

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810087558.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12P 35/00 (2006.01)

C12R 1/82 (2006.01)

C12R 1/685 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 1 月 28 日

[11] 公开号 CN 101353660A

[51] Int. Cl. (续)

C12R 1/645 (2006.01)

[22] 申请日 1999.5.19

[21] 申请号 200810087558.2

分案原申请号 99806314.2

[30] 优先权

[32] 1998.5.19 [33] EP [31] 98201655.2

[71] 申请人 DSM 公司

地址 荷兰海尔伦

[72] 发明人 M·涅博尔 R·A·L·博温伯格

[74] 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理有限公司

代理人 李 剑

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 4 页

[54] 发明名称

体内生产头孢菌素的改良

[57] 摘要

本发明提供 DNA，能转录、翻译或表达所述 DNA 的异源宿主细胞，以及应用该宿主细胞及其培养物改善酰化头孢菌素的体内生产获得更高的产量的方法。根据本发明，提供宿主细胞，其含有主要定位于宿主细胞的胞质溶胶中（而非主要定位于过氧化物酶体或微体中或上）的具有扩环酶活性的酶。

1. 编码扩环酶的分离的 DNA 片段, 其中所述 DNA 片段在宿主产黄青霉中表达后, 该扩环酶主要存在于所述宿主的胞质溶胶中。

2. 根据权利要求 1 的 DNA 片段, 其中编码 C 末端微体导向信号的核苷酸序列已被修饰。

3. 根据权利要求 2 的 DNA 片段, 其中已经修饰了编码 C 末端三肽序列 X1-X2-X3 的核苷酸序列以充分防止宿主细胞中表达的扩环酶定位于宿主细胞的微体中, 其中 X1 是一个选自丝氨酸、半胱氨酸和丙氨酸的残基, X2 是一个选自赖氨酸、组氨酸和精氨酸的氨基酸残基, 而 X3 是亮氨酸或丙氨酸。

4. 根据权利要求 3 的 DNA 片段, 其中所述 DNA 片段可获自带小棒链霉菌。

5. 根据权利要求 4 的 DNA 片段, 其中编码 C 末端三肽序列丝氨酸-赖氨酸-丙氨酸的核苷酸序列已被修饰以充分防止宿主细胞中表达的扩环酶定位于宿主细胞的微体中。

6. 根据权利要求 5 的 DNA 片段, 其中编码 C 末端三肽序列丝氨酸-赖氨酸-丙氨酸的核苷酸序列已被修饰成编码三肽序列丝氨酸-赖氨酸-天冬氨酸的核苷酸序列。

7. 根据以上权利要求的任意一项的 DNA 片段, 其还包含所述 DNA 在宿主细胞中表达的调节区。

8. 根据权利要求 7 的 DNA 片段, 其中所述宿主细胞选自微生物如

酵母或真菌。

9. 根据权利要求 8 的 DNA 片段，其中所述宿主细胞是产黄青霉。

10. 通过转化，任选为祖细胞的转化，包含可表达形式的根据权利要求 1-9 之任一项的 DNA 片段的宿主细胞。

11. 根据权利要求 10 的宿主细胞，其选自微生物，优选选自产黄青霉、构巢曲霉、黑曲霉和 *Acremonium chrysogenum* 的真菌。

12. 根据权利要求 11 的宿主细胞，其中宿主是产黄青霉的菌株。

13. 含有主要定位于胞质溶胶的功能性扩环酶的根据权利要求 10-12 之任一项的宿主细胞。

14. 包含根据权利要求 10-13 之任一项的细胞的培养物。

15. 制备根据权利要求 10-13 之任一项的宿主细胞的方法，其包括步骤：在所述宿主的转化条件下用根据权利要求 1-9 之任一项的 DNA 接触所述宿主细胞，并选择获得所述 DNA 的细胞。

16. 根据权利要求 15 的制备宿主细胞的方法，其还包括选择扩环酶主要定位于胞质溶胶的细胞。

17. 根据权利要求 16 的方法，其中所述宿主细胞是产黄青霉细胞。

18. 扩展 β -内酰胺化合物的五元环形成六元头孢烯化合物的方法，其包括步骤：将能产生所述 β -内酰胺化合物的宿主在其有利条件下生长，并使所述宿主从编码异源扩环酶的 DNA 片段表达该能扩展所述 β -内酰

胺化合物的五元环的异源扩环酶，以便形成所述六元头孢烯化合物，其特征在于所述扩环酶是从编码主要定位于宿主细胞的胞质溶胶中的扩环酶的 DNA 片段表达的。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述扩环酶之所以主要定位于胞质溶胶，是由于其编码 DNA 片段已被修饰，从而改变了微体导向信号。

20. 根据权利要求 18 或 19 的方法，其中编码所述扩环酶的 DNA 片段可获自带小棒链霉菌。

21. 根据权利要求 18-20 之任一项的方法，其中宿主是产黄青霉。

22. 根据权利要求 18-22 之任一项的方法，其中 β -内酰胺化合物选自苯乙酰基-6-APA、苯氧乙酰基-6-APA、 α -氨基己二酰基-6-APA、己二酰基-6-APA、戊二酰基-6-APA、环庚基-6-APA、庚二酰基-6-APA、或反式- β -氢粘康酰基-6-APA。

23. 制备头孢烯化合物的方法，其包括步骤：采用根据权利要求 18-23 之任一项的方法扩展所述 β -内酰胺化合物的 penam 环，并回收所形成的头孢烯化合物。

体内生产头孢菌素的改良

本发明的领域

本发明属于重组 DNA 技术领域。更具体地，本发明涉及利用遗传修饰的宿主生物生产头孢菌素、如此修饰的宿主生物以及其中使用的 DNA 等领域。本发明还涉及重组 DNA 在所述宿主生物中表达的修饰酶。

本发明的背景

β -内酰胺抗生素构成最重要的一类抗生素化合物，有着长期的临床使用历史。在这一类中，最为突出的是青霉素和头孢菌素。这些化合物分别由丝状真菌例如产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)和 *Acremonium chrysogenum* 天然产生。

作为经典菌株改良技术的结果，在过去数十年中产黄青霉和 *Acremonium chrysogenum* 中抗生素的生产水平已获得了巨大的增加。随着产生青霉素和头孢菌素的生物合成途径的知识增加，以及重组 DNA 技术的出现，已有了新的工具用于生产菌株的改良和这些化合物的体内衍生化。

