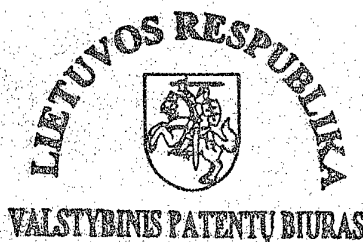


(19)



(10) **LT 3083 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patent numeris: 3083

(51) Int.Cl.⁵: C12N 1/15,
C12P 7/62

(21) Paraiškos numeris: IP328

(22) Paraiškos padavimo data: 1993 02 04

(41) Paraiškos paskelbimo data: 1994 06 15

(45) Patent paskelbimo data: 1994 11 25

(31,32,33) Prioritetas: 07/833496, 1992 02 10, US

(72) Išradėjas:
Jagroop S. Dahlya, CA

(73) Patent savininkas:
NOVOPHARM LIMITED, 30, Nably Court, Scarborough Ontario, M1K 2B4, CA

(74) Patentinis patikėtinis:
Angelė Gurklytė, 2, Patentinių paslaugų centras, UAB, J. Basanavičiaus 11/1, 2600 Vilnius,
LT

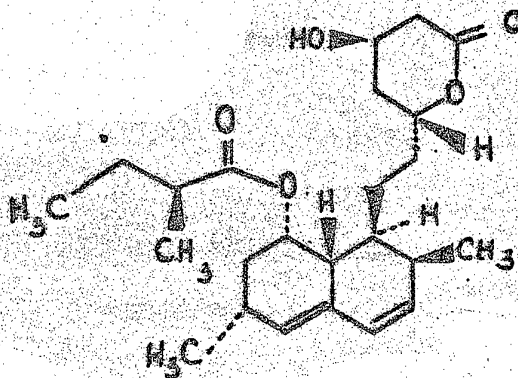
(54) Pavadinimas:
Nauji grybelių kamienai ir jų panaudojimas antibiotikų gamyboje

(57) Referatas:

Lovastatinas yra gaminamas fermentacijos būdu panaudojant grybelinį transformantą, kuris yra gaunamas pernešus DNR iš lovastatiną gaminančio *Aspergillus terreus* kamieno į lovastatiną negaminantį *Aspergillus oryzae* kamieną.

Išradimas liečia grybelinius kamienus, gautus fermentacijos būdu ir jų panaudojimą antibiotikų gamyboje; konkrečiai liečia "Aspergillus" kamienus ir jų panaudojimą gaminant vaistą lovastatiną ir jo analogus.

Lovastatinas yra /IS- [1 α (R*), 3 α , 7 β , 8 β (2S*, 4S*), 8 α /-2-metilbutaninės rūgšties 1,2,3,7,8,8a-heksahidro-3,7-dimetil-8-[2-(tetrahidro-4-hidroksi-6-okso-2H-piran-2-il)-etil] -I-naftalenilo esteris, o jo struktūra gali būti pavaizduota šia chemine formule:



Lovastatino tipo antibiotikai yra metabolitai, kurių sintezei reikia kelių fermentų grupių. Jų gamyba antibiotikus gaminančių mikroorganizmų molekulinio klonavimo būdu reikalauja tiems fermentams atitinkamų genų išskyrimo, analizės ir, galbūt, modifikacijos. Bandymai išskirti tokius genus iš grybelinių rūšių kol kas davė klonus, turinčius arba atskirus grupės genus arba tik nepilnas genų grupes (žr. Malpartida and Hopwood, "Molecular Cloning of the Whole Biosynthetic Pathway of a Streptomyces Antibiotic and its Expression in a Heterologous Host", Nature (1984, 309 pp 462-464).

Lovastatino gavimas fermentacijos būdu, naudojant Monascus ruber grybelinės rūšies kamienus aprašomas Kanados patente Nr. 1129794

Lovastatino gavimas fermentacijos būdu, naudojant Aspergillus terreus grybelinės rūšies kamienus, aprašomas kitame Kanados patente Nr. 1161380.

- 5 Tačiau abiejų procesų metu lovastatinas yra gaunamas kartu su dideliais kiekiais kitų, labai panašių cheminių junginių, iš kurių lovastatiną reikia išskirti. Naudojant Monascus ruber, lovastatinas gaunamas kartu su monakolinu J. Naudojant Aspergillus
- 10 terreus, jis gaunamas kartu su dihidrolovastatinu ir hidroksi-rūgštimi. Hidroksi-rūgštis gali būti lengvai laktonizuojama į lovastatiną, tačiau nuo jo reikia atskirti dihidrolovastatiną.
- 15 Šio išradimo tikslas yra pateikti genetiškai sukurtus mutantinius grybelinius kamienus, kuriuos galima būtų panaudoti lovastatino gamyboje fermentacijos būdu, ir pateikti lovastatino gavimą fermentacijos būdu, pašalinant aukščiau minėtus trūkumus.
- 20 Pagal vieną iš šio išradimo krypčių yra gaunami Aspergillus geno atitinkamų rūšių nauji mutantiniai grybeliniai kamienai, galinantys išreikšti ir išskirti lovastatiną. Tie kamienai turi funkcionaliniame sąryšyje lovastatiną gaminančių fermentų grupės genus,
- 25 išvestus iš lovastatiną gaminančio Aspergillus terreus kamienų DNR. Jie yra gaminami DNR protoplasto transformacijos procese iš lovastatiną duodančio Aspergillus terreus kamieno, taip pat turinčio atitinkamą atrinkimo žymę, su kita, lovastatino neduodančia Aspergillus rūšimi, parinkta iš A.oryzae, A.fumigatus, A.niger, A.nidulans ir A.flavus. Transformantų atranka vykdoma pagal atrinkimo žymę; lovastatiną duodantys transformantai yra
- 30 identifikuojami ir išskiriami, o po to subklonuojami.
- 35

Pagal kitą išradimo kryptį yra pateikiamas lovastatino gavimo būdas. Jis apima maitinimo terpės fermentavimą su Aspergillus mikroorganizmo transformantu, turinčiu iš Aspergillus terreus išvestų genų, užkodavimą lovastatiną gaminančių fermentų grupei bei taip gaunamo lovastatino išskyrimą. Pagal šį išradimą yra gaunamas lovastatinas su žymiai mažesniais kiekiais teršalų iš dihidrolovastatino ir hidroksirūgšties darinių, negu naudojant Aspergillus terreus.

