCA:n so-
lunapaata lientä syöttövirtana ja käsitellä sitä erämuo-
dossa epäpuhtaalla adipoyyliasylaasiliemellä. Tällä lähes-
tymistavalla toteutetaan tietty teho, koska se ei edellytä
reagoivien aineiden mitään alustavaa huomattavaa puhdistam-
15 mista. Modifikaatiot ovat luonnollisesti mahdollisia. Esi-
merkiksi reagoivia aineita voidaan puhdistaa missä tahansa
halutussa määrin ennen kuin ne saatetaan kosketuksiin
toistensa kanssa. Samoin menetelmä voitaisiin suorittaa
paremminkin jatkuvalla kuin erä kerrallaan tapahtuvalla
20 tavalla. Itse reagoivien aineiden kosketuksiin saattamista
voidaan modifioida eri tavoin ottaen huomioon edistysaske-
leet prosessiteknologiassa. Täten voidaan käyttää immobi-
lisoitua entsyymiä, esim. kolonnin muodossa, joka sisältää
adipoyyliasylaasin ja jonka kolonnin läpi adipoyyli-7-ADCA
25 johdetaan. Immobilisoitu entsyymi voidaan myös lisätä adi-
poyyli-7-ADCA-liuokseen suspensiona. Tällaisten immobili-
soitujen entsyymisysteemien etuja ovat entsyymien helppo
talteenotto ja monikäyttö. Toinen esimerkki tällaisesta
prosessiteknologiasta liittyy membraanireaktoreihin. Edul-
30 linen menetelmä reagoivien aineiden saattamiseksi koske-
tuksiin on käyttämällä immobilisoidun entsyymien käsittävää
kolonnia.

**Pilkkomisvaiheessa käyttökelpoisia adipoyyliasy-
laasientsyymejä**

35 Löytyy koko joukko entsyymejä, jotka tunnetaan

spesifisyydestä adipoyylisivuketjujen suhteen. Valmistajalta RAEV Corp. kaupallisesti saatavana olevalla adipoyyliasyllaasilla saadut tulokset esitetään yksityiskoh-
 taisesti työesimerkeissä jäljempänä. Kirjallisuudessa on
 5 raportoitu 7 muuta entsyymiä, jotka poistavat adipoyylisivuketjuja kefalosporiinityypin molekyyleistä. Kuusi
 näistä seitsemästä entsyymistä on Pseudomonas-lajeista, ja
 7. on Bacillus-lajista. Tiettyjen Pseudomonas-entsyymien
 välillä on joitakin samankaltaisuuksia, mutta kaikki 7
 10 poikkeavat jossain määrin toisistaan fysikaalisten/biologisten ominaisuuksiensa osalta. Joistakin niiden
 ominaispiirteistä esitetään alla yhteenveto:

	Entsyymi	Viite	Likimääräinen mp. (alayksikkö)
15	(<u>Pseudomonas</u>- ja <u>Bacillus</u>-kannat)		
	<u>P.</u> SY-77-1 (Toyo Jozo)	Shibuya <u>et al.</u> (1981)	ilmeisesti sama kuin GK16 alla
20	<u>P.</u> GK16 (Asahi)	Matsuda, Komatsu (1985)	16 000 54 000
	<u>P.</u> SE83 (acyI) (Asahi)	Matsuda <u>et al.</u> (1987)	38 200 19 900
	<u>P.</u> SE83 (acyII) (Asahi)	Matsuda <u>et al.</u> (1987)	25 400 58 200
25	<u>P. diminuta</u> N176 (Fujisawa)	Aramori <u>et al.</u> (1991a)*	58 000 26 000
	<u>P. diminuta</u> V22 (Fujisawa)	Aramori <u>et al.</u> (1991a)*	? ?
30	<u>Bacillus latero-</u> <u>sporus</u> J1	Aramori <u>et al.</u> (1991b)**	70 000 (monomeer.)
	<u>Pseudomonas</u> sp. (RAEV Corp.)	-	16 000 54 000
	* Aramori <u>et al.</u> , <u>J. Ferment. Bioeng.</u> 72 (1991) 232 - 243		
35	** Aramori <u>et al.</u> , <u>J. Bacteriol.</u> 173 (1991) 7848 - 7855		

Kaikki edeltävät adipoyyliasylaasientsyymit ovat käyttökelpoisia esillä olevan keksinnön mukaisessa uudessa biomenetelmässä. Muita esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoisia adipoyyliasylaaseja voidaan
5 löytää helposti testaamalla ehdokasentsyymi adipoyyli-7-ADCA:lla, joka on tosiasiallinen substraatti, johon sen on vaikutettava. Positiivinen tulos antaa luotettavan ja toistettavan menetelmän sen määrittämiseksi, että ehdokasentsyymi todella on käyttökelpoinen esillä olevan keksin-
10 nön mukaisessa menetelmässä. Substraatti voidaan valmistaa suoraviivaisella tavalla adipiinihappoanhydridin reaktiolla 7-ADCA:n kanssa käyttäen modifikaatiota menettelystä, jonka raportoivat Szewczuk ja Wellman-Bednawska julkaisussa Clin. Chim. Acta 84 (1978) 19 -26. Adipiinihappoanhydridi voidaan valmistaa Albertsonin ja Lundmarkin menetel-
15 män mukaan, jota kuvataan julkaisussa J. Macromol. Sci. Chem. A27 (1990) 397 - 412. 7-ADCA:ta on saatavana useammasta kaupallisesta lähteestä, mukaan lukien E.R. Squibb & Sons, Ltd., NJ, ja Interchem Corp., NJ.

20 Jos halutaan suorittaa ehdokasentsyymien karkea seulonta nopeaa kolorimetristä menetelmää käyttäen, adipoyyli-7-ADCA-substraatti voidaan korvata kolorimetrisellä substraatilla, kuten adipoyyli-PABA (para-aminobentsoehappo) tai adipoyyli-PNA (para-nitroaniliini). Sivuketjun
25 pilkkominen tuottaa värin muodostavan lajin, jonka läsnäolo ja pitoisuus on helppo määrittää kolorimetrisesti. Yksityiskohtaisemman informaation osalta näistä ja muista sopivista kolorimetrisistä menetelmistä katso Marelli, L.P., J. Pharm. Sci. 57 (1968) 2172 - 2173; Szasz, G.,
30 Clin. Chem. 15 (1969) 124 - 136; Szewczuk, A., et al., Anal. Biochem. 103 (1980) 166 - 169; ja Reyes, F., et al., J. Pharma. Pharmacol. 41 (1989) 136 - 137.

RAEV-entsyymien N-pään aminohapposekvenssejä verrattiin edeltävässä taulukossa esitettyihin acyII- ja
35 GK16-entsyymien suuriin alayksiköihin. Tulokset vertai-

lusta esitetään alla (jolloin sulkeet osoittavat vähemmän sitovat määritykset):

RAEV - sekvenssi tunnusnro 5

5 S N (S) (G) A V A P G K T A N G N A L (L) L Q N (P)

GK16 - sekvenssi tunnusnro 6

S N S W A V A P G K T A N G N A L L L Q N P

acyII - sekvenssi tunnusnro 7

S N N W A V A P G R T A T G R P I L A G D P

10

Esitetyistä sekvensseistä ilmenee, että kaikki nämä kolme peptidiä ovat sukua toisilleen. Kuitenkaan proteiinilla, jolla on samanlainen N-pään sekvenssi kuin edellä esitetyillä, ei välttämättä ole adipoyyliasylaasi-
 15 aktiivisuutta, kuten Arthrobacter-kannan tuottaman penisiiliini-G-asylaasin kohdalla. Toisaalta löytyy esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä käyttökelpoisia adipoyyliasylaaseja, jotka eivät osoita merkittävää homologiaa edeltävään N-pään sekvenssiin nähden. Esimerkiksi Asahi-
 20 entsyymillä acyI ja Fujisawa B. laterosporus J1-asylaasilla, jotka esitetään taulukossa edellä ja joilla on osoitettu olevan jonkin verran adipoyyli-7-ACA-asylaasiaktiivisuutta, ei ole mitään sekvenssihomologiaa muihin edellä esitettyihin entsyymeihin nähden. Siten esillä olevan keksinnön kattama alue suhteessa uuden biomenetelmän toisessa
 25 vaiheessa käyttökelpoisiin adipoyyliasylaaseihin määritetään sen perusteella, pystyykö ehdokasentsyymi pilkkomaan adipoyylisivuketjun adipoyyli-7-ADCA:sta vai ei, seikka, joka voidaan määrittää helposti ja luotettavasti edellä
 30 yksityiskohtaisesti esitetyn mukaan.