β -内酰胺生物合成所涉及的大多数酶已被鉴定而且已克隆了其相应的基因，参见 Ingolia 和 Queener, 医学研究评论 (Med. Res. Rev.) 9 (1989), 245-264 (生物合成途径和酶)，和 Aharonowitz, Cohen 和 Martin, 微生物年评 (Ann. Rev. Microbiol.) 46(1992), 461-495 (基因克隆)。

产黄青霉中青霉素生物合成的前两步是三个氨基酸 L-5-氨基-5-羧基戊酸 (L- α -氨基己二酸) (A)，L-半胱氨酸 (C) 和 L-缬氨酸 (V) 缩合成三肽 LLD-ACV，接着该肽环化形成异青霉素 N。该化合物含有典型的 β -内酰胺结构。

第三步涉及 L-5-氨基-5-羧基戊酸的亲水侧链在酰基转移酶的作用下

交换为疏水侧链。由酰基转移酶介导的该酶促交换反应发生在细胞器微体内，参见 EP-A-0 448 180。

头孢菌素比青霉素贵得多。一个原因是，一些头孢菌素（如头孢氨苄）是由青霉素经过许多化学转化形成的。另一个原因是，至今只有带有 D-5-氨基-5-羧基戊酰基侧链的头孢菌素可进行发酵转化。到目前为止，头孢菌素 C 作为这方面最为重要的起始物，在任何 pH 均易溶于水，因此这就意味着需采用烦琐且昂贵的柱技术进行既费时又昂贵的分离程序。以这种方法获得的头孢菌素 C 必须经过许多化学和酶学转化才能形成医药用头孢菌素。

目前工业上偏好的制备中间产物 7-ADCA 的方法涉及导致青霉素 G 扩环和衍生化的复杂化学步骤。制备 7-ADCA 的一个必要化学步骤是五元青霉素环结构扩展为六元头孢菌素环结构（见例如美国专利 4,003,894）。这个复杂的化学处理既昂贵又对环境有害。

因此，人们非常想用酶学反应例如酶学催化，优选体内过程中进行的酶学反应，来替代该化学过程。由体内酶学方法替代该化学扩展方法的一个关键是头孢菌素生物合成途径的中心酶，去乙酰基头孢菌素 C 合成酶（DAOCS），也称为“扩环酶（expandase）”。

发现细菌带小棒链霉菌（*Streptomyces clavuligerus*）的扩环酶在某些情况下可进行青霉素环结构的扩展。当导入产黄青霉时，该酶可体内转化青霉素环结构为头孢菌素环结构，参见 Cantwell 等，Proc. R. Soc. Lond. B. 248（1992），283-289。该扩环酶及其相应的基因 *cefE* 的生物化学和功能特性已进行了很好的分析（EP-A-0 366 354）。*cefE* 基因的物理图谱（EP-A-0 341 892）、DNA 序列和用 *cefE* 在产黄青霉中进行的转化研究也均有描述

扩环酶的另一个来源是例如细菌耐内酰胺诺卡氏菌（*Nocardia lactamdurans*）（以前是耐内酰胺链霉菌（*Streptomyces lactamdurans*））和真菌 *Acremonium chrysogenum*（以前是顶头孢（*Cephalosporium acremonium*））。来自头孢霉属（*Cephalosporium*）的扩环酶是一个双功能酶，具有扩环酶（环扩展）和 3-羟化活性。该酶的生物化学特性和

其基因的 DNA 序列已有描述(分别参见 Cortés 等, *J. Gen. Microbiol.* **133** (1987), 3165-3174; 和 Coque 等, *Mol. Gen. Genet.* **236** (1993), 453-458)。

由于该扩环酶催化青霉素 N 的五元噻唑烷环扩展为 DAOC 的六元双氢噻嗪环, 因此可作为代替化学方法的环扩展步骤的合理候选者。不幸的是, 该酶对头孢菌素生物合成途径的青霉素 N 中间产物起作用, 而对产黄青霉产生的易于获得的廉价青霉素如青霉素 V 或青霉素 G 无效或相对无效。青霉素 N 不能由商业途径获得, 而且即使获得扩展, 其 D-5-氨基-5-羧基戊酰基侧链无法轻易地由青霉素酰基转移酶除去。

近来发现该扩环酶可将带有非天然存在侧链的青霉素转化为相应的 7-ADCA 衍生物。这些侧链包括己二酸 (5-羧基-戊酸) 和各种其它的化合物。正如 EP-A-0 532 341 所公开的, 该扩环酶的这个特性已在一个方法中用于产黄青霉体内生产己二酰基-7-ADCA。以带小棒链霉菌扩环酶转化产黄青霉菌株, 以在给这些转化体供给己二酸时可产生己二酰基-6-氨基青霉烷酸 (己二酰基-6-APA)。接着, 己二酰基-6-APA “扩展” 为己二酰基-7-ADCA。其它各种 7-酰化头孢菌素的生产公开于 WO 95/04148 和 WO 95/04149。在 WO 95/04148 和 WO 95/04149 中, 公开了培养基中加入 3'-羧甲基硫基丙酸和 3,3'-硫代二丙酸可产生能作为扩环酶底物的青霉素, 并分别导致 2-(羧乙基硫基)乙酰基-7-ADCA 和 3-(羧甲基硫基)丙酰基-7-ADCA 的合成。

即使扩环酶对带有不同侧链的青霉素表现出活性, 但这些新青霉素的扩环效率仍低于天然底物青霉素 N 的扩环。这种概念是修饰扩环酶的基础, 目的是改变该酶对己二酰基青霉烷酸的活性。突变扩环酶的应用已公开于 WO98/02551。

青霉素合成的最后一步是 IPN 的 α -氨基己二酰基侧链交换为另一侧链, 该反应发生在酰基转移酶定位的微体中。因此, 为了青霉素的最佳扩环, 扩环酶的优选定位相信是在微体中。这不仅基于扩环酶的底物被认为在微体中产生这一事实, 而且也基于人们希望在微体中扩环酶应当会更好免于蛋白酶降解, 而后者是使用产黄青霉生产酶的已知缺陷 (见

例如, Theilgaard 等, 1997; 产黄青霉的 δ -(L- α -氨基己二酰基)-L-半胱氨酰基-D-缬氨酸合成酶的纯化和特性分析; 生物化学杂志 (Biochem. J.) 327, 185-191)。