Šio išradimo transformantų gamybos procese galima naudoti įprastas metodikas gauti protoplastus iš atrinkto, lovastatino negaminančio, Aspergillus kamieno bei įprastas metodikas išgauti DNR iš lovastatiną gaminančio Aspergillus terreus kamieno. Šios metodikos yra gerai žinomos patyrusiems specialistams ir čia jų nereikia detaliai aptarinėti. Protoplasto transformacijos metodika bei procedūros taip pat yra žinomos ir standartinės.

Iš lovastatino negaminančių Aspergillus kamienų dažniausiai pasirenkamas Aspergillus oryzae kamienas, tačiau tai nėra būtina sąlyga tam, kad šio išradimo panaudojimas būtų sėkmingas. Galima naudoti ir kitas Aspergillus rūšis, būtent A.niger, A.nidulans, A.fumigatus ir A.flavus. Pirmenybė A.oryzae rūšiai teikiama dėl jos inertiškumo, su ja lengva ir saugu dirbti laboratorijoje bei gaminant fermentacijos komerciniu mastu.

Kad po protoplasto transformacijos proceso būtų galima atskirti mikroorganizmų transformantus nuo netransformantų, reikia, kad DNR iš A.terreus turėtų atrinkimo žymę. Patyręs darbuotojas turi didelį atrinkimo žymių pasirinkimą ir konkretus parinkimas nėra lemiamas faktorius tam, kad išradimas veiktų sėkmingai. Galima naudoti atsparumo antibiotikams žymes, kaip antai,

ampicilinui, ripamficinui, streptomycinui ir t.t. Gauta transformantų ir netransformantų mišinį galima kultūrinti terpėje su atitinkamu antibiotiku taip, kad išskyrimui išliktų tik tie transformantai, kurie turi atrinkimo žymę.

Patogumo dėlei atrinkimo žyme ypač dažnai pasirenkamas atsparumas cikloheksimidui. Cikloheksimidas slopina proteino sintezę, todėl yra lengva aptikti, ar kultūros sultinyje yra cikloheksimidui atsparus kamienas arba transformantas.

Po transformantų atrankos pagal atrinkimo žymę tirinama, kurie transformantai gali išreikšti ir išskirti lovastatiną. Tik sąlyginai mažas skaičius iš visų transformantų, pagamintų protoplasto transformacijos būdu, turi šią savybę. Jie atpažįstami atskirai auginant standartinės kultūros sultinyje ir tiriant, pvz., chromatografijos (ASSC) pagalba, ar gautoje terpėje yra lovastatino. Tie, kurie davė teigiamą lovastatino buvimo rezultatą, yra subkultūrinami ir auginami, kad duotų lovastatiną gaminančių grybelinių mikroorganizmų Aspergillus geno ir, pageidautina, Aspergillus oryzae rūšies transformantų kolonijas.

Dėl iliustracijos, išradimas yra toliau aprašomas eksperimentų ataskaitose, pateikiamose žemiau.

Fig. 1 grafiškai vaizduoja nesubrendusių grybelinių ekstraktų, pagamintų pagal žemiau aprašytus Pavyzdžio 1 eksperimentus, chromato-grafinę (ASSC) analizę;

Fig. 2 - yra lovastatino mišinio, gauto ir išgryninto iš hidrido kamieno, ^1H -BMR spektras;

Fig. 3 - yra to paties mišinio bendras spektras;

Fig. 4 - vaizduoja naujo transformanto AoAt/NBJ-V morfologines charakteristikas;

5 PAVYZDYS 1

MEDŽIAGOS IR METODAI

10 GRYBELINĖ KULTŪRA - grybeliniai izoliatai Aspergillus terreus ir A.oryzae, naudojami šiame darbe, išskirti iš orchidėjų dirvožemio pavyzdžių, parinktų iš Agriculture Canada, Research Station, Beaverlodge, Alberta, Canada.

CIKLOHEKSIMIDUI ATSPARIŲ MUTANTŲ PARINKIMAS

15 Paauginus abu Aspergilli izoliatų Czapek doks terpėje, turinčioje cikloheksimido (konc. 0,1-5 mM), 6 dienas $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje, kiekvieno izoliato A.terreus ir A.oryzae sporos (10^8) buvo pateiktos ant 10 mM cikloheksimido Czapek doks terpės (50 ml) ir inkubuojamos 30 min., centrifuguojamos po 10,000 g 10 min., o po to vėl buvo suspenduojamos steriliame distiliuotame vandenyje. Sporos buvo tris kartus plaunamos maišant ir vėl nusodinamos centrifugavimo būdu. Po to sporos buvo suspenduojamos steriliame 1% Triton X-100 tirpale ir hemocitometru buvo nustatomi jų skaičiai mėginiuose. Atitinkamas skiedinys pateikiamas į 10 mM cikloheksimido atrankos terpę ir po 10 dienų inkubacijos $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje buvo išskirti atsparūs mutantai. Izoliatai buvo tiriami, ar jie gali gaminti lovastatiną. Cikloheksimidui atsparus lovastatinas, gaminantis A.terreus izoliata, buvo atrenkamas tolimesniems transpormacijos tyrinėjimams.