Muutkin lähestymistavat sopivien adipoyyliasylaasien löytämiseksi ovat mahdollisia. Esimerkiksi EP-hakemusjulkaisussa 0 453 048 kuvataan menetelmiä Pseudomonas-
 kannan SY-77-1 tuottaman glutaryyliasylaasin adipoyyliä
 35 pilkkovan aktiivisuuden parantamiseksi. Substituoitaessa

eri aminohappoja tiettyihin kohtiin α -alayksikössä havaittiin 3 - 5 kertaa korkeampi adipoyyilipilkkomisen (adipoyyli-seriinistä) nopeus. Tällaiset parannetut entsyymit sopisivat myös käytettäväksi esillä olevassa keksinnössä.

5 Huomattakoon, että vaikka EP-hakemusjulkaisussa 0 453 048 ilmeisesti esitetään asylaasi, jonka aktiivisuus adipoyylisivuketjujen suhteen on aiempaa parempi, siinä ei kuvata mitään tapoja (joko kemiallisia tai esillä olevassa patenttiselityksessä kuvattuihin nähden millään tavalla analogisia biomenetelmiä), joilla adipoyylikefalosporiini

10 voitaisiin ensinnäkään muodostaa.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Seuraava on yksityiskohtainen kuvaus esillä olevan keksinnön tietyistä edullisista suoritusmuodoista, jotka

15 on kuitenkin tarkoitettu vain esillä olevaa keksintöä havainnollistaviksi eikä millään tavalla sitä rajaaviksi.

Esimerkki 1

Penicillium chrysogenumin viljelyolosuhteet

Näissä menettelyissä käytettyä Penicillium chrysogenum -kantaa ylläpidettiin maljoilla, jotka sisälsivät

20 LCSB-kasvualustaa, jonka koostumus oli seuraava: monohydratoitu laktoosi 1,5 % (w/v); maissin liotusvesi 0,5 % (v/v); peptoni 0,5 % (w/v); NaCl 0,4 % (w/v); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 % (w/v); KH_2PO_4 0,06 % (w/v); $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,0005 %

25 (w/v); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,0002 % (w/v); agar 3,0 % (w/v); yhdessä litrassa tislattua vettä, pH 4,8. 12 päivän jälkeen 25 °C:ssa ja 65 %:n suhteellisessa kosteudessa yksittäisiä pesäkkeitä poistettiin ja ne lisättiin 2 ml:aan steriloitua vettä lasihelmiä sisältävässä kierrekorkilla varustetussa putkessa. Viljelmäkasvua liuotettiin vorteks-sekoitamalla, minkä jälkeen suspensiolla siirrostettiin riisikolveja. Riisikolveit sisälsivät 25 g/250 ml:n kolvin ja

30 lostettua, luonnollisesti pitkäjyväistä Uncle Ben's-riisiä, jota oli pesty 3 - 4 tilavuudella tislattua vettä 7

35 minuutin ajan sekoittaen 30 sekunnin välein ja jota oli

sitten valutettu, kunnes riisin vesipitoisuus oli noin 25 %. 12 päivän jälkeen 25 °C:ssa ja 65 %:n kosteudessa itiöt pestiin riisistä 50 ml:lla steriiliä vettä. Itiösuspensiolla siirrostettiin nestemäisiä viljelmiä, minkä lisäksi niistä valmistettiin kylmäkuivattuja viljelmiä varastoitavaksi 4 °C:ssa. Itiöt lisättiin samaan tilavuuteen 5-%:ista kuorittua maitoa ja kylmäkuivattiin steriileissä ampulleissa.

Kannan kaksivaiheista fermentointia ravistelukol-
veissa käytettiin penisilliinien tuottamiseksi tai myseelin tuottamiseksi RNA- tai DNA-lähteeksi. Idätysvaihe käynnistettiin lisäämällä 1×10^8 itiötä 50 ml/500 ml:n kolviin, jossa kasvualusta koostui seuraavista: glukoosi 3,0 % (w/v); Pharmamedia-alusta 1,0 % (w/v); maissin liotusvesi 3,0 % (v/v); ammoniumsulfaatti 0,2 % (w/v); CaCO_3 0,5 % (w/v); kidevedetön monokaliumfosfaatti 0,05 % (w/v); laktoosi 1,0 % (w/v); primaarinen kuivahiiva 1,0 % (w/v); yhdessä litrassa tislattua vettä. Inkubointi suoritettiin 25 °C:ssa ja 65 %:n suhteellisessa kosteudessa pyörivällä ravistelupöydällä, jonka amplitudin halkaisija oli 70 mm ja pyörimisnopeus 220 kierr./min. 48 tunnin inkuboinnin jälkeen tuotantovaihe käynnistettiin siirtämällä 2 ml vegetatiivista ymppeä 35 ml/500 ml:n kolviin, jossa kasvualustan koostumus oli seuraava: KH_2PO_4 0,05 % (w/v); K_2SO_4 0,5 % (w/v); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 % (w/v); laktoosi 12,0 % (w/v); Pharmamedia-alusta 2,75 % (w/v); CaCO_3 (saostettu) 1,0 % (w/v); laardiöljy 1,0 % (v/v); yhdessä litrassa tislattua vettä, pH 6,6. Autoklavoinnin jälkeen mutta ennen siirrostusta steriiliä 25-%:ista natriumadipaattiliuosta (pH 6,6) lisättiin natriumadipaatin loppupitoisuuteen 2,5 %. Siirrostamisen jälkeen inkubointia jatkettiin sitten samoissa olosuhteissa kuin idätysvaiheessa 5 - 7 päivän ajan.

Kun tarvittiin myseeliä protoplastien muodostamiseksi transformointiin tai DNA-lähteeksi, kantaa kasvatettiin 50 ml/250 ml:n kolvissa, joka sisälsi täydellistä

kasvualustaa (CM), jonka koostumus oli seuraava: 50 ml 20X Clutterbuck-suoloja (120 g Na_2NO_3 , 10,4 g KCl, 10,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30,4 g KH_2PO_4), 2,0 ml Vogelin hivenaineita (0,3 M sitruunahappo, 0,2 M ZnSO_4 , 25 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM CuSO_4 , 3 mM MnSO_4 , 8 mM boorihappo, 2 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 5 g tryptonia, 5 g hiivauutetta, 10 g glukosia; yhdessä litrassa tislattua vettä. Inkubointi suoritettiin 25 °C:ssa pyörivällä ravistelupöydällä pyörimisnopeudella 220 kierrosta/min.

10

Esimerkki 2**Penicilliumin genomi-DNA:n ja kokonais-RNA:n eristäminen**

Edellä kuvatun mukaisesti valmistettu vegetatiivinen myseelikasvu 48 tunnin viljelmästä otettiin talteen suodattamalla sideharson läpi, se jäädytettiin nestetypessä ja kylmäkuivattiin yön yli. Kuivattu myseeli jauhettiin hiekan kanssa käyttäen huumarettia ja survinta ja uudelleensuspendoitiin 25 ml:aan liuosta, jossa olivat pitoisuudet 100 mM LiCl, 50 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,0, 4 % SDS:ää. Suspensio kuumennettiin 50 - 55 °C:seen vesihautteessa 60 °C:ssa, minkä jälkeen seosta uutettiin ensin fenolilla kyllästetyllä 1 M Tris-liuoksella (pH 8) ja sitten fenolilla kyllästetty Tris-liuos:kloroformilla (1:1, v/v) ja sitten kloroformilla. RNA saostettiin vesifaasista lisäämällä sama tilavuus kylmää 6 M LiCl-liuosta ja antamalla seoksen sitten seistä -20 °C:ssa 2 - 3 tunnin ajan. 20 minuuttia kestävän sentrifugoinnin jälkeen 12 000 x g:ssä 4 °C:ssa supernatantista tehtiin 66-%:ista (v/v) etanolin suhteen ja sitä jäähdytettiin -20 °C:ssa 15 minuutin ajan DNA:n saostamiseksi. Sentrifugoitiin kuten edellä, minkä jälkeen DNA-pelletti pestiin 70-%:isella etanolilla, kuivattiin ja uudelleensuspendoitiin TE-puskuriin (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA). DNA-pitoisuus arvioitiin vertaamalla tunnettuihin DNA-standardeihin värjättäessä etidiumbromidilla agarosigeelielektroforeesissa.