EP 0 448 180 提出对参与 β -内酰胺抗生素生产的酶的细胞定位的改变。例如第 7 页的倒数第二段, 提出将差向异构酶和优选随后的头孢菌素生物合成酶如 *Acremonium chrysogenum* 的扩环酶/羟化酶或链霉菌属物种的扩环酶定位于微体, 以改善产黄青霉中的头孢菌素或中间产物的生产效率。其中还证明酰基转移酶 (参与除去酰基-6-APA 侧链的酶) 微体导向信号的去除同时会破坏青霉素的产生。这强烈说明, 除了底物定位原因外还至少为了稳定的原因, 参与 β -内酰胺形成的酶应定位于微体中。

本发明的描述

本发明提供 DNA, 可转录、翻译或表达所述 DNA 的异源宿主细胞, 以及应用该宿主细胞及其培养物改善酰化头孢菌素的体内生产获得更高产量的方法。根据本发明, 提供宿主细胞, 其包含主要定位于宿主细胞的胞质溶胶中 (而非主要位于过氧化物酶体或微体中或上) 的具有扩环酶活性的酶。

在一个优选实施方案中, 本发明提供编码修饰的扩环酶的分离的 DNA 片段, 所述 DNA 片段在产黄青霉宿主中表达后, 该修饰的扩环酶主要存在于所述青霉菌宿主的胞质溶胶中。这种编码修饰扩环酶的 DNA 片段可通过例如修饰编码耐内酰胺诺卡氏菌 (以前的耐内酰胺链霉菌) 和真菌 *Acremonium chrysogenum* 以及其它相关 (即产生头孢菌素/头霉素的) 微生物的扩环酶的 DNA 来获得。

本发明提供编码优选主要定位于异源宿主胞质溶胶中而非微体中的修饰扩环酶的分离的 DNA 片段。在本发明的一个优选实施方案中, 该 DNA 片段可获自带小棒链霉菌的编码扩环酶的 DNA, 并经修饰产生编码在产黄青霉宿主中表达时主要存在于所述青霉菌宿主的胞质溶胶中的扩环酶的 DNA 片段。

该修饰包括通过重组技术克隆编码所述扩环酶的核苷酸序列，但优选包括通过重组技术修饰所述扩环酶的微体或过氧化物酶体导向信号的编码序列。修饰可包括对扩环酶编码核酸序列，优选所述扩环酶的羧基端氨基酸序列的编码序列的单个或多个突变（例如缺失、插入、或倒位）。

在真核生物中，非丝状酵母中蛋白质导向过氧化物酶体或微体的研究已相对清楚。在这些生物中，定位于过氧化物酶体或微体的蛋白质一般含有 C 末端导向序列，一般该氨基酸序列是 S（丝氨酸）K（赖氨酸）L（亮氨酸），或更一般是 S/C/A - K/H/R -L。这样的导向序列，至少在同源环境中，提供蛋白质如酶转运至最终定位处—微体所必需的信号。

对于丝状真菌，例如产黄青霉，蛋白质导向过氧化物酶体或微体的研究相对很少，而且，当采用生物例如酵母或真菌作为宿主细胞翻译甚至表达异源蛋白时，对于蛋白质在异源环境中的导向人们所知甚少。当异源蛋白来源于原核生物例如细菌时尤其如此，因为细菌没有过氧化物酶体或微体之类的细胞器，因此在同源蛋白质中不使用过氧化物酶体导向信号。一般认为，为了异源表达蛋白或酶在宿主中良好地发挥功能，相应的导向信号应至少类似宿主所使用的导向信号以便找到相当的亚细胞定位。

细菌带小棒链霉菌的扩环酶通常含有一 C 端序列 SKA（丝氨酸-赖氨酸-丙氨酸），当所述蛋白在异源环境的真核宿主中表达时，该序列似乎起着过氧化物酶体导向序列的作用。例如，转化了带小棒链霉菌扩环酶的产黄青霉菌株（例如 EP 0532 341A1 中讨论的）显示相应的扩环酶定位在过氧化物酶体中。

已发现，带小棒链霉菌的野生型扩环酶在产黄青霉中重组产生时，显著地积聚在微体中。所述三个氨基酸序列 Ser-Lys-Ala 在产黄青霉中似乎作为微体导向信号，尽管它与酵母的微体导向信号共有序列有些不同。

当将过氧化物酶体导向信号以及防止在过氧化物酶体内定位的信号设计在带小棒链霉菌扩环酶的羧基端或顶头孢扩环酶/水解酶的羧基端时，这种在过氧化物酶体内定位的趋势没有改变，与添加的不同羧基端氨基酸序列无关（Verburg 等，P.35, 108 页，7th Int. Symp. Gen. Industr.

Microorg, 1994, 6月26日-7月1日, Montreal Canada)。

看起来, 该酶携带了有效的导向信号, 致使它定位于, 至少主要定位于异源产黄青霉宿主细胞的微体中。然而, 在本发明的一个实施方案中, 本发明现提供扩环酶的一种有效修饰, 改变定位于微体中的倾向并导致所述扩环酶主要定位于宿主的胞质溶胶中。

定位于微体或过氧化物酶体的倾向由 N 端或 C 端的过氧化物酶体导向信号 (PTS) 决定的, 所述 PTS 的修饰 (N-端或 C-端) 将实质性地阻止这种微体内的定位。该修饰的一个例子是修饰编码羧基端三肽 X1-X2-X3 的核苷酸序列, 例如其中 X1 是选自丝氨酸、半胱氨酸和丙氨酸的一个氨基酸残基, X2 是选自赖氨酸、组氨酸和精氨酸的一个氨基酸残基, 而 X3 是亮氨酸或丙氨酸。该三肽序列还称作 SKL 样肽, 而且该信号的基本序列可是: 首先是一个小氨基酸, 倒数第二是一个碱性残基, C-末端位置是一个大的非极性残基。本发明提供编码扩环酶的 DNA 片段, 其中编码 SKL 样三肽的所述片段已经过修饰或选择, 以便在异源宿主细胞中表达时充分防止该扩环酶在微体中定位并因此使该扩环酶主要定位于所述宿主细胞的胞质溶胶中。