PROTOPLASTO IR DNR RUOŠIMAS

- 5 Aspergillus oryzae ir cikloheksimidui atsparus, lovastatiną gaminančio A. terreus (čia žymimas JAG-4703) izoliatas buvo atskirai kultūrinami 50 ml Czapek doks sultinyje. Kultūros inkubuojamos 58 val. $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje besisukančiame plaktuve (New Brunswick Scientific Inc.) prie 200 aps/min., po to surenkamos ir plaunamos steriliu distiliuotu vandeniu, pakartotinai
- 10 centrifuguojant.
- Abiejų rūšių kultūrų protoplastai buvo gauti naudojant Novozimą 234 (Novo-Nordisk, Novo Alle, DK 2880, Bagsvaerd, Denmark), kad per 12-14 val. ardymo būtų pašalintos ląstelių sienelės. Dažniausiai buvo naudojamas metodas, aprašytas Dickinson and Isenberg, J. Gen. Microbiol. 128, p. 651-654 (1982). Kiekvienos rūšies protoplastų mėginiai regeneravo gyvybingas vienaląstelines sporas su sienelėmis 28°C temperatūroje
- 20 po 24 val. regeneraciniame terpėje (R), turinčioje 0,1 g agarą (Difco) 5 g sorbozės ir 0,35 g EDTA 50 ml distiliuoto vandens kiekyje. Sudygusios sporos turėjo visas savo motininį kultūrų charakteristikas.
- 25 Visas DNR buvo išskirtas iš Aspergillus terreus protoplastų pagal metodiką aprašytą Schlieff and Wensink, "Practical Methods in Molecular Biology", 33, 21-29 (1981). Protoplastai suspenduojami tirpale iš 10 mg/ml SDS, 0,1 M NaCl ir 0,1 M tri-HCl, pH 9,0. Buvo
- 30 pridedamas toks pat kiekis fenolio, prisotinto tris-HCl buferiu. Mišinys centrifuguojamas 10 min. po 12,000 g Eppendorf Centrifuge vamzdyje (Brinkman Instruments, Canada Ltd., Rexdale, Ontario). Viršutinė fazė, turinti DNR, buvo pašalinta, sumaišyta su 95% etanolu, laikoma
- 35 -20°C temperatūroje 60 min., po to 10 min. centrifuguojama kaip ir anksčiau. Gumulas buvo vėl suspenduojamas buferyje, pH 7,0 ir inkubuojamas su

RNaze (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.), apdorota fenoliu, o DNR nusodinama iš vandeningo sluoksnio. Išskirta DNR gryninama adsorbuojant ir plaunant ant DEAE-celiuliozės (DE-52, Whatman), prieš tai išmirkius 10 mM tris-HCl buferyje, pH 7,5 ir 0,3 M NaCl, ir laikoma pastero pipetėje. DNR skiedžiama su 10 mM tris-HCl buferiui, pH 7,5, turinčiu 1,5 M NaCl. Tas tirpalas atskiestas iki 0,2 M NaCl ir DNR nusodinama dviem etanolo kiekiais. DNR grynumas nustatomas iš 200-300 nm spektru, apskaičiuojant A_{260}/A_{280} absorbcijos proporciją. Tiksliai DNR su proporcijomis tarp 1,50 ir 2,00 buvo panaudojamos transformacijose. Šeši pavyzdžiai, kiekvienas turintis 0,1 mg išskirtos DNR, inkubuojami regeneracinėje terpėje, siekiant įsitikinti, ar nėra gyvybingų protoplastų - nė vienas iš jų nedavė jokios kolonijos.

PROTOPLASTO - DNR INKUBACIJA

Apytikriai 5.2×10^4 A.oryzae protoplastų pagal hemocitometrinius paskaičiavimus inkubuojami su 10-100 ng A.terreus DNR 5 ml regeneracinėje terpėje, terpės sudėtis ir regeneracijos procesas aprašyti aukščiau. Siekiant ištirti DNR galimą poveikį cheminei lovastatino išraiškai, 10-100 ng veršio krūtinės liaukų DNR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., U.S.A.), DNR (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, U.S.A.) ir homologiška A.oryzae DNR inkubuojami su panašiais kiekiais A.oryzae protoplastų. Kai DNR buvo įjungta į inkubacijas, protoplasto regeneracija sulėtėjo iki mažiau nei 10% ir panašūs kiekiai taip apdorotų protoplastų (10^5) neparodė jokio atsparumo cikloheksimidui.

LOVASTATINO GAMYBA IR BANDINYS

Sporų, išaugintų inkubuojant A.oryzae protoplastus kartu su A.terreus DNR, suspensija įterpta po 1 ml į 5 lėkštelę į Czapek doks agarą terpę, turinčią 10 mM cikloheksimido. Po 48 val. inkubacijos $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje kultūros išaugo iki 6-8 mm diametro. Kiekviena kultūra išaugo atskirai iš vienos sporos šiomis sąlygomis. Kiekviena kultūra, išaugusi 10 cikloheksimido terpėje, atskirai įterpta į Czapek doks terpės sultinį (50 ml į 500 ml Erlenmeyer kolbą), inkubuojama besisukančiame maišytuve (200 aps./min.) $28 \pm 2^\circ\text{C}$ temperatūroje 12 dienų. Kiekviena auginimo terpė tirinama lovastatino gamybai pagal žemiau aprašytą 15 procedūrą ir chromatografinę (ASSC) analizę.

EKSTRAHAVIMAS

Fermentuotas sultinys (50 ml) parūgštintas 17 N HCl iki 20 pH 4,0, o po to frakcionuotas etilacetatu (100 ml., 3 x). Sujungtos etilacetato frakcijos džiovinamos vakuume 30°C temperatūroje, nuosėdos ištirpintos acetonitrile (5 ml) ir po to pateiktos chromatografiniai (ASSC) analizei.

25

CHROMATOGRAFINĖ (ASSC) ANALIZĖ

Chromatografijos (ASSC) įrangą (Beckman Model 420), susidedančią iš Atex pompų (Model 110 A) ir injekcijos 30 ventilio, parūpino Beckman Instruments, Toronto, Canada. LC-UV detektorius 237 nm bangai. Naudojamas hipersilo C-18 ODS kvarco kolonėlė (25 x 0,46 cm) bei tirpinimo sistema iš acetonitrilo ir vandens (55:45), tėkmės greitis 1,0 ml/min. Pagaminto lovastatino kiekis 35 lyginamas ir apskaičiuojamas pagal sukurta standartinę lovastatino kreivę.