Edellä esimerkissä 1 kuvatus mukaisia Penicillium chrysogenum -viljelmiä kasvatettiin 96 tunnin ajan 35 ml:ssa fermentointialustaa (fermentointiolosuhteita kuvattiin edellä) 25 °C:ssa pyörivällä ravistelupöydällä pyörimisnopeuden ollessa 220 kierr./min. Myseeli otettiin talteen suodattamalla Whatman nro 1 -suodattimen läpi tyhjössä ja se pestiin noin 50 ml:lla vettä. Myseeli kaavittiin välittömästi suodattimelta, se uudelleensuspendoitiin 5 ml:aan "rikkomispuskuria" (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8,0, 5 % SDS:ää), jäädytettiin nestetyypessä ja kylmäkuivattiin. Yön yli kestäneen kylmäkuivauksen jälkeen lisättiin 5 ml 0,1-%:ista DEPC:tä sisältävää vettä ja 5 ml fenolilla kyllästetty 1 M Tris-liuos (pH 8):kloroformi:isoamyylialkoholia (50:50:1) ja seos jätettiin sulamaan 37 °C:seen 20 minuutiksi, jona aikana sitä ravisteltiin. Seosta sentrifugoitiin 12 000 x g:ssä 10 minuutin ajan 4 °C:ssa, vesifaasi poistettiin ja sitä uudelleennuutettiin ensin fenolilla kyllästetty 1 M Tris-liuos (pH 8):kloroformi:isoamyylialkoholilla (50:50:1), toiseksi fenolilla kyllästetyllä 1 M Tris-liuoksella (pH 8) ja kolmanneksi kloroformilla. Sama tilavuus 6 M LiCl-liuosta yhdistettiin lopulliseen vesifaasiin ja liuos jätettiin -20 °C:seen vähintään 4 tunnin ajaksi. Kokonais-RNA pelletoitettiin sentrifugoimalla 12 000 x g:ssä 20 minuutin ajan 4 °C:ssa, pelletti liuotettiin 0,3 ml:aan TE-puskuria, jossa oli 0,03 ml 3 M natriumasetaattiliuosta, ja 2,5 tilavuutta etanolia lisättiin RNA:n uudelleensaostamiseksi. Lopullinen pelletti liuotettiin 0,1 ml:aan TE-puskuria ja RNA-pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti käyttäen absorbanssia 260 nm:ssä.

Esimerkki 3

Streptomyces clavuligeruksen viljelyolosuhteet

Näissä menettelyissä käytetty Streptomyces clavuligerus -kanta oli ATCC 27064. Kantaa ylläpidettiin maljoilla, joissa kasvualustan koostumus oli seuraava: hiivauute 4 g; mallasuute 10 g; glukoosi 4 g; agar 20 g; yh-

dessä litrassa tislattua vettä, pH 7,2. 5 päivän kasvatuk-
sen jälkeen 30 °C:ssa maljoille lisättiin 2 ml tislattua
vettä ja viljelmäkasvu kaavittiin agar-pinnalta. Saatu
suspensio siirrettiin lasihelmiä sisältävään steriiliin,
5 kierrekorkilla varustettuun putkeen. Viljelmäkasvua liuo-
tettiin vorteks-sekoittamalla, minkä jälkeen suspensiolla
siirrostettiin nestemäisiä viljelmiä. Suspensiota käytet-
tiin myös pysyvään viljelmävarastointiin -70 °C:ssa, jol-
loin siihen lisättiin glyserolia loppupitoisuuteen 15 %.

10 Tarvittaessa myseeliä protoplastien muodostamiseksi
transformointiin tai DNA-lähteeksi kantoja kasvatettiin
200 ml/1 litran kolvissa, jossa YEME-kasvualustan koostu-
mus oli seuraava: hiivauute 3 g; peptoni 5 g; mallasuute
3 g; glukoosi 10 g; sakkaroosi 340 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1,02 g;
15 glysiini 5 g; agar 18 g; yhdessä litrassa tislattua vettä.
Inkubointi suoritettiin 28 °C:ssa pyörivällä ravistelupöy-
dällä pyörimisnopeuden ollessa 220 kierr./min.

Esimerkki 4

Streptomyces-genomi-DNA:n eristäminen

20 Edellä kuvatun mukaisesti valmistettu vegetatiivi-
nen kasvu 48 tunnin viljelmästä otettiin talteen sentrifu-
goimalla 22 100 x g:ssä 10 minuutin ajan. Solut uudelleen-
lietettiin 10 ml:aan TE-puskuria, 10 mg lysotsyymiä lisät-
tiin ja seosta inkuboitiin 30 °C:ssa 15 minuutin ajan.

25 Sitten lisättiin 1 ml 20-%:ista SDS-liuosta ja sen jälkeen
välittömästi 10 ml fenolilla kyllästettyä TE-liuosta (pH
8) ja 1,5 ml 5 M NaCl-liuosta ja seosta käänneltiin varo-
vaisesti ylösalaisin 20 minuutin ajan. Faasit erotettiin
sentrifugoimalla 12 000 x g:ssä 10 minuutin ajan, minkä
30 jälkeen vesifaasi erotettiin ja siirrettiin puhtaaseen
putkeen. Lisättiin sama tilavuus kloroformia ja seosta
käänneltiin varovaisesti ylösalaisin 10 minuutin ajan.
Faasit erotettiin jälleen sentrifugoimalla 12 000 x g:ssä
10 minuutin ajan, minkä jälkeen vesifaasi poistettiin ja
35 siirrettiin taas puhtaaseen putkeen. Lisättiin varovai-

sesti 2 tilavuutta isopropanolia ja saostunut DNA huuhdottiin ja uudelleenliuotettiin minimitilavuuteen TE-puskuria. RNAasi-A:ta lisättiin loppupitoisuuteen 20 mg/ml ja liuosta inkuboitiin 50 °C:ssa 1 tunnin ajan. Sitten lisättiin proteaasi-K:ta loppupitoisuuteen 100 mg/ml sekä NaCl:ää pitoisuuteen 100 mM ja SDS:ää pitoisuuteen 0,4 % ja seosta inkuboitiin 37 °C:ssa 1 tunnin ajan. Liuosta uutettiin jälleen samalla tilavuudella fenolilla kyllästettyä TE-liuosta (pH 8), minkä jälkeen uutettiin toistamiseen kloroformilla. DNA viimeisestä uutosta huuhdottiin, kun oli lisätty kaksi tilavuutta isopropanolia ja pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti käyttäen absorbanssilukemaa 260 nm:ssä.

Esimerkki 5

Geenikirjaston rakentaminen ja Streptomyces clavuligerus -ekspandaasigeenin sisältävän DNA-fragmentin eristäminen

Aiemmin kuvatusta menettelystä saatua Streptomyces clavuligerus -genomi-DNA:ta pilkottiin restriktioentsyymeillä BamHI ja SalI. Pilkotulla DNA:lla suoritettiin elektroforeesi 0,8-%:isessa agarosigeelissä, kooltaan 1,8 - 2,2 ke:n fragmentit eluoitiin ja ligatoitiin pUC18-DNA:han, jota oli edeltäpäin pilkottu BamHI:llä ja SalI:llä. Ligatointiseoksen laimennoksilla transformoitiin transformoitumiskelpoisia JM109-soluja elektroporaatiota käyttäen (Gene Pulser, Bio-Rad, Richmond, CA). Transformoitumiskelpoiset solut valmistettiin ja elektroporaatio suoritettiin valmistajan suositusten mukaan. Transformointiseos maljattiin LB-maljoille, joissa kasvualusta sisälsi 100 mg/ml ampisilliiniä ja 75 ml 2-%:ista X-Gal-liuosta. Yön yli kestäneen inkuboinnin jälkeen 37 °C:ssa yhdistelmä-DNA-pesäkkeet identifioitiin niiden värittömästä ulkonäöstä, joka johtui plasmidivektorin β -galaktosidaasigeeniaktiivisuuden inaktivaatiosta. Värittömät pesäkkeet noukittiin tuoreelle LB-maljalle, jossa kas-