在本发明的一个优选实施方案中, 所述 DNA 获自带小棒链霉菌扩环酶编码 DNA, 最初该 DNA 含有编码羧基端三肽丝氨酸-赖氨酸-丙氨酸的核苷酸序列, 之后该三肽序列被修饰以使该扩环酶表达时主要定位于宿主细胞的胞质溶胶中。该修饰的一个具体实例是本发明的 DNA 片段, 其中丝氨酸-赖氨酸-丙氨酸编码序列已被修饰为丝氨酸-赖氨酸-天冬氨酸编码序列, 或末尾位置的氨基酸已被缺失或由如另一个非疏水残基替代。

还有另一种修饰包括丝氨酸-丝氨酸-天冬氨酸, 或其中倒数第二位氨基酸缺失或由非带正电荷残基替代。

其它的修饰包括该三肽首位的缺失修饰, 以改变由此修饰的蛋白在异源宿主中的轨迹并使其主要定位在所用宿主细胞的胞质溶胶中。

其它修饰包括这三个氨基酸或编码这些羧基端氨基酸的密码子的任意组合的缺失或修饰。

另一方面, 令人惊奇地发现, 采用传统重组 DNA 技术对看起来起微

体导向信号作用的三肽序列 SKA（或如上所解释的其功能性变体）的有意修饰，导致该异源表达酶主要积累在宿主细胞的胞质溶胶中而非微体中。

然而，另一方面，事实上大量存在着蛋白变体，并且现在可以找到含有像这样一类酶如扩环酶的微生物：当所述酶在异源宿主中表达时，其主要定位在所述宿主的胞质溶胶中。尤其是其 C-端序列与上述鉴定的导向序列不同的蛋白质或酶可作为测试胞质溶胶定位和用于筛选以进一步改善头孢菌素产量的候选者。在一个具体的实施方案中，本发明提供在产黄青霉宿主细胞中表达时主要位于胞质溶胶中的扩环酶的编码核苷酸序列，由此使头孢菌素产量超过在微体中或微体上表达相应酶的宿主细胞的头孢菌素产量。

与预期非常不同，本发明提供的酶表现出在微体外的稳定性。本发明提供的扩环酶仍能扩展青霉素甚至那些具有非天然存在侧链的青霉素（见例如 EP 97201196.9 和 EP 97201197.7）成为相应的 7-ADCA 衍生物。

本发明还提供编码本发明提供的修饰或筛选酶的分离的 DNA 片段，所述片段还含有所述 DNA 在真核宿主细胞中表达所需调节区。例如采用本领域的技术可提供具有在多种生物如动物、植物或真菌来源的一或多个宿主细胞中发挥功能的调节区的 DNA 片段。在一个优选的实施方案中，本发明提供编码本发明提供的修饰酶的 DNA 片段，其含有适于在微生物如酵母或真菌来源的宿主细胞中调节表达的调节区。

令人惊奇的是，已发现在转化了主要在胞质溶胶而非微体中积累的扩环酶的宿主细胞中，头孢菌素抗生素（如己二酰基-7-ADCA）的产量增加，而不是降低。甚至当与转化了除微体定位之外其它所有方面均相当的扩环酶的宿主细胞比较时，这也同样正确。

本发明还提供具有编码本发明提供的胞质溶胶定位酶的修饰或筛选的重组 DNA 片段的宿主细胞或宿主生物（或其后代）。这样的宿主生物例如作为所述宿主生物或所述宿主生物的祖先转化的结果，包含一个含有本发明提供的修饰酶的编码核苷酸序列并选择性地含有调节区或序列的 DNA 片段。该宿主优选选自植物和微生物，优选是选自产黄青霉、构巢

曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 或黑曲霉、和顶头孢的真菌。

本发明还提供本发明的宿主细胞或宿主生物的培养物。该培养物含有这样的细胞，其中能将具有（非天然存在）侧链的青霉素扩展为相应的 7-ADCA 衍生物的功能性扩环酶主要位于胞质溶胶中。在一个优选实施方案中，本发明提供大规模发酵的培养物，其中与采用相同来源的野生型扩环酶的同等规模发酵培养物相比，定位于胞质溶胶的修饰扩环酶有助产生更高水平的己二酰基-7-ADCA。

而在另一个实施方案中，本发明提供含有通过重组技术导入的扩环酶的宿主细胞和其培养物，其中经筛选该扩环酶能够或倾向于主要定位于异源宿主细胞的胞质溶胶中，而不论所述扩环酶在同源环境中是否定位在微体中。通过给宿主细胞提供编码扩环酶的 DNA 片段，并检测所述扩环酶是否主要定位在胞质溶胶中，可筛选出这样的宿主细胞。在一个优选实施方案中，正如本说明书的实验部分所阐述的，所述酶的定位检测通过电子显微镜进行。

本发明还提供制备含有编码本发明提供的修饰或筛选酶的修饰或筛选 DNA 片段的宿主细胞或生物的方法，其包括在转化条件下将细胞与本发明提供的 DNA 片段接触，然后筛选获得了所述 DNA 的细胞。宿主细胞例如产黄青霉或其它真菌的转化一般可采用不同的 DNA 传送方法，例如 PEG-Ca 介导的原生质体摄取、电穿孔或粒子枪技术，以及对转化体的筛选来实现。见例如 Van den Hondel en Punt, 丝状真菌的基因和转移及载体的发展 (*Gene and Transfer and Vector Development for Filamentous Fungi*), 《应用真菌分子遗传学》(*Applied Molecular Genetics of Fungi*) (Peberdy, Laten, Ogden, Bennett, 编), 剑桥大学出版社 (1991)。显性和非显性筛选标记的应用已有描述 (Van den Hondel, 见上)。同源 (产黄青霉来源的) 和异源 (非产黄青霉来源的) 筛选标记也已有描述 (Gouka 等, 生物技术杂志 (*J. Biotechnol.*) 20 (1991) 189-200)。

在转化体的筛选中，不同的转化体筛选标记 (同源或异源，有或无载体序列，与或不与非筛选 DNA 物理连接) 的应用是本领域所熟知的。

本发明还提供在宿主细胞中表达扩环酶编码 DNA 片段的方法，其中

所述 DNA 片段编码扩环酶，导致扩环酶产生并且主要定位于胞质溶胶中。在本发明的一个优选实施方案中，该方法包括提供所述 DNA 片段，该 DNA 片段在编码羧基末端氨基酸序列，优选带小棒链霉菌的扩环酶中发现的三肽序列例如 SKA，的核苷酸序列中有修饰。本发明提供的该方法优选与作为宿主的产黄青霉细胞一起使用。