PAVYZDYS 1 - REZUTATAI

- 79 cikloheksimidui atsparūs izoliatai, įskaitant 4 lovastatiną gaminančius izoliatus, gauti iš $5,2 \times 10^5$
- 5 A.oryzae protoplastų, inkubuotų su DNR iš cikloheksimidui atsparaus, lovastatiną gaminančio A.terreus mutanto. Transformacijos eksperimentai vykdomi šešis kartus.
- 10 Rezutatai pateikiami lentelėje 1.

LENTELĖ 1 Cikloheksimidui atsparūs ir lovastatiną išreiškiantys Aspergillus oryzae protoplastai inkubuoti su DNR iš cikloheksimidui atsparaus, lovastatiną gaminančio Aspergillus terreus mutanto

Eksperimentai	Protoplastai, ml	Regeneruotų protoplastų skaičius po protoplasto fuzijos, sk/ml	Regeneracija, %	DNR, (ng)	Lovastatiną gaminančių izoliatų skaičius
I)	7.4×10^5	4.1×10^5	56	100	0
II)	5.2×10^5	3.1×10^5	60	75	2
III)	5.2×10^5	3.7×10^5	72	50	2
IV)	4.0×10^5	2.7×10^5	70	25	0
V)	2.6×10^5	1.5×10^5	65	10	0
VI)	1.6×10^5	1.1×10^5	70	0	0

Viena iš transformuotų kultūrų, AO-11, išlaikė savo transformuotas charakteristikas šešis mėnesius. Fig. 1 iliustruoja ASSC analizę ekstraktų, gautų iš A.oryzae recipiento ir donoro kultūrų ir ekstraktų apdirbtų su A.terreus DNR. Kaip transformuoti izoliatai gamina lovastatiną yra parodyta lentelėje 2.

LENTELE2 Aspergillus oryzae transformuotų izoliatų gamyba Czapek doks sultinyje (pH 6.8).

Izoliatas	Lovastatino kiekis, (mg/l)
AO-I	15,36±1,78
AO-II	26,89±3,76
AO-III	13,46±4,56
AO-IV	9,67±0,75

Izoliatas Nr. AO-I subkultūrinamas penkis kartus ir davė transformantą AoAt -NBJ/5, kuris 1992 II 25 buvo patalpintas į American Type Culture Collection kaip gyvybinga, nekintama kultūra, nuorodos numeris ATCC 74135.

Lovastatinas yra gaunamas kartu su hidroksi-rūgšties analogu, kurį lengva paversti į lovastatiną, pvz., perplaunant toluole, kad būtų baigta laktonizacija ir tokiu būdu padidintas lovastatino kiekis. Šiuose eksperimentuose laktonizacija nebuvo vykdoma.

Lovastatino, pagaminto motininės kultūros A.terreus Czapek doks sultinyje, kiekis sudaro 166,72±5,92 mg/l, o motininė A.oryzae kultūra lovastatino nepagamino.

Fig. 2 vaizduoja ASSC būdu iš hibrido kamieno išgryninto lovastatino mišinio ¹H-BMR spektrą. Lyginant su žinomu, standartiniu lovastatino spektru, šis spektras patvirtina produkto tapatybę.

Fig. 3 yra to paties produkto bendras spektras ir rodo, kad gautas lovastatinas yra 99% grynumo.

DNR koncentracijos nuo 5 iki 20 ng i terpės ml
5 nepaveikė nei A.oryzae protoplastų regeneracinio pajėgumo, nei cikloheksimidui atsparių ir lovastatiną gaminančių izoliatų išgavimo iš inkubacijų su A.terreus DNR. Gauti duomenys rodo, kad tos koncentracijos nebuvo lovastatino gamybą ribojantis faktorius. Panašiai, DNR
10 iš veršio krūtinės liaukų, DNR bei homologiška A.oryzae DNR prie koncentracijų nuo 5 ng iki 5 ng i terpės ml nepaveikė A.oryzae protoplastų regeneracijos, lyginant su neapdorotais kontroliniais pavyzdžiais. Tačiau DNR
15 prie 10 ir 100 ng i terpės ml sulėtino regeneraciją iki atitinkamai maksimalių dydžių 26 % ir 1 %. Toks DNR apdorojimas nedavė lovastatino išraiškos.

Regeneracinė terpė davė protoplastų kiekius, palyginamus su tais, kuriuos gavo Acha et al J. Gen.
20 Microbiol., 45, 515-523 (1966), naudojant sudėtingesnę mineralo terpę. Konidai ir šviežiai sudaiginti konidai davė geresnius gyvybingų protoplastų ir DNR derlius negu micelijos. Pagal šią sistemą, protoplasto regeneracijos metu nebuvo pastebėta ląstelių agregatų
25 formavimosi, aprašyto Acha et al. (1966). Aiškus faktorių, atsakingų už atsparumą cikloheksimidui ir lovastatino išraišką, perėjimas iš A.terreus i A.oryzae rodo tarprūšinę DNR transformaciją. Kartu vykstanti atsparumo cikloheksimidui ir lovastatino gamybos
30 transformacija buvo netikėtai patenkinama ir teikė vilčių, jog genai, susiję su šių charakteristikų išraiška, yra fiziškai artimi ir gali jungtis i grupes.

Naujo transformanto, AoAt-NBJ/5, morfologija yra
35 pavaizduota Fig. 4 ir gali būti apibūdinta tokiu būdu:

AoAt - NBJ/5 MORFOLOGIJA

Konidinės galvutės strypo formos, šviesiai rudos. Konidioforai lygūs, bespalviai. Pūslelės pusrutulio
5 formos, iki pusės ar dviejų trečdalių padengtos
fialidų, išsidėsčiusių dviem sluoksniais. Konidai
rutulio pavidalo arba elipsiniai, jų kolonijos ant
Czapek agaro auga lygiai ir labai greitai, spalva
flokozinė arba švelniai cinamo rusvumo dėl konidų
10 gamybos. Eksudatas oranžinis, atvirkščioji pusė geltona
iki rudumo.