vualusta sisälsi 100 mg/ml ampisilliiniä. Yön yli kestäneen kasvatuksen jälkeen 37 °C:ssa pesäkkeet siirrettiin nitroselluloosakalvolle ja niitä hybridisoitiin polymeraasiketjureaktiolla valmistettuun koettimeen, joka vastasi julkaistua Streptomyces clavuligerus -ekspandaasigeenisekvenssiä emäksille 52 - 918 [Kovacevic et al., J. Bacteriol. 171 (1989) 754 - 760: ja US-patenttijulkaisu 5 070 020]. Polymeraasiketjureaktiotuotteen leimaus suoritettiin käyttäen satunnaisalukelaajennusreaktiota (³²P)-dCTP:n kanssa ja Oligolabelling Kit -pakkausta valmistajan ohjeiden mukaan (Pharmacia, Piscataway, New Jersey). Hybridisaatioreaktio suoritettiin määrän 10⁶ tuiketta/min radioleimattua koetinta läsnä ollessa seoksessa, jossa olivat pitoisuudet 30 % formamidia, 5X SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M natriumsitraatti, pH 7), 0,1 % SDS:ää, 5X Denhardt-liuos (5 g Ficoll-valmistetta, 5 g polyvinyylipyrrolidonia ja 5 g BSA:ta 500 ml:ssa 50X-varastoliuosta) ja 100 mg/ml vasikan kateenkorvan DNA:ta, 37 °C:ssa yön yli kestäväenä. Useat transformantit hybridisoituivat voimakkaasti koettimeen. Yhden pesäkkeen vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä sisältävän ekspandaasigeenin käsittävän vektorin ja tämä plasmidi nimettiin pFTSO-1:ksi.

Esimerkki 6

Plasmidi-DNA:n eristäminen

Plasmidin sisältäviä E. coli -viljelmiä kasvatettiin 500 ml:ssa LB-lientä (20 g/litra LB Broth Base-valmistetta; Gibco, Paisley, Skotlanti), joka sisälsi 15 mg/ml tetrasykliiniä, pyörivällä ravistelupöydällä, jonka pyörimisnopeus oli 220 kierr./min, 12 - 16 tunnin ajan 37 °C:ssa. Solut pellettoitiin sentrifugoimalla 4 000 x g:ssä 10 minuutin ajan 4 °C:ssa. Solupelletti uudelleen-suspendoitiin 18 ml:aan Glucose Buffer-valmistetta (50 mM glukooosi, 25 mM Tris, pH 8,0, 10 mM EDTA), lisättiin 2 ml 40 mg/ml lysotsyymiliuosta (Sigma, St. Louis, MO) glukosipuskurissa, sekoitettiin ja seosta inkuboitiin huoneen-

lämpötilassa 15 minuutin ajan. Lisättiin vastavalmistettua 0,2 N NaOH-liuosta, jossa oli 1 % SDS:ää, seosta pyöritettiin varovaisesti ja se sijoitettiin jäihin 10 minuutiksi. Sitten lisättiin 30 ml 5 M kaliumasetatiliuosta, pH 4,8, sekoitettiin hyvin ja saatu seos sijoitettiin jäihin vielä 10 minuutiksi. Solujäte pelletoitettiin sentrifugoimalla 4 000 x g:ssä 10 minuutin ajan 4 °C:ssa ja saatu supernatantti suodatettiin sideharsosuodattimen läpi. Kirkastettuun supernatanttiin lisättiin isopropanolia (0,6 tilavuutta) plasmidi-DNA:n saostamiseksi ja sakka muodostui inkuboitessa huoneenlämpötilassa 20 minuutin ajan. Plasmidi-DNA pelletoitettiin 4 000 x g:ssä 20 minuutissa 4 °C:ssa, minkä jälkeen se pestiin 70-%:isella etanolilla ja kuivattiin pikaisesti. Pelletti uudelleensuspendoitiin 9 ml:aan TE-puskuria, minkä jälkeen lisättiin 10 g CsCl:ää ja 0,387 ml 10 mg/ml etidiumbromidiliuosta. Tätä liuosta sentrifugoitiin 313 100 x g:ssä 24 tunnin ajan. Saatu plasmidinauha seesiumkloridigradientissa tehtiin näkyväksi ultraviolettilavalolla ja eristettiin, minkä jälkeen etidiumbromidi poistettiin uuttamalla butanolilla kyllästetyllä vedellä. Plasmidivalmisteen sisältämä CsCl poistettiin sitten dialysoimalla TE-puskuria vastaan, minkä jälkeen lopuksi DNA konsentroitiin PEG:tä (mp. 8 000) käyttäen. DNA:n pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti käyttäen absorbanssilukemaa 260 nm:ssä.

Esimerkki 7

Penicillium-transformointivektorin pPenFTSO rakentaminen

Rakennettiin Penicillium-transformointivektori, jossa oli fleomysiiniresistenssigeeni dominoivana valikointimerkkinä. Tähän päästiin eristämällä ensin 660 ep:n fragmentti, joka sisälsi fleomysiiniresistenssigeenin (fleomysiiniä sitovan proteiinin geeni Streptoalloteichus hindustanuksesta) ja oli myös kytketty hiivasytokromi-C1-päättäjään, plasmidin pUT713 (Cayla, Toulouse Cedex, Rans-

ka) BamHI/BglIII-pilkkomistuotteesta elektroforeettisesti ja eluoimalla agarosigeeleistä. Eristetty fragmentti ligatoitiin vektorin pSELECT*-1 (Promega Corp.) BamHI-kohtaan ja geenin suunta määritettiin restriktioentsyymianalyysillä. Sitten insertoitiin 550 ep:n PstI-fragmentti, joka sisälsi lambda-cos-kohdan ja teki mahdolliseksi vektorin käytön kosmidimuodostuksessa sopivan kokoisten inserttien sisältyessä mukaan. Sitten 1,5 ke:n NcoI/BamHI-fragmentti, joka sisälsi Penicillium chrysogenum -isopenisilliini-N-syntetaasi (IPNS) -geenin promoottorialueen, eristettiin (elektroforeettisesti ja eluoimalla agarosigeeleistä) IPNS-geenin sisältävän genomikloonin NcoI/BamHI-pilkkomistuotteesta. Eristetty IPNS-promoottorifragmentti ligatoitiin BamHI/NcoI:llä pilkottuun vektoriin. NcoI-kohta on fleomysiiniresistenssigeenin ATG-aloituskodonissa. Tämä vektori nimettiin pUTZ-2:ksi.

Streptomyces clavuligerus -ekspandaasigeenin sisältävä 1,645 ke:n fragmentti puhdistettiin pFTSO-1:n (edellä kuvattu vektori) BamHI- ja SalI-pilkkomistuotteesta elektroforeettisesti ja eluoimalla 0,8-%:isesta agarosigeelistä. Eristetty fragmentti ligatoitiin vektoriin pSELECT (Promega Corp.), jota oli myös pilkottu BamHI:llä ja SalI:llä. Tämä vektori nimettiin pFTSO-8:ksi. Uusi NcoI-kohta luotiin ekspandaasigeenin ATG-aloituskodoniin pFTSO-8:n paikkakohdennetulla mutagenisoinnilla käyttäen Altered Sites* in vitro Mutagenesis System -pakkausta (Promega Corp.). Mutagenisointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan. Rakennettiin oligonukleotidi, joka oli komplementaarinen ATG-aloituskodonin DNA-alueen koodaussekvenssiin nähden Streptomyces-ekspandaasigeenin julkaistusta sekvenssistä [Kovacevic et al., J. Bacteriol. 171 (1990) 3952 - 3958]. Oligonukleotidi syntetisoitiin käyttäen syaanietyyliylofosoramidiittikemiala (Pharmacia Gene Assembler -laitteisto) ja oligon sekvenssi oli seuraava:

sekvenssi tunnusno 8:

3' CGAGAGGATCAGTGAGAGTCCATGGACACGACGG 5'

Mutagenisointi vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä. Sitten 1,2 ke:n NcoI-fragmentti, joka sisälsi
 5 Penicillium chrysogenum isopenisilliini-N-syntetaasigeenin promoottorialueen, eristettiin (elektroforeettisesti ja eluoimalla agarosigeeleistä) IPNS-geenin sisältävän genomikloonin NcoI-pilkkomistuotteesta. IPNS-promoottorialue ligatoitiin pFTSO-8-vektoriin uuteen NcoI-kohtaan,
 10 joka oli muodostettu mutagenisoimalla ekspandaasigeenin ATG-aloituskodonia. Promoottorin suunta ekspandaasigeeniin nähden määritettiin restriktioentsyymianalyysillä. Sitten tämä IPNS-promoottori:ekspandaasigeenikasetti siirrettiin BamHI/SalI-fragmenttina BamHI/SalI:llä pilkottuun Penicillium-transformointivektoriin pUTZ-2, jota kuvattiin edellä. Lopullinen rakenne nimettiin pPenFTSO:ksi.