本发明还提供扩展 β -内酰胺化合物的五元环以形成六元头孢烯化合物的方法，其包括步骤：将能产生所述 β -内酰胺化合物的宿主在其有益的条件下生长，并使所述宿主从其编码 DNA 片段表达异源扩环酶，该酶通过重组方法获得并可扩展所述 β -内酰胺化合物的五元环，以形成所述六元头孢烯化合物，其特征在于所述扩环酶由已修饰或筛选的 DNA 片段表达，该 DNA 片段编码产生于或至少主要定位于宿主细胞胞质溶胶中的扩环酶。

在一个优选实施方案中，本发明提供通过修饰的扩环酶扩展 β -内酰胺化合物的五元环的方法，其中所述扩环酶由于其编码 DNA 片段的修饰而定位于宿主细胞的胞质溶胶中，藉此微体导向信号被修饰，其中优选导向信号含有例如可获自带小棒链霉菌扩环酶的三肽氨基酸序列。

在本说明书的实验部分给出了本发明所提供方法的例子，其中所述宿主细胞是产黄青霉。

在本发明的一个优选实施方案中提供了一种方法，其中所述 β -内酰胺化合物选自苯乙酰基-6-APA、苯氧乙酰基-6-APA、 α -氨基己二酰基-6-APA、己二酰基-6-APA、戊二酰基-6-APA，或选自环庚基-6-APA、庚二酰基-6-APA、反式- β -氢粘康酰基-6-APA 或类似化合物。而且，本发明提供制备头孢烯化合物的方法，包括步骤：根据本发明的程序或方法扩展所述 β -内酰胺化合物的五元（penam）环，并回收由此形成的头孢烯化合物。在一个优选的实施方案，本发明提供从大规模发酵宿主细胞培养物中制备头孢烯化合物的方法，其中与通过采用主要定位于微体的同等来源的（野生型或修饰形式的）扩环酶的同等规模发酵培养物制备头孢烯化合物的方法相比，主要定位在所述宿主细胞的胞质溶胶中的扩环酶导致己二酰基-7-ADCA 的更高水平产生。

以下 4 个附图对本发明作了更详细的说明。

附图说明

图 1. 图示质粒 pISEWA。

图 2. 图示质粒 ISEWA-SKD。

图 3. 由质粒 pISEWA (空心柱) 和 ISEWA-SKD (实心柱) 转化获得的大量 (约 80 个) 转化体的己二酰基-7-ADCA 产量。X-轴: 产量级别 (任意单位); Y-轴: 每一级别的转化体百分数。

图 4. 表达野生型扩环酶的转化体 (A 图) 和表达具有非导向信号的扩环酶的转化体的 EM 照片 (SKA->SKD, B 图)。金颗粒显示扩环酶的存在。N: 细胞核, M: 线粒体, P: 过氧化物酶体 (微体)。

实验部分

一般地, 宿主细胞如产黄青霉或其它真菌的转化可通过不同的 DNA 传送方法如 PEG-Ca 介导的原生质体摄取、电穿孔或粒子枪技术, 以及对转化体的筛选来实现。见例如 Van den Hondel en Punt, 丝状真菌的基因和转移及载体的发展, 《应用真菌分子遗传学》(Peberdy, Laten, Ogden, Bennett, 编), 剑桥大学出版社 (1991)。显性和非显性筛选标记的应用已有描述 (Van den Hondel, 同上)。同源 (产黄青霉来源的) 和异源 (非产黄青霉来源的) 筛选标记也已有描述 (Gouka 等, 生物技术杂志 20 (1991) 189-200)。

在转化体的筛选中, 不同转化筛选标记 (同源或异源, 有或无载体序列, 与或不与非筛选 DNA 物理连接) 的应用是人们所熟知的。

用这种方法在产黄青霉, 例如菌株 Wisconsin 54-1255 (保藏在 ATCC, 登记号 28089), 中引入并表达由修饰或筛选的扩环酶介导的环扩展反应。具有改善的 β -内酰胺产量的产黄青霉其它菌株, 包括菌株 Wisconsin 54-1255 的突变体, 也是适合的。

更进一步, 将修饰的 *cefE* 基因置于真菌基因控制元件的转录和翻译控制下。这些元件可获自克隆的真菌基因如产黄青霉的 *IPNS* 或 *pcbC* 基

因、b-微管蛋白基因、构巢曲霉的 *gpdA* 基因、或黑曲霉的 *glcA* 基因。

根据本发明，通过向培养基中加入脂肪酸或其盐或酯，表达扩环酶的产黄青霉转化体可产生 β -内酰胺中间产物己二酰基-7-ADCA。合适的盐例如钠盐或钾盐。己二酰基-7-ADCA 可通过简单的溶剂抽提从培养基中有效回收，例如如下所述：

过滤培养液并在滤出液中加入不与水互溶的有机溶剂。为从水层萃取出头孢菌素需调节 pH 值。pH 的范围必须低于 4.5；优选在 4 和 1 之间，更优选在 2 和 1 之间。用该方法头孢菌素可与发酵液体培养基中存在的许多其它杂质分开。优选使用小体积的有机溶剂，以给出较为浓缩的头孢菌素溶液，由此可实现体积流速的降低。第二个可能的方法是在 pH 值为 4 或更低时萃取整个培养液。优选在 pH 值 4 和 1 之间用不与水互溶的有机溶剂萃取培养液。

任何不干扰头孢菌素分子的溶剂均可使用。适合的溶剂例如有乙酸丁酯、乙酸乙酯、甲基异丁基酮、醇如丁醇等。优选使用 1-丁醇或异丁醇。

此后以 pH 4 至 10，优选 pH 6 至 9 的水反萃取头孢菌素。可再次降低终体积。可在 0 至 50℃ 间进行回收，优选室温。

用合适的酶处理由此获得的头孢菌素水溶液以除去己二酰基侧链并得到所希望的 7-ADCA。

为了能重复使用该酶，优选使用固定化酶。这种粒子的制备和酶的固定化方法详细描述于 EP-A-0222462。水溶液的 pH 值例如 pH 4 至 pH 9，在此 pH 值头孢菌素的降解反应最小而且以该酶进行的所期望的转化最优。因此，在 pH 维持在合适水平时将酶加入头孢菌素水溶液中，pH 的维持可通过例如加入无机碱如氢氧化钾溶液，或使用阳离子交换树脂。当反应完成后，过滤除去固定化酶。另一个可能的方法是将固定化酶用于固定或流化床柱中，或在溶液中使用该酶并通过膜过滤分离产品。随后，在不与水互溶的有机溶剂存在时酸化反应混合物。