Šie eksperimentai rodo, kad, iš principo, genetiškai
apibrėžtos, vienos grybelinės rūšies antibiotikus
15 gaminančios charakteristikos gali būti išreikštos
kitoje rūšyje.

PAVYZDYS 2 - GAMINIMO BŪDAS

20 Grybelinė kultūra: lovastatino gamybai buvo naudojama
transformuota Aspergillus oryzae (ATCC Nr. 74135)
AoAt/NBJ-V kultūra.

FERMENTAVIMAS

25 Sėklų ruošimas: grybelinė kultūra (liofilizuotas
buteliukas) aseptiškai perkelta ant bulvių dekstrozės
agaro nuožulnumos ir jai leista augti 4-5 dienas 25°C
temperatūroje. Inkubacijos pabaigoje paruošta konidinė
30 suspensija, pridedant 10 ml tritono X-100 (0,01 %)
tirpalo, smarkiai plakant, konidinė suspensija perkelta
ant sterilių ryžių (50 g), laikomų Erlemeyer kolboje
(250 ml talpos). Į kolbą papildomai ipilta 10 ml
sterilaus vandens, smarkiai plakama ir inkubuojama 5-7
35 dienas 28°C temperatūroje. Inkubacijos periodo
pabaigoje ipilta sterilaus vandens (50 ml).

Konidinė suspensija filtruojama per sterilų muslino audeklą ir filtratas (1×10^8 konidų/ml) perpiltas į sėklų fermentuotuvą (50 l talpos), turintį 30 l sėklų terpės. Naudotos sėklų terpės sudėtis buvo tokia:

5

D-gliukozė	20 g/l
Salyklo ekstraktas	20 g/l
Neopeptonas	3 g/l
Krano vanduo	1 l

pH 6,8 (su 10% - NaOH). Terpė sterilizuojama 121°C temperatūroje 30 min. (103 kPa). Sėkloms leista augti 17-20 valandų 28°C temperatūroje (vėdinimo greitis 0.3-0.5 vv/min.) su 80-100 % suskaidytu deguonimi (200 aps./min.).

10

LOVASTATINO GAMYBA

15 Sėklos (30 l) buvo perpiltos į fermentavimo indą (darbinis tūris 1.000 l) su gaminimo terpe. Terpės sudėtis buvo tokia:

Laktozė	60 g/l
Ardamino pH	10 g/l
Sojos proteinas	2 g/l
KCl	2 g/l
KH_2PO_4	0,8 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g/l
Betainas	0,6 g/l
P_{2000}	2 ml
Krano vanduo	1 l

20 pH 6,8 (prieš sterilizavimą, sukoreguota su 105 NaOH/ H_2SO_4), sterilizuoja 121°C temperatūroje viena valandą prie 103-138 kPa.

Po inokuliacijos kultūra auginama 7-8 dienas 28°C temperatūroje su pH kontrole prie 6,0-6,2 (su 10 % H_2SO_4).

- 5 Vėdinimo greitis buvo palaikomas tarp 0,7-1,0 vv/min. (suskaitytas deguonis 80-100 %).

ANTRAS GAMYBOS ETAPAS

- 10 Septynių dienų senumo fermentuotas sultinys (50 l) steriliai perpiltas į sėklų fermentuotuvą (darbinis tūris 2,000 l), turintį 1,500 l sėklų terpės (sudėtis aprašyta aukščiau). Sėkloms leista augti 24 valandas 28°C temperatūroje (200 aps./min., suskaitytas deguonis 80-100 %).
- 15 Sultinys (200 l) buvo steriliai perkeltas į gamybos fermentuotuvą (30,000 l talpos su darbinio tūriu 20,000 l) turintį 18,000 l gamybinės terpės. Kultūrai buvo leista toliau augti 7-9 dienas 28°C temperatūroje su pH kontrole prie 6,0-6,2. Po 60
- 20 valandų fermentacijos pH nebebuvo kontroliuojamas. Į fermentuojamą sultinį buvo pridėta maitinimo terpės (greitis 10 l/val.) penkioms dienoms. Maitinimo terpės sudėtis buvo tokia:

D-gliukozė	285,7 g/l
Ardamino pH	71,4 g/l
Sojos proteinas	14,3 g/l
Krano vanduo	1 l

25

pH 6,8 (prieš sterilizavimą) - sterilizuojama 121°C temperatūroje 30-45 min. Fermentavimo pabaigoje sultinys rūgštinamas iki pH 4,0 su ION-HCl ir centrifuguojamas. Grybelinis briketas džiovinamas 55°C

30 temperatūroje ir ekstrahuojamas.

EKSTRAHAVIMAS IR GRYNINIMAS

- Išdžiovinintas grybelinis briketas (20 kg) homogenizuojamas šaltu etilo acetatu (10-15 min.), o
- 5 homogenizuota medžiaga virinama su grįžtamu šaldytuvu 80°C-85°C temperatūroje 4-6 valandas, atvėsinta medžiaga filtruojama. Filtratas džiovinamas vakuume iki juodos dervingos medžiagos (2,5-3 kg). Juoda dervinga medžiaga sumaišyta su silikageliu (2,5 kg) ir CH_2Cl_2 (5 litrai).
- 10 CH_2Cl_2 išgarintas vakuume, o dervingas medžiagos mišinys su silikageliu išpiltas į stiklinę silikagelio kolonėlę (100 cm ilgio x 22,5 cm diam.), apdorotą su EtOAc : heksanu (1:2). Buvo surinkti pavyzdžiai (2,000 j1, 12x). Po 24 valandų eliuojančio tirpiklio mišinys buvo
- 15 pakeistas į EtOAc : heksaną (1:1) ir leidžiamas dar 24 valandas. Pavyzdžiai, turintys produkto, surinkti, išdžiovinti (280 g) ir kristalizuojami iš metanolio