Esimerkki 8

Penicillium-β-tubuliinipromoottorin kloonaminen

Penicillium-β-tubuliinigeeni kloonattiin Penicillium-lambda-genomikirjastosta käyttäen Aspergillus niger
 20 -β-tubuliinigeeniä hybridisaatiokoettimena. Sekventoimalla tämä kloni ja vertaamalla Aspergillus nigerin β-tubuliinigeenin tunnettuun aminohapposekvenssiin identifioitiin 91-%:isesti homologinen, ATG-aloituskodonista alkava alue.
 25 Funktionaalisen promoottorin käsittäviä sekvenssejä eristettiin aloituskodonin ja BamHI-kohdan 1,4 ke ylävirtaan väliltä.

Penicillium-β-tubuliinipromoottorin käsittävän transformointivektorin rakentaminen

Penicillium-β-tubuliinipromoottorin sisältävä 2,0
 30 ke:n XbaI/HindIII-fragmentti ligatoitiin vektoriin pSELECT (Promega Corp.), jota myös oli pilkottu XbaI/HindIII:lla. Uusi NcoI-kohta luotiin ATG-aloituskodoniin paikkakohdenetulla mutagenisoinnilla käyttäen Altered Sites in vitro
 35 Mutagenesis System -pakkausta (Promega Corp.). Mutageni-

sointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan. Rakennettiin oligonukleotidi, joka oli komplementaarinen ATG-aloituskohdasta alueeseen nähden mutta joka sisälsi useita muutoksia NcoI-kohdan luomiseksi, ja käytettiin sitä mutagenisoinnissa. Oligonukleotidi syntetisoitiin käyttäen syaanietyylifosforamiditiikemiaa (Pharmacia Gene Assembler-laitteisto) ja oligon sekvenssi oli seuraava:

sekvenssi tunnusno 9:

5' ATCTCTTTTCTAATACCTTCACCATGGGTGAGATTGTACGTGATCCC 3'

10 Mutagenisointi vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä. Sitten 1,4 ke:n BamHI/NcoI-fragmentti, joka sisälsi Penicillium- β -tubuliinipromoottorin, ligatoitiin rakennettuun NcoI-kohtaan Streptomyces-ekspandaasigeenin ATG:ssä BamHI/NcoI:llä pilkotussa vektorissa pFTSO-8
15 (aiemmin esimerkissä 7 kuvattu vektori). Tämä vektori nimettiin btFTSO-8:ksi. 1,4 ke:n BamHI/NcoI-fragmentti, joka sisälsi β -tubuliinipromoottorin, ligatoitiin myös BamHI/NcoI:llä pilkottuun vektoriin pUTZ-2 (aiemmin esimerkissä 7 kuvattu vektori). Tämä ligatointi sijoitti β -tubuliinipromoottorin suoraan fleomysiiniresistenssigeenin eteen. Tämä vektori nimettiin pCI-6:ksi. Sitten β -tubuliinipromoottoriekspandaasigeenikasetin sisältävä 2,4 ke:n BamHI/HindIII-fragmentti vektorista btFTSO-8 ligatoitiin BamHI/HindIII:lla pilkottuun vektoriin pCI-6, jolloin saatiin
20 lopullinen Penicillium-transformointivektori, jossa Streptomyces-ekspandaasigeeni ja fleomysiiniresistenssimerkki ilmentyivät β -tubuliinipromoottorista. Tämä vektori nimettiin pTS-2:ksi.

Esimerkki 9

30 Penicillium (GAP) -promoottorin kloonauk

Penicilliumin glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasi (GAP) -geeni kloonattiin Penicillium-lambda-genomikirjastosta käyttäen hybridisaatiokoettimena Aspergillus nigerin GAP-geeniä. Neljää mahdollista positiivista kloonaa
35 nia seulottiin edelleen PCR-tuotteella, joka oli muodos-

tettu alukkeista Cephalosporium GAP-geenin 5'-alueelle [Kimura, H., et al., J. Ferm. and Bioeng. 71 (1991) 145 - 150]. Polymeerasiketjureaktion (PCR) alukkeisiin käytetyt oligonukleotidit syntetisoitiin syaanietyylifosforamidiit-

5 tikemiaa käyttäen (Pharmacia Gene Assembler -laitteisto) ja oligosekvenssit olivat seuraavat:

sekvenssi tunnusno 10:

5' CGCGGATCCCGGCATCAACGGCTTCGGTCGTAT 3'

sekvenssi tunnusno 11:

10 5' CGCGGATCCGGGCACGCGCATGGACATGCCAGTG 3'

Yksi neljästä oletetusta positiivisesta kloonista ristihybridisoitui PCR-tuotteeseen. 4 ke:n BamHI-fragmentti tästä genomikloonista ligatoitiin BamHI:llä pilkottuun vektoriin pSELECT (Promega Corp.) sekventointia varten.

15 Tämä vektori nimettiin pTS-0:ksi. Sekventoimalla tämä fragmentti identifioitiin ATG-aloituskodoni vertaamalla kefalosporiini-GAP-geenin tunnettuun sekvenssiin.

Penicillium-GAP-promoottorin käsittävän transformointivektorin rakentaminen

20 Penicillium-GAP-promoottorin rakentamiseksi Streptomyces-ekspandaasigeenin yhteyteen luotiin uusi NcoI-koh-
ta Penicillium-GAP-geenin ATG:hen käyttämällä paikkakoh-
dennettua mutagenisointia in vitro sekä vektoria pTS-0. Mutagenisointi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan.

25 Oligonukleotidi rakennettiin komplementaariseksi GAP-geenin ATG-aloituskodonin DNA-alueen koodaussekvenssiin nähden, jolloin se kuitenkin sisälsi emäsmuutoksia NcoI-kohdan luomiseksi. Oligonukleotidi syntetisoitiin käyttäen syaanietyylifosforamidiittikemiaa (Pharmacia Gene Assembler -laitteisto) ja oligon sekvenssi oli seuraava:

30

sekvenssi tunnusno 12:

5' CAGTAAACGCAACCATGGTTGTCCAG 3'

Mutagenisointi vahvistettiin restriktioentsyymianalyysillä. Sitten GAP-promoottorin sisältävä 1,9 ke:n

35 NcoI/ BamHI-fragmentti pTS-0:sta ligatoitiin NcoI/-

BamHI:llä pilkottuun vektoriin pFTSO-8 (aiemmin esimerkiksi 7 kuvattu vektori) GAP-promoottorin sijoittamiseksi Streptomyces-ekspandaasigeenin yhteyteen. Tämä vektori nimettiin pTS-0-1:ksi. Sitten GAP-promoottori:ekspandaasikasetin sisältävä 3,0 ke:n BamHI/HindIII-fragmentti vektorista pTS-0-1 ligatoitiin BamHI/HindIII:lla pilkottuun vektoriin pCI-6 (aiemmin esimerkissä 8 kuvattu vektori), jolloin saatiin lopullinen Penicillium-transformointivektori pSD-1, jossa Streptomyces-ekspandaasigeeni ilmentyi GAP-promoottorista.