合适的酶有例如来源于假单胞杆菌(*Pseudomonas*) SY77 微生物并在 62、177、178 和 179 位的一或多个位置有突变的酶。还可使用其它假单胞杆菌属微生物优选假单胞杆菌 SE83 的酶，该酶可选择性的在相应于假

单胞杆菌 SY77 酶的 62、177、178 和 179 位的一或多个位置有突变。

在 pH 调至约 0.1-1.5 后, 进行分层并将水层的 pH 调至 2-5 之间, 更优选 3-4 之间。然后过滤出 7-ADCA 结晶。

该脱酰基作用还可按本领域已知的化学方法进行, 例如通过在低于 10 °C 时加入五氯化磷并随后在室温或更低温度加入异丁醇, 形成偕氯代亚胺侧链来脱酰基。

以下提供的实施例是作为说明之用而非限制。总体方法包括 i) 参与导向特异性的扩环酶残基的鉴定, ii) 扩环酶蛋白的筛选或突变扩环酶蛋白的构建, iii) 在产黄青霉的表达载体中亚克隆突变或筛选的扩环酶基因, 并在产黄青霉中表达扩环酶, iv) 与 α -D-氨基己二酰基-7-ADCA 和己二酰基-6-APA 的产量相比确定己二酰基-7-ADCA 的产量。

按照与已描述的采用己二酰基侧链的方法类似的方法, 本领域技术人员还可按 WO 95/04148 和 WO95/04149 所公开的方法使用修饰的扩环酶, 这两种方法分别采用 3'-羧甲基硫基丙酸和 3,3'-硫代二丙酸作为侧链, 产生 7-(羧乙基硫基)乙酰基-7-ADCA 以及 3-(羧甲基硫基)丙酰基-7-ADCA 和 2-(羧乙基硫基)乙酰基-7-ADCA 的混合物。

实施例 1

带小棒链霉菌 cefE 基因的定点诱变

扩环酶遗传操作涉及的技术已有充分描述。可用作 PCR 反应模板的原料包括来自公众可得的带小棒链霉菌菌株 (例如 ATCC 27064) 的染色体 DNA 制品, 或表达盒如 pZEx (描述于 PCT/EP97/03879) 和 pISEWA (描述于 EP-02812P)。该扩环酶表达盒 pISEWA (图 1) 含有包括 IPNS 启动子和 AT 终止子的野生型带小棒链霉菌扩环酶基因。为了破坏扩环酶的过氧化物酶体定位, CefE 的 C 末端序列由 SKA 突变为 SKD。为此, 以 pISEWA 为模板, 采用引物 1 和引物 2 (见表 1), 进行 PCR 反应。采用校正聚合酶进行 PCR。变性步骤 (98 °C 2 分钟) 后, 经 25 个循环

(94℃ 1.15 分钟, 55℃ 45 秒, 72℃ 1 分钟)和随后的延伸步骤(72℃ 8 分钟), 扩增 *cefE* 基因的部分。该反应的产物从 *cefE* 的 *StuI* 位点开始 (离翻译起始位点大约 450bp; 见 Kovacevic 等: 带小棒链霉菌编码脱乙酰基头孢菌素 C 合成酶的基因在大肠杆菌中的克隆、鉴定和表达(*Cloning, characterisation, and expression in Escherichia coli of the Streptomyces clavuligerus encoding desacetoxyccephalosporin C synthetase*), 细菌学杂志 (*J. Bacteriol.*), 171, 754-760, 1980) 至终止密码子下游的 *NsiI* 位点。核苷酸测序验证该序列后, 使用该 *StuI*-*NsiI* 片段替换 pISEWA 中的“野生型” *cefE* 片段。由此, 产生质粒 pISEWA-SKD (图 2)。

表 1. 用于构建突变扩环酶的引物。引物 1 中的 *StuI* 位点和引物 2 中的 *NsiI* 位点加下划线。

引物	序列 (5'->3')
1	GAGGCCTTCCTCGACTGCGAGCCG
2	CAAAGATGCATATGCTCGTCATGAAGAG CCTACTAGTCCTTGGATGTGCGGCG

实施例 2
产黄青霉菌株的转化

将 DNA 转移至产黄青霉原生质所涉及的技术是本领域已知的, 在许多参考文献中均有描述, 包括 Finkelstein 和 Ball (编), 丝状真菌的生物技术, 技术和产品 (*Biotechnology of filamentous fungi, technology and products*), Butteworth-Heinemann (1992); Bennett 和 Lasure (编), 真菌的更多基因操作 (*More Gene Manipulations*), Academic Press (1991); Turner, Pühler (编), 生物技术 (*Biotechnology*), 第二次完全修订版, VHC (1992)。按 EP635574 所述使用 Ca-PEG 介导的原生质体转化。由此, 通过与 GBGLA28 (EP635574) 共转化将 pISEWA 和 pISEWA-SKD 结构导入产黄青霉 Wisconsin 54-1255 (ATCC 28089),

从而使产黄青霉转化体可在含有乙酰胺作为唯一氮源的选择培养基上生长。更优选地, 使用具有更强的青霉素产生能力的菌株。例如菌株 CBS 455.95。

实施例 3

筛选; 液体培养

通过在筛选培养基上重复培养来纯化转化体。取单个稳定菌落用于进一步通过生物检测鉴定扩环酶基因的存在。将转化体生长在琼脂培养基上。大肠杆菌 ESS2231 在琼脂覆盖层中用作指示细菌, 该琼脂覆盖层还含有可区分青霉素和头孢菌素产品的 Bacto penase, 其方法是本领域已知的并描述于例如 Guttiérrez 等, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 56-64。如 WO95/04149 所述, 通过采用引物 1 和 2(表)对染色体 DNA 进行 PCR 进一步确证转化体中 *cefE* 基因的存在。筛选出扩环酶阳性转化体, 按照例如 WO95/04149 所述用于进一步筛选产生头孢菌素的能力。按例如 WO95/04149 所述将转化体接种在含有液体培养基的摇瓶中。以 2×10^6 分生孢子/ml 将转化体接种至含有例如如下成分的种子培养基中 (g/l): 葡萄糖, 30; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10; KH_2PO_4 , 10; 微量元素溶液 I ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; Na_2SO_4 , 50; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5), 10 (ml/l) (灭菌之前 pH 6.5)。