KRISTALIZAVIMAS

- 20 Geltonas išdžiovinintas produktas (280 g) ištirpinamas 2,8 litro metanolio ir virinamas 40-60 min. 60-65°C temperatūroje. Karštas metanolio mišinys filtruojamas, o filtratas inkubuojamas 4-6 val. 4°C temperatūroje.
- 25 Baltos kristalinės adatėlės atskiriamos nuo motininio tirpalo ir perplaunamos šaltu metanolio. Kristalai išdžiovinami vakuume, pasveriami (190 g) ir laikomi eksikatoriuje 4°C temperatūroje.
- 30 Šiame išradime aprašytas būdas įgalina pasiekti pakankamai dideles lovastatino išeigas, sukeliančias naujojo Aspergillus oryzae transformanto ląstelių sienelių irimą, ir tokiu būdu galima išvengti ląstelių lizavimo stadijos, išskiriant lovastatiną. Tai žymiai
- 35 supaprastina galimo ir gryninimo būdą. Kaip aprašyta anksčiau, lovastatiną pagal šį būdą galima gauti ekstrahuojant tirpiliu be būtinių suformuoti

esterius, druskas ir t.t. gavimo metu. Ekstrahavimas tirpikliu yra žymiai paprastesnis ir ekonomiškėsnis gavimo ir gryninimo būdas negu chromatografja.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Lovastatino gavimo būdas, kurį sudaro maitinimo terpės fermentavimas su transformuotu Aspergillus kamieno grybeliniu mikroorganizmu, atrinktu iš rūšių A.oryzae, A.niger, A.nidulans, A.fumigatus ir A.flavus - grupės, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ši kamieną transformuoja taip, kad jis turėtų svetimos DNR užkodavimą fermentų grupei, galinčiai sintetinti lovastatiną, su atrinkimo žyme, bei lovastatino išskyrimu iš maitinimo terpės.
2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformuotas mikroorganizmas turi svetimą DNR, išvestą iš lovastatiną gaminančios Aspergillus terreus rūšies.
3. Būdas pagal 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minėtas Aspergillus kamienas yra rūšies A.oryzae kamienas.
4. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad svetima DNR, įvesta į transformantą, turi cikloheksimidui atsparių genų, kaip atrinkimo žymę.
5. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad transformantas yra AoAt - NBJ/5 taip, kaip čia aprašyta ir apibrėžta.
6. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima papildomą hidroksi-rūgšties analogo laktonizacijos stadiją, o tas hidroksi-rūgšties analogas fermentacijos procese pavirsta į lovastatiną.

7. Būdas pagal bet kurį ankstesnį punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad lovastatiną (išskiria
ekstrahuojant tirpikliu.

5 8. Grybeliniai transformantai, galintys sudaryti
fermentų, pajėgiančių sintetinti lovastatiną, grupę,
yra Aspergillus rūšies kamienai, atrinkti iš A.oryzae,
A.niger, A.nidulans, A.fumigatus ir A.flavus, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad turi svetimą DNR su genu
10 užkodavimu fermentų grupei, sugebančiai sintetinti
lovastatiną.

9. Grybeliniai transformantai pagal 8 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad Aspergillus rūšis atrenkama
15 iš A.oryzae, A.niger, A.nidulans ir A.fumigalis.

10. Grybeliniai transformantai pagal 9 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo; kad Aspergillus rūšis yra
A.oryzae.

20 11. Grybeliniai transformantai pagal 8 punktą, b e s i s -
k i r i a n t y s tuo, kad svetima DNR yra gaunama iš
Aspergillus terreus rūšies lovastatiną išreiškiančio
kamieno.

25 12. Grybeliniai transformantai pagal 10 ir 11 punktus,
b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad apima visą DNR iš
minėto A.terreus kamieno i minėtą A.oryzae kamieno
protoplasto transformacijos produktą.

30 13. Grybeliniai transformantai, pagal 8-12 punktus,
b e s i s k i r i a n t y s tuo, kad yra AoAt - NBJ/5,
kaip aprašyta ir apibrėžta.