Esimerkki 10

Penicillium chrysogenumin transformointi

Protoplasteja edellä kuvatusta Penicillium chrysogenum -kannasta muodostettiin ympäällä 50 ml CM-lientä 1×10^7 itiöillä 67 tunnin ajan 25 °C:ssa pyörivällä ravistelupöydällä, jonka pyörimisnopeus oli 220 kierr./min. Myseeli otettiin talteen suodattamalla sideharsosuodattimille, se siirrettiin 500 ml:n kolveihin ja uudelleensuspendoitiin 25 ml:aan KMP:tä (0,7 M KCl, 0,8 M mannitoli, 0,02 M KPO_4 , pH 6,3), joka sisälsi 100 mg Novozyme 234-valmistetta (Novo BioLabs, Bagsvaerd, Tanska), ja inkuboitiin 30 °C:ssa ravistelijan pyörimisnopeuden ollessa 100 kierr./min. Sferoplastit erotettiin suodattamalla sideharso/lasivillasuodattimien läpi ja ne pellettoitiin sentrifugoimalla 350 x g:ssä 10 minuutin ajan. Sitten sferoplastit pestiin 3 kertaa 10 ml:lla KMP-puskuria, minkä jälkeen ne uudelleensuspendoitiin KMPC:hen (KMP, jossa on pitoisuus 50 mM $CaCl_2$) pitoisuudeksi 5×10^7 solua/ml ja jätettiin huoneenlämpötilaan 20 minuutiksi. Penicilliumin transformoimiseksi 200 ml sferoplastisuspensiota lisättiin DNA:han (5 mg vektori-DNA:ta 6,2 ml:ssa KMPC:tä sekä 5 mg/ml hepariinia) 50 ml:n PPC:tä ohella (40 % PEG:tä, mp. 3 500, 20 mM KPO_4 , pH 6,3, 5 % $CaCl_2$:ta lisättiin juuri ennen käyttöä) ja transformointiseosta inkuboitiin jäissä 30 minuutin ajan. 1 ml vastavalmistettua PPC:tä lisättiin

ja seos siirrettiin 50 ml:aan sulatettua (50 °C) regenerointiagarua (CM, jossa oli pitoisuus 1,3 M mannitoli ja 3 % agarua). Transformointiseos jaettiin sitten 5 petri-maljaan. 24 tunnin regeneroinnin jälkeen 25 °C:ssa maljoille sijoitettiin sitten OL-kerros (1 % peptonia 1-prosenttisessa agarissa), joka sisälsi 100 mg/50 ml OL:ää fleomysiiniä. Kerroksen määrä oli sama kuin regenerointi-agarin määrä. Maljoja inkuboitiin 25 °C:ssa 7 - 14 päivän ajan ja tarkkailtiin transformanttipesäkkeiden muodostumista.

Esimerkki 11

Adipoyyli-6-APA- ja adipoyyli-7-ADCA-fermentointituotteiden HPLC-määritykset

Korkeapainenestekromatografiaa (HPLC) käytettiin käytetyn ei-transformoidun P. chrysogenum -kannan adipoyyli-6-APA-tuotannon sekä käytetyn transformoidun P. chrysogenum -kannan adipoyyli-7-ADCA-tuotannon määrittämiseksi. Analyysi suoritettiin käyttäen Waters-systeemiä, jossa oli 625-liuotinkuljetussysteemi, 220 nm:iin ja 254 nm:iin asetettu vaihtuva aallonpituuksinen 490E-detektor, 825-Maxima-tietosysteemi ja Novo-C18-kolonne stationaarifaasina. Liikkuva faasi (virtausnopeus 1 ml/min) käsitti 5 minuuttia isokraattisesti 2 % metanoli/98 % 0,010 M KH₂PO₄-seosta, pH 7,0, ja 15 minuutissa lineaarisen gradientin 2 → 40 % metanoli/0,010 M KH₂PO₄-liuos, pH 7,0. Adipoyyli-6-APA määritettiin kvantitatiivisesti käyttäen penisilliini-N-standardin standardikuvaajaa 220 nm:ssä ja adipoyyli-7-ADCA määritettiin kvantitatiivisesti käyttäen deasetoksi-kefalosporiini-C-standardin standardikuvaajaa 254 nm:ssä.

Adipoyyli-6-APA:n ja adipoyyli-7-ADCA:n alttiudet penisillinaasikäsittelyille määritettiin lisäämällä 1 yksikkö/ml penisillinaasi-I:tä tai penisillinaasi-III:a suodoksiin ja inkuboimalla huoneenlämpötilassa 10 - 30 minuutin ajan. Nämä näytteet ajettiin edellä kuvattuihin nähden identtisisissä HPLC-olosuhteissa.

Adipoyyli-6-APA- ja adipoyyli-7-ADCA-tuotteiden UV-spektrianalyysit suoritettiin käyttäen Waters-systeemiä, jossa oli 510-liuotinkuljetussysteemi, 990-fotodiodijärjestelmädetektori, 990-tietosysteemi ja Novo-C18-kolonne stationaarifaasina. Käytetty liikkuva faasi oli identtinen edellä kuvattuihin olosuhteisiin nähden.

Adipoyyli-7-ADCA-tuotteen eristäminen suuressa mittakaavassa fermentointitäysliemestä suoritettiin käyttäen Waters-systeemiä, jossa oli 510-liuotinkuljetussysteemi, 990-fotodiodijärjestelmädetektori, 990-tietosysteemi ja preparatiivinen mBondapak C18 -kolonne stationaarifaasina. Liikkuva faasi (virtausnopeus 5 ml/min) käsitti 35 minuuttia isokraattisesti 0,010 M KH_2PO_4 -liuosta, pH 7,0. Adipoyyli-7-ADCA-tuotteen retentioaikaa vastaava absorptiopiikki kerättiin talteen fraktiokerääjää käyttäen.

Esimerkki 12

Bioaktiivisuuden määritykset

HPLC:llä eristettyjen adipoyyli-6-APA- ja adipoyyli-7-ADCA-fermentointituotteiden antibioottisen aktiivisuuden määrittämiseksi käytettiin agar-diffuusiobiomääritystä. 20 ml eristettyä tuotetta sijoitettiin 5 mm:n kiekkoille LB-agarmaljalle [20 g/litra LB Broth Base-valmistetta, 3 % agaria (Gibco, Paisley, Skotlanti)], joka oli ympätty Bacillus subtilis -kannalla ATCC 33677 tai E. coli -kannalla Super Sensitive (saatiin prof. Arnold L. Demainilta, MIT). Bacillus subtilista käytettiin indikaattorikantana adipoyyli-6-APA-tuotteen määrittämiseksi ja E. coli -kanta Super Sensitive käytettiin indikaattorikantana adipoyyli-7-ADCA-tuotteen määrittämiseksi. 15 tunnin inkuboinnin jälkeen 37 °C:ssa indikaattoribakteerin esytyneen kasvun kehä kiekon ympärillä ilmaisi tuotteiden osoittavan bioaktiivisuutta. Verrokkeina tässä kokeessa olivat deasetoksikefalosporiini-C, kefalosporiini-C, penisilliini-V ja penisillinaasia sisältävä tai ei sisältävä agar verrokkina β -laktaamirakenteiden vahvistamiseksi.

Esimerkki 13**RAEV-entsyymimääritykset**

Fermentointitäysliemestä puhdistettua adipoyyli-7-ADCA-tuotetta käytettiin substraattina RAEV-entsyymin
5 (kaupallisesti saatavana valmistajalta RAEV Corp.) spesifisen aktiivisuuden määrittämiseksi. Reaktioseos sisälsi pitoisuudet 10 mM substraatti, 1 mg RAEV-entsyymiä, 5 % glyserolia 0,16 M KH_2PO_4 -liuoksessa 50 ml:n kokonaistilavuudessa ja sitä inkuboitiin 37 °C:ssa. 5 ml:n erät otettiin
10 ajankohtina 0, 1, 3, 5, 10, 20 ja 30 minuuttia, niitä laimennettiin lisäämällä 35 ml 0,010 M KH_2PO_4 -liuosta, pH 3,5, ja ne jäädytettiin -70 °C:ssa ennen analyysiä HPLC:llä edellä kuvatuissa olosuhteissa.

RAEV-entsyymin aktiivisuus kolorimetrinen adipoyyli-P-aminobentsoehapposubstraatin suhteen määritettiin
15 käyttäen seosta, jossa olivat pitoisuudet 5 mM substraatti, 8,25 mg RAEV-entsyymiä, 10 % glyserolia 0,065 M KH_2PO_4 -liuoksessa, pH 7,0, 50 ml:n kokonaistilavuudessa, sekä 30 minuutin reaktioaikaa 37 °C:ssa. Reaktio suoritettiin
20 96-kuoppaisella mikrotiitterilevyllä. 50 ml 1 M NaNO_2 -liuoksen 1:100-laimennosta 0,25 M etikkahapossa lisättiin reaktion päättämiseksi ja reaktioseos jätettiin huoneenlämpötilaan 3 minuutiksi. 100 ml liuoksen, jossa
25 oli 10 mg/ml 4-amino-5-hydroksi-2,7-naftaleenidisulfonihapon mononatriumsuolahydraattia vedessä, 1:100-laimennosta 0,5 M NaHCO_3 -liuoksessa lisättiin ja värin kehittymistä tarkasteltiin välittömästi 515 nm:ssä käyttäen EL 312 Bio-kinetics Plate Reader -laitetta (BioTek Instruments).