将该种子培养基在 25-30°C 孵育 48-72 小时, 然后用于接种 10-20 倍体积的含有如下成分的生产培养基 (g/l): 乳糖, 80; CaSO_4 , 4; 尿素, 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; KH_2PO_4 , 7; NaCl , 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; 己二酸, 2-5; 微量元素溶液 II ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2; Na_2SO_4 , 50), 10 (ml/l) (灭菌之前 pH 5.5-6.0)。然后接着培养 96-120 小时。生长良好的培养物的滤液用 HPLC 和 NMR 分析己二酰基-7-ADCA 的产生。如图 3 所示, 含有主要定位于胞质溶胶的扩环酶的转化体显著优于含有定位于微体的扩环酶的转化体。

实施例 4

扩环酶的定位

为了评价扩环酶 C 端的突变导致扩环酶向过氧化物体转运的阻断, 采用了电子显微镜。按 Waterham 等, 细胞生物学杂志 (J. Cell Biol.) 172: 737-749 (1994) 所述程序将样品用戊二醛固定。采用免疫细胞化学法用抗扩环酶的多克隆抗体进行定位研究。图 4 显示主要在胞质溶胶或微体中积累的扩环酶。

实施例 5

扩环酶突变体在更大规模发酵中的表现

为了确定具有突变扩环酶的转化体在更大规模发酵中的表现, 选取两种转化菌株用于进一步分析。因此, 选取产生的己二酰基-7-ADCA 比选自野生型扩环酶基因转化的转化体多 10% 的突变型扩环酶转化体。当菌株在 10 L 发酵罐生长时, 在扩环酶主要定位于胞质溶胶的培养物中己二酰基-7-ADCA 的量比扩环酶主要定位于微体中的发酵物高。因此, 主要定位于胞质溶胶中的扩环酶显然很稳定, 足以在长期或大规模发酵中保持稳定的生产力和改善的产量。