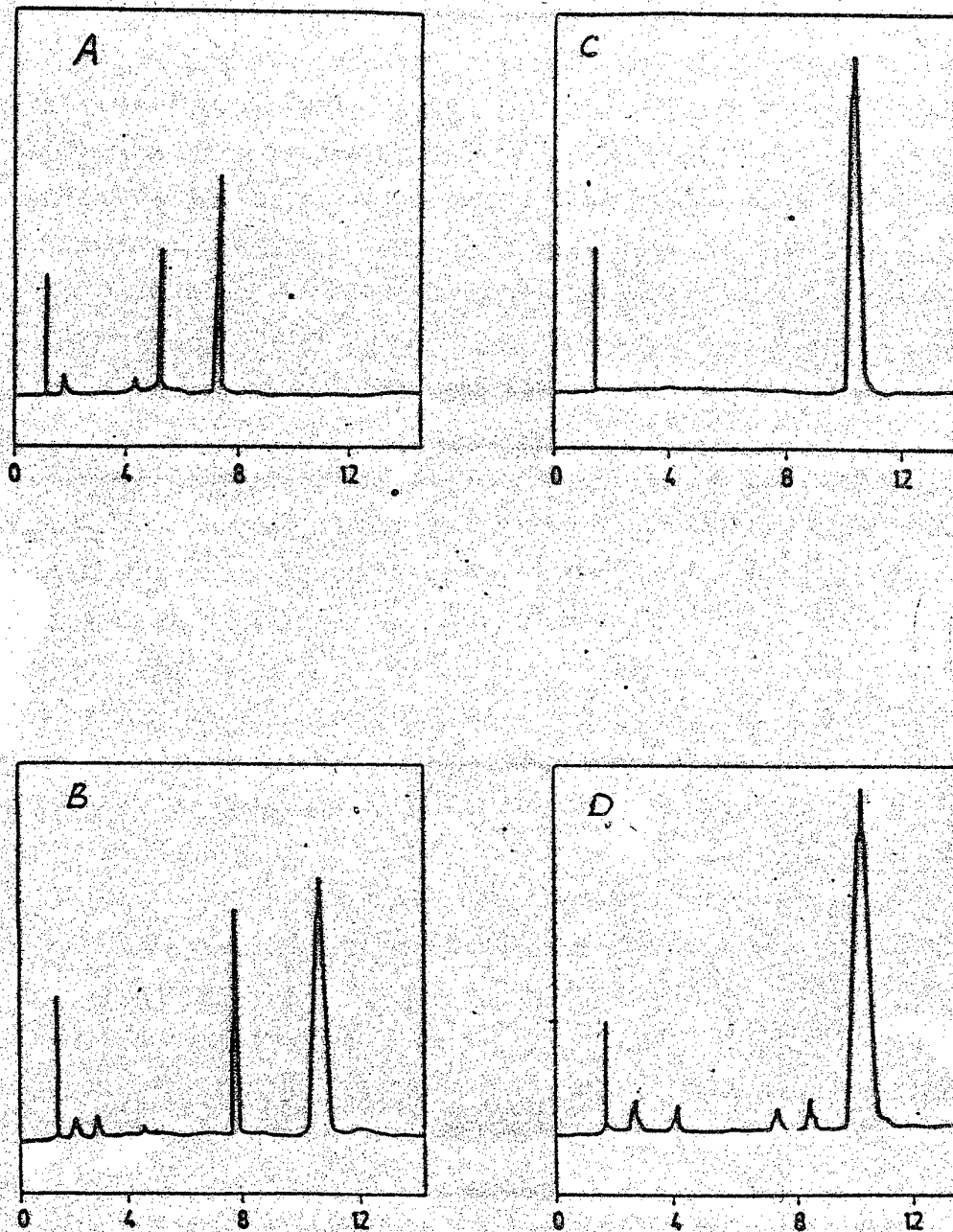
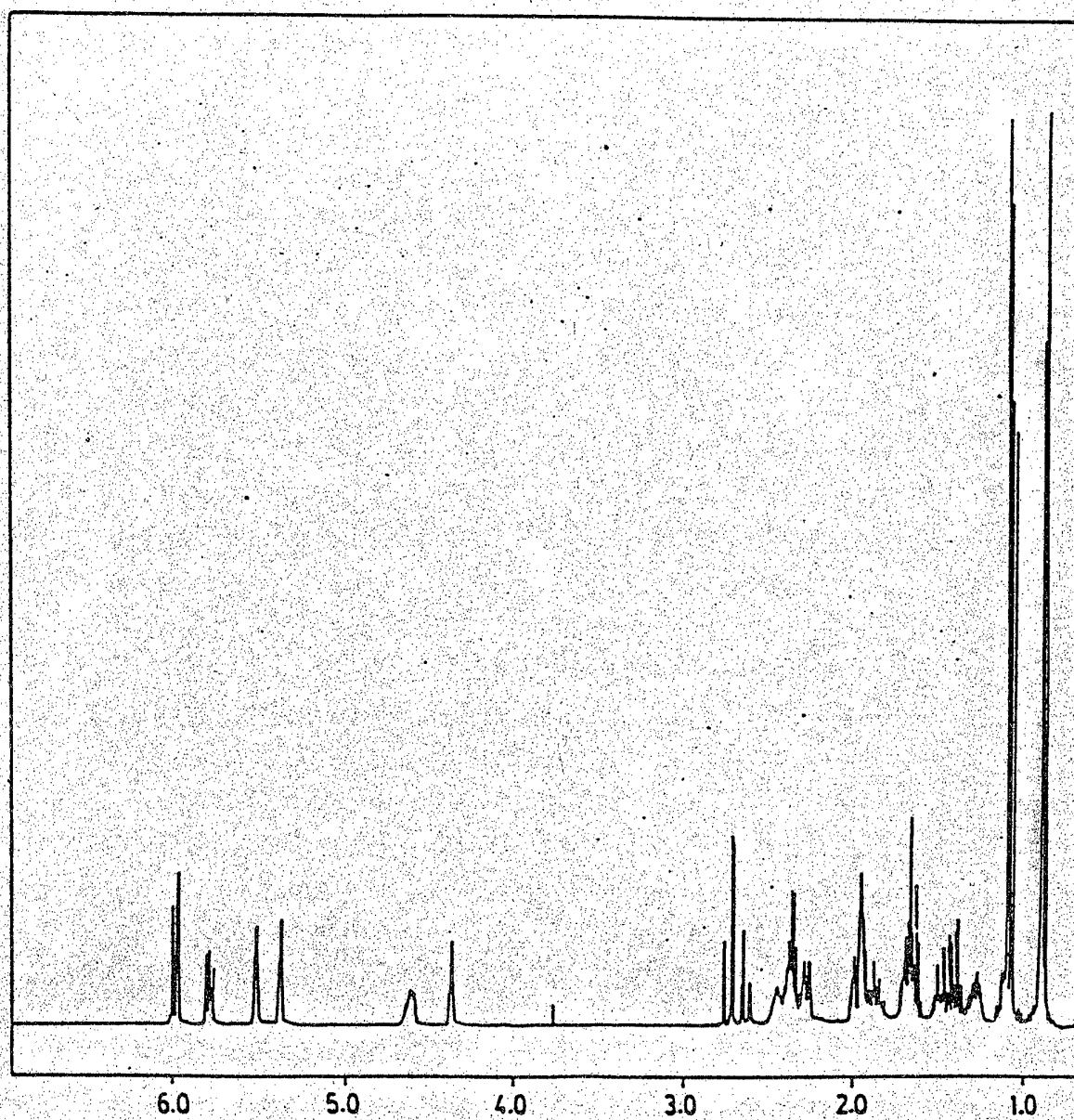