Esimerkki 14**HPLC-määritys RAEV-entsyymireaktiotuotteelle**

Kaikki HPLC:llä analysoidut RAEV-entsyymi (kaupallisesti saatavana valmistajalta RAEV Corp.) -määritykset adipoyyli-7-ADCA-substraattia käyttäen suoritettiin käyttäen
35 Waters-systeemiä, jossa oli 625-liuotinkuljetussys-

teemi, vaihtuva aallonpituuksinen 490E-detektor, joka oli asetettu 203 nm:iin ja 254 nm:iin, 825-Maxima-tietosysteemi ja Novo-C18-kolonne stationaarifaasina. Liikkuva faasi (virtausnopeus 1 ml/min) käsitti 5 minuuttia isokraattisesti 2 % metanoli/98 % 0,010M KH_2PO_4 -seosta, pH 3,5, ja 15 minuutin lineaarisen gradientin 2 → 40 % metanoli/0,010 M KH_2PO_4 -liuosta, pH 3,5. Reaktiotuotteen retentioajan tarkkailemiseksi käytettiin 7-ADCA-standardia. Reaktiotuote laskettiin kvantitatiivisesti käyttäen 7-ADCA-standardin standardikuvaajaa 254 nm:ssä.

Esimerkki 15

Adipoyyli-7-ADCA-fermentointituotteen ^{13}C -NMR-analyysi

^{13}C -NMR (leveä nauha protoni-erotus) -spektri saatiin 75,4 MHz:ssa (7.1T) käyttäen IBM-AF-350-spektrometriä Fourier Transform -muodossa. Näytteet koostuivat 50 mg:sta adipoyyli-7-ADCA-tuotetta fermentointiliemestä 0,5 ml:ssa D_2O -valmistetta (99,8 % D :tä, Aldrich), tai 0,5 ml:ssa $\text{DMSO}-d_6$:ta (99,0 % D :tä, Aldrich) 5 mm:n putkissa 350 °K:ssa. NMR-tulokset vahvistivat tuotteen adipoyyli-7-ADCA:ksi.

Esimerkki 16

Vaihtoehtoisten adipoyyliasylaasientsyymien tutkiminen

Tutkimusten RAEV-entsyymillä lisäksi adipoyylisivuketjun poistuminen adipoyyli-7-ADCA:sta (ja muista adipoyyliyhdisteistä) osoitettiin lukuisilla erilaisilla mikrobilähteillä tuotetuilla entsyymeillä. Alustavassa tutkimuksessa Pseudomonas sp. -kantoja SE-83 ja SE-495 (talletettu talletuslaitokseen the Fermentation Research Institute, jossa hakunumerot ovat FERM BP-817 ja vastaavasti FERM BP-818) ja Pseudomonas-kantaa SY-77-1 (talletettu talletuslaitokseen the Northern Regional Research Laboratory, jossa hakunumero on NNRL B-8070) kasvatettiin 72 tunnin ajan kasvualustassa, joka sisälsi HyCase SF -val-

mistetta 2,0 % (w/v); mononatriumglutamaattia 0,5 % (w/v);
hiivauutetta 0,5 % (w/v); maissin liotusjauhetta 0,2 %
(w/v); puuvillansiemenöljyä 0,5 % (w/v) ja glutaarihappoa
0,1 % (w/v). Solut otettiin talteen sentrifugoimalla ja
5 pestiin 50 mM fosfaattipuskurilla, pH 8,0; sitten ne uu-
delleensuspendoitiin puskuriin ja ulkomembraaneista teh-
tiin läpäiseviä lisäämällä pieni tilavuus kloroformia.
Sitten solususpensioeriä sekoitettiin adipoyyli-para-nit-
roaniliiniin (ad-PNA) ja inkuboitiin 30 °C:ssa 2 - 18 tun-
10 nin ajan. Inkuboinnin jälkeen seokset tehtiin happamaksi
lisäämällä 10 % (v/v) etikkahappoa. Vapautunut p-nitroani-
liini todettiin sitten kolorimetrisin keinoin seuraten sen
muuttumista diatsoyhdisteeksi käyttäen Sigma Chemical Com-
panylta pakkauksen muodossa hankittuja reagensseja gamma-
15 glutamyylitransferaasin määrittämiseksi (Sigma tuotenro
545-A). Kyseisten kolmen kannan suhteelliset aktiivisuudet
olivat 100 %, 85,5 % ja 48 % SE-495:lle, SE-83:lle ja vas-
taavasti SY-77-1:lle. Käyttäen samanlaisia menetelmiä kuin
kuvattiin edellä RAEV-entsyymille osoitettiin myös SE-83-
20 ja SE-495-entsyymien aktiivisuus adipoyyli-7-ADCA:n suh-
teen. Koska SY-77-1 tuotti β-laktamaasia, tämän kannan de-
asyloivaa aktiivisuutta adipoyyli-7-ADCA:n suhteen ei voi-
tu osoittaa.

Samankaltaisin keinoin osoitettiin adipoyyliasy-
25 laasituotanto myös kahdelle sienikannalle (Alternaria sp.
MA-133, ATCC nro 20492 ja Aspergillus sp. MA-13, ATCC nro
20491; ks. Meiji Seika Kaisha Ltd.:n US-patenttijulkaisu
4 141 790) ja kolmelle muulle bakteerikannalle (Brevibac-
terium, ATCC nro 14 649; ja Achromobacterium, ATCC nro
30 14 648 ja Flavobacterium, ATCC nro 14 650), joita kuvat-
tiin kefalosporiini-C-asylaasituottajiksi Merck & Co.,
Inc.:n US-patenttijulkaisussa 3 239 394.

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: Conder, Michael J.
McAda, Phyllis and
Rambosek, John
- 5 (ii) TITLE OF INVENTION: NOVEL BIOPROCESS FOR PREPARING 7-ADCA
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 12
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
10 (A) ADDRESSEE: Merck & Co., Inc.
(B) STREET: 126 E. Lincoln Avenue
(C) CITY: Rahway,
(D) STATE: New Jersey
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 07065
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
15 (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 07/757,879
(B) FILING DATE: 11-SEP-1991
(C) CLASSIFICATION:
- 20 (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: Speer, Raymond M.
(B) REGISTRATION NUMBER: 26,810
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: [07/757,879] 18532
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
25 (A) TELEPHONE: (908) 594-4481
(B) TELEFAX: (908) 594-4720

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
30 (A) LENGTH: 14 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: double
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

TCTAGACACC ATGG

14

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- 5 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

10

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

GTGAGAGTTG ATGGAC

16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3:

- 15 (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)
- 20

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

TCTAGACACT ATGGAC

16

25 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 16 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: double
 (D) TOPOLOGY: linear
- 30 (ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4:

TCTAGACACC ATGGAC

16

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

5

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

10 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:5:

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

Leu Leu Leu Gln Asn Pro
20

15 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 22 amino acids
- (B) TYPE: amino acid
- (C) STRANDEDNESS: single
- (D) TOPOLOGY: linear

20

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:6:

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

25

Leu Leu Leu Gln Asn Pro
20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 22 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

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

10 Ile Leu Ala Gly Asp Pro
 20

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 34 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

15

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

20 (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

CGAGAGGATC AGTGAGAGTC CATGGACACG ACGG

34

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 47 base pairs
 (B) TYPE: nucleic acid
 (C) STRANDEDNESS: single
 (D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

30

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

ATCTCTTTTC TAATACCTTC ACCATGGGTTG AGATTGTACG TGATCCC

47

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 33 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

5

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

CGCGGATCCC GGCATCAACG GCTTCGGTCG TAT

33

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11:

10

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 34 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

15

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:11:

CGCGGATCCG GGCACGGCGCA TGGACATGCC AGTG

34

20 (2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:12:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 26 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear

25

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:12:

CAGTAAACGC AACCATGGTT GTCCAG

26

30

Patenttivaatimukset

1. Uusi biomenetelmä 7-aminodesasetoksiskefalosporaanihapon (7-ADCA) valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

5 1) isopenisilliini-N:ää tuottavaa Penicillium chrysogenum -kantaa pidetään sen kasvua ylläpitämään kykenevässä kasvualustassa ja mainittuun kasvualustaan lisätään adipaattiravinnetta, joka käsittää adipiinihappoa tai
10 sen yhtä tai useampaa suolaa ja esterää, joita mainittu Penicillium chrysogenum -kanta pystyy assimiloimaan ja käyttämään adipoyyli-6-aminopenisillaanihapon (adipoyyli-6-APA) tuottamiseksi, jolloin mainittua adipoyyli-6-APA:aa muodostuu;

15 jolloin mainittu Penicillium chrysogenum -kanta on transformoitu DNA:lla, joka koodittaa mainitun adipoyyli-6-APA:n substraatiksi hyväksymään kykenevän ekspandaasientsyymin aktiivisuutta, jolloin seurauksena sen ilmentymisestä mainitun kannan tuottaman mainitun adipoyyli-6-
20 APA:n rengas laajenee myös sen jälkeen in situ, jolloin muodostuu adipoyyli-7-ADCA:ta; ja

 2) mainittu adipoyyli-7-ADCA saatetaan kosketuksiin adipoyyliasylaasin kanssa, jolloin adipoyylisivuketju poistuu ja muodostuu 7-ADCA-tuote; minkä jälkeen mainittu
25 tuote eristetään.