图 1

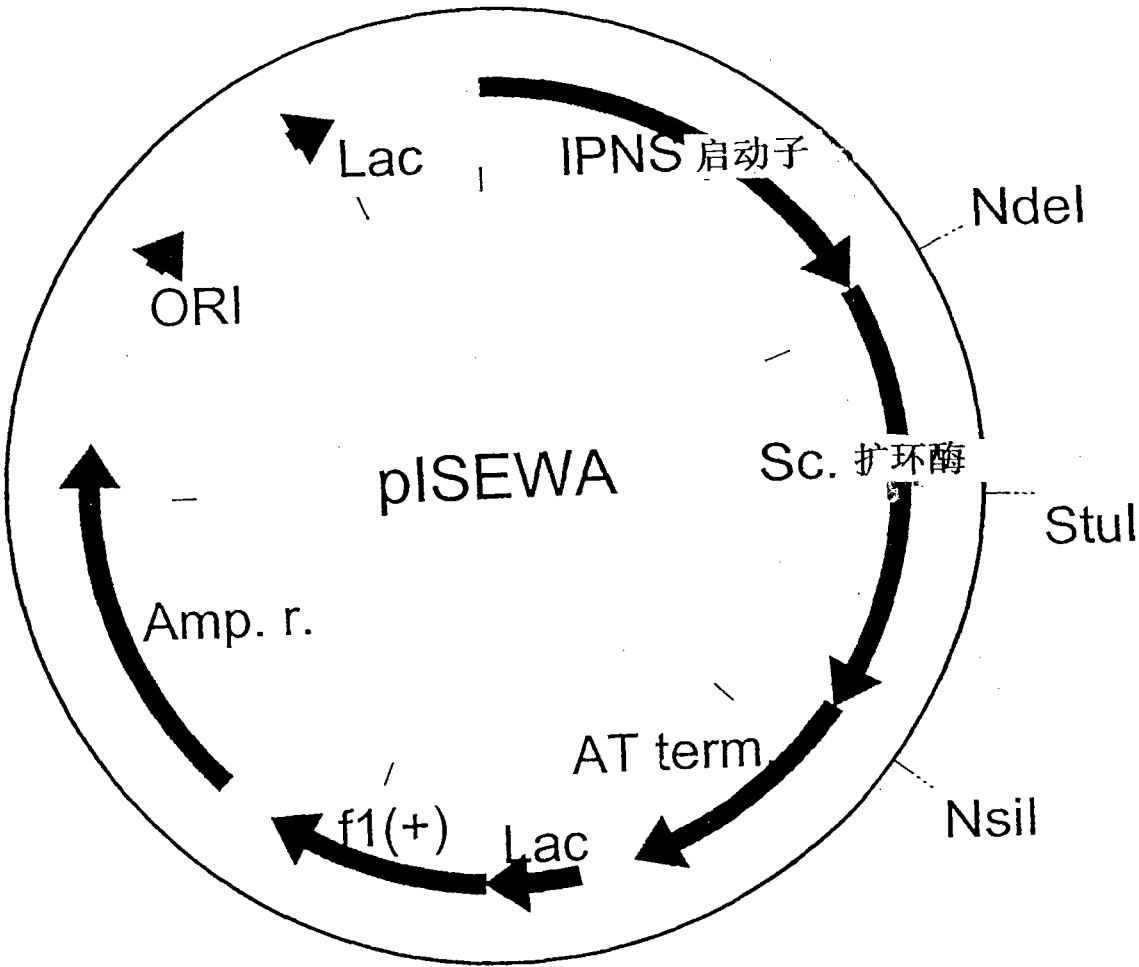


图 2

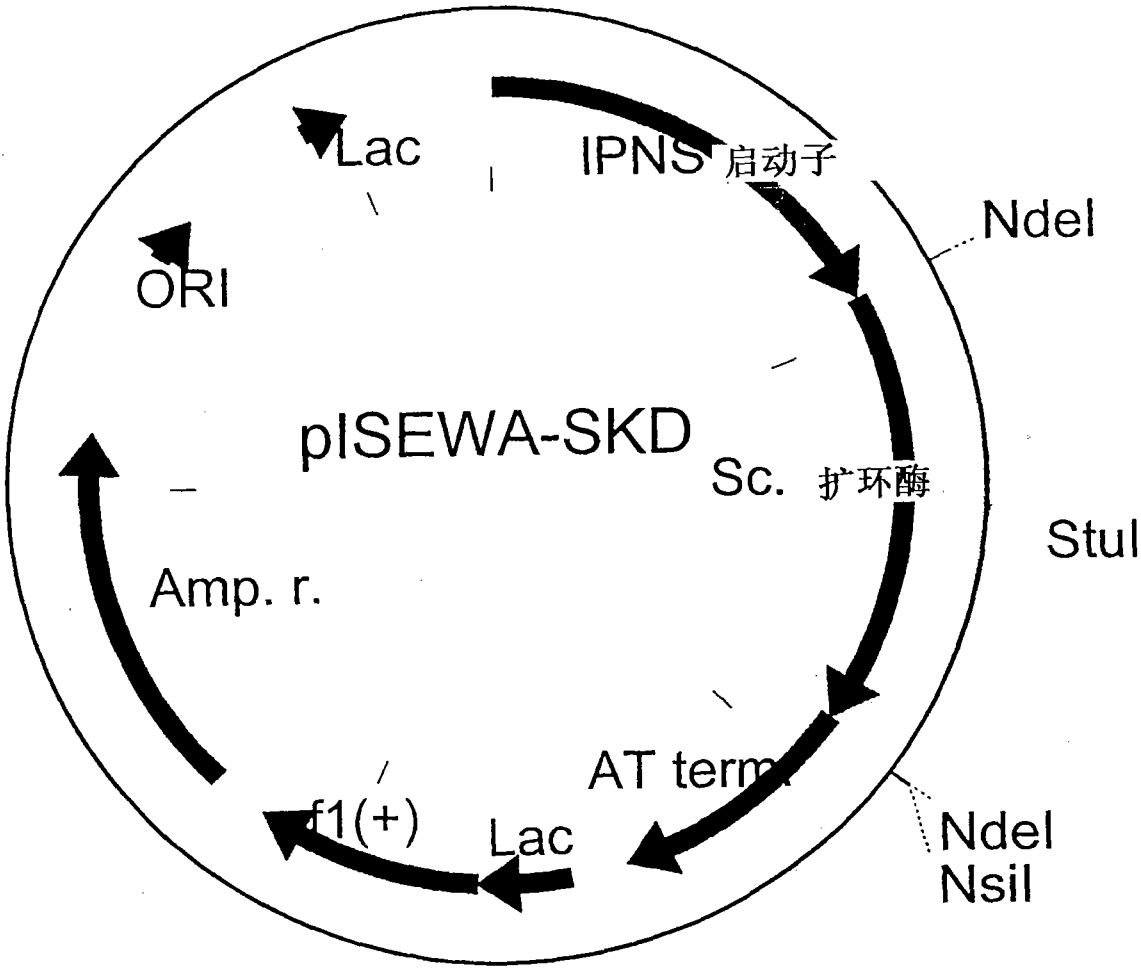


图 3

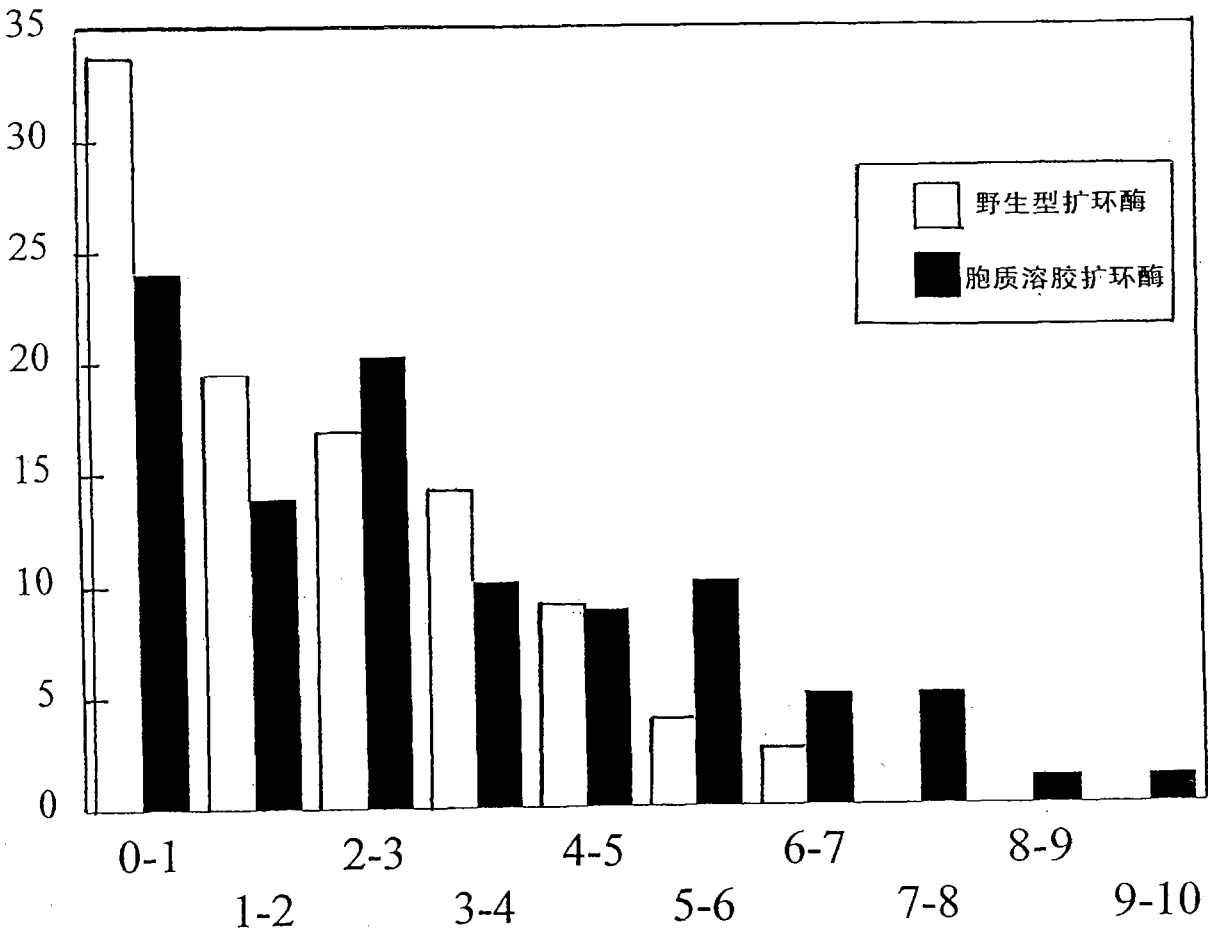


图 4

A

B