Fig. 1

- A: ekstraktas iš A.oryzae (šaltinis)
- B: ekstraktas iš A.terreus (šaltinis)
- C: standartinis lovastatinas
- D: ekstraktas iš transformuoto A.oryzae

LT 3083 B



M. d.

Fig. 2

LT 3083 B

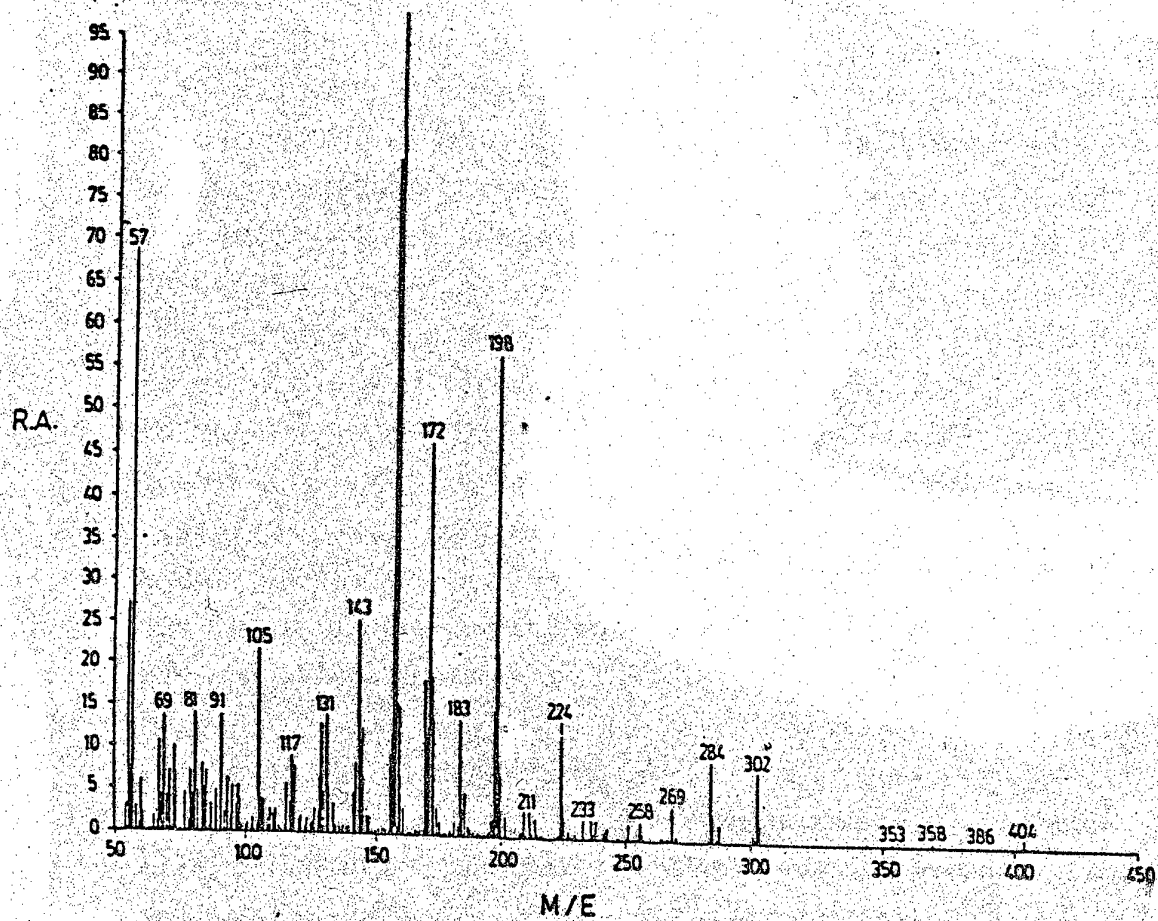


Fig. 3

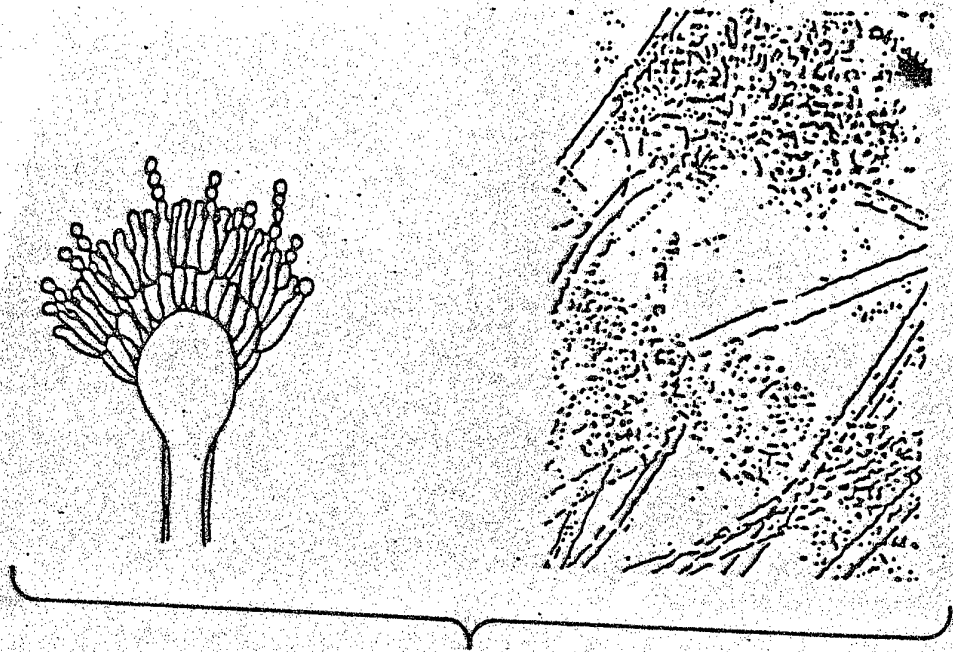


Fig. 4