 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biomenetelmä, jossa adipaattiravinne on dinatriumadipaatti.

 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biomenetelmä, jossa ekspandaasientsyymin aktiivisuutta koodittava DNA on
30 peräisin Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064.

 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen biomenetelmä, jossa adipoyyliasylaasi on peräisin Pseudomonas-lajista.

 5. Yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektori, plasmidi pPenFTSO, joka voi olla integroitu yhdistelmä-Penicillium
35 chrysogenum -kantaan nimeltä PC100, ATCC 74182, kromosomi-

DNA:han ja joka koostuu oleellisesti Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin olevasta ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavasta DNA:sta ja promoottorista, joka ohjaa mainitun ekspandaasiaktiivisuutta koodittavan DNA:n ilmentymistä ja koostuu oleellisesti Penicillium chrysogenum IPNS-geenin promoottorista, jolloin promoottorin ja ekspandaasigeenin liitoskohta käsittää sekvenssin, jonka tunnusnumero on 4 ja fleomysiinimerkin, joka johtaa monikopioiden integraatioiden tai korkean ilmentymistason mahdollistavien paikkojen valintaan.

6. Penicillium chrysogenum -isäntäsolu nimeltä PC100, ATCC 74182, joka on transformoitu yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektorilla, plasmidilla pPenFTSO, joka voi olla integroitu yhdistelmä-Penicillium chrysogenum -kantaan nimeltä PC100, ATCC 74182 kromosomi-DNA:han ja joka koostuu oleellisesti Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin olevasta ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavasta DNA:sta ja promoottorista, joka ohjaa mainitun ekspandaasiaktiivisuutta koodittavan DNA:n ilmentymistä ja koostuu oleellisesti Penicillium chrysogenum IPNS-geenin promoottorista, jolloin promoottorin ja ekspandaasigeenin liitoskohta käsittää sekvenssin, jonka tunnusnumero on 4 ja fleomysiinimerkin, joka johtaa monikopioiden integraatioiden tai korkean ilmentymistason mahdollistavien paikkojen valintaan.

7. Menetelmä, joka käsittää vaiheen, jossa yhdistelmä-DNA-Penicillium chrysogenum -isäntäsolua nimeltä PC100, ATCC 74182, viljellään geeni-ilmentämiseen sopivissa olosuhteissa, jolloin mainittu yhdistelmäisäntäsolu käsittää yhdistelmä-DNA-ilmentämisvektorin, plasmidin pPenFTSO, joka on integroitu mainitun isäntäsolun kromosomi-DNA:han ja koostuu oleellisesti Streptomyces clavuligerus -kannasta ATCC 27064 peräisin olevasta ekspandaasientsyymiaktiivisuutta koodittavasta DNA:sta ja promoottoris-

ta, joka ohjaa mainitun ekspandaasiaktiivisuutta koodittavan DNA:n ilmentymistä ja koostuu oleellisesti Penicillium chrysogenumin IPNS-geenin promoottorista, jolloin promoottorin ja ekspandaasigeenin liitoskohta käsittää sekvenssin, jonka tunnusnumero on 4 ja fleomysiinimerkin, joka johtaa monikopioiden integraatioiden tai korkean ilmentymistason mahdollistavien paikkojen valintaan.

Patentkrav

1. Nytt bioförfarande för framställning av
7-aminodesacetoxikefalosporansyra (7-ADCA), känne-
5 tecknat därav, att man

(1) i ett kulturmedium, vilket är kapabelt att be-
främja dess tillväxt, upprätthåller en stam av Penicillium
chrysogenum, vilken producerar isopenicillin N och i kul-
turmediet inmatar ett adipatmaterial som omfattar adipin-
10 syra, eller ett eller flera av dess salter och estrar,
vilka är kapabla att assimileras och utnyttjas av nämnda
Penicillium chrysogenum-stam för producerande av adipoyl-
6-aminopenicillansyra (adipoyl-6-APA), varigenom adipoyl-
6-APA produceras;

15 varvid nämnda Penicillium chrysogenum-stam trans-
formerats genom DNA som kodar för aktiviteten hos expan-
dasenzymet som förmår acceptera nämnda adipoyl-6-APA som
ett substrat, varefter som ett resultat av dess expression
det av stammen producerade adipoyl-6-APA även ringexpan-
20 deras in situ för bildande av adipoyl-7-ADCA; och

(2) kontaktar nämnda adipoyl-7-ADCA med ett adipoyl-
acylas, varigenom adipoyl-sidokedjan avlägsnas och
7-ADCA-produkten bildas, varefter den nämnda produkten
isoleras.

25 2. Bioförfarande enligt patentkrav 1, känne-
tecknat därav, att adipatmaterialet är dinatrium-
adipat.

3. Bioförfarande enligt patentkrav 1, känne-
tecknat därav, att DNA:et som kodar för aktiviteten
30 hos expandasenzymet deriverats från Streptomyces clavuli-
gerus ATCC 27064.

:

4. Bioförfarande enligt patentkrav 1, känne-
tecknat därav, att adipoylacylaset deriverats från en
Pseudomonas-art.

35 5. Rekombinant DNA-expressionsvektor, plasmid

pPenFTSO, vilken kan vara integrerad i det kromosomala DNA:et av den rekombinanta Penicillium chrysogenum-stammen, vilken benämns PC100, ATCC 74182, och väsentligen består av DNA:et som kodar för aktiviteten hos expandasenzymet som deriverats från Streptomyces clavuligerus ATCC 27064, och en promoter, vilken driver expressionen av det expandasaktivitetskodande DNA:et och väsentligen består av promotern hos Penicillium chrysogenum IPNS-genen varvid föreningspunkten mellan promotern och expandasgenen omfattar sekvensen med ID-nummer 4 och en fleomycinmarkör, som leder till val av integrationer av multikopior eller platser som möjliggör en hög expressionsnivå.

6. Penicillium chrysogenum-värdcell, vilken benämns PC100 ATCC 74182 och transformerats med den rekombinanta DNA-expressionsvektorn, plasmiden pPenFTSO, vilken kan vara integrerad i det kromosomala DNA:et hos rekombinanta Penicillium chrysogenum stammen vilken benämns PC100, ATCC 74182 och väsentligen består av DNA:et som kodar för aktiviteten hos expandasenzymet som deriverats från Streptomyces clavuligerus ATCC 27064, och en promoter, vilken driver expressionen av det expandasaktivitetskodande DNA:et och väsentligen består av promotern hos Penicillium chrysogenum IPNS-genen varvid föreningspunkten mellan promotern och expandasgenen omfattar sekvensen med ID-nummer 4 och en fleomycinmarkör, som leder till val av integrationer av multikopior eller platser som möjliggör en hög expressionsnivå.

7. Förfarande, vilket omfattar ett steg man odlar en rekombinant Penicillium chrysogenum-värdcell, vilken benämns PC100, ATCC 74182, under förhållanden som lämpar sig för genexpression, varvid den rekombinanta värdcellen omfattar den rekombinanta DNA-expressionsvektorn, plasmiden pPenFTSO, som är integrerad i det kromosomala DNA:et hos värdcellen och består väsentligen av DNA:et som kodar för aktiviteten hos expandasenzymet som deriverats från

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064, och en promoter, vilken driver expressionen av det expandasaktiviteten kodande DNA:et och väsentligen består av promotern hos Penicillium chrysogenum IPNS-genen varvid föreningspunkten
5 mellan promotern och expandasgen omfattar sekvensens med ID-nummer 4 och en fleomycinmarkör, som leder till val av integrationer av multikopior eller platser som möjliggör en hög expressionsnivå.