



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2008-0028924  
 (43) 공개일자 2008년04월02일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/> <i>C12N 9/02</i> (2006.01) <i>C12P 37/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2008-7000778</p> <p>(22) 출원일자 2008년01월10일<br/>                 심사청구일자 없음<br/>                 번역문제출일자 2008년01월10일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2006/061479<br/>                 국제출원일자 2006년04월10일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2007/006593<br/>                 국제공개일자 2007년01월18일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>                 05106347.7 2005년07월12일<br/>                 유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.<br/>                 네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1</p> <p>(72) 발명자<br/>                 쉬퍼 딕<br/>                 네덜란드 엔엘-2612 에이치엘 델프트 오스트싱겔 205<br/>                 커크만 리차드<br/>                 네덜란드 엔엘-2042 엔엘 잔드부르트 코닌기네베 그 12<br/>                 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>                 김창세, 장성구</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 23 항

**(54) 변이주 익스팬다제 및 베타-락탐 화합물의 생성에 있어서 이들의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성이 2.5배 이상 개선된, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드의 변이체인 변이주 익스팬다제에 관한 것이다.

(72) 발명자

**람스돈크 로우리나 마텔라이네**

네덜란드 엔엘-2496 엘엔 텐 하그 노벨즈반신겔 15

**보벤베르그 로엘로프 아리 란스**

네덜란드 엔엘-3062 디에이 로테르담 크랄링스 플  
라스란 10

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드의 변이체(variant)인 변이주 익스팬다제(mutant expandase)로서, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여, 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성이 2.5 배 이상 개선된 변이주 익스팬다제.

### 청구항 2

익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드의 변이체인 변이주 익스팬다제로서, 스트렙토마이세스 클라블리케러스(*Streptomyces clavuligerus*)의 *cefE* 유전자에 의해 코딩된 익스팬다제 효소의 아미노산 서열(서열번호 1)의 아미노산 위치 번호를 사용하여 2, 59, 73, 89, 90, 99, 101, 105, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 293, 300, 306, 307 및 311 위치로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된 변이주 익스팬다제.

### 청구항 3

제 2 항에 있어서, 선택적으로 제 1 군으로부터 선택되고 하기 제 2 군에 속하지 않는 하나 이상의 아미노산 위치와 조합하여 2, 59, 89, 90, 99, 105, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군, 더욱 바람직하게는 2, 89, 90, 99, 105, 177, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형되는 변이주 익스팬다제.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 제 2 항에서 정의된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형되거나, 또는 제 3 항에서 정의된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형되는 변이주 익스팬다제.

### 청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 2, 89, 277, 281 및 300으로 구성된 군으로부터 선택된 2 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+281 또는 89+281 또는 277+300 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 2, 89, 281, 293 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 3 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+89+281 또는 89+281+311 또는 89+281+293 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 2, 73, 89, 90, 217, 244, 277, 280, 281, 306, 307 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 4 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+277+280+281 또는 2+281+306+311 또는 73+89+281+311 또는 89+217+281+311 또는 89+244+281+311 또는 89+281+307+311 또는 277+281+306+311 또는 89+281+306+311 또는 90+281+306+311 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

### 청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 2, 73, 89, 155, 213, 249, 281, 293, 300, 306 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 5 이상의 아미노산 위치,

더욱 바람직하게는 2+89+281+306+311 또는 2+155+281+306+311 또는 73+89+213+281+311 또는 89+281+293+300+311 또는 89+249+281+306+311 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 9**

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,  
90+105+113+281+306+311로 구성된 군으로부터 선택된 6의 아미노산 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 10**

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,  
73, 89, 105, 113, 155, 177, 277, 280, 281, 293, 300, 306, 307 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 7 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 73+89+281+293+300+307+311 또는 105+113+155+177+281+306+311 또는 155+177+277+280+281+306+311 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 11**

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,  
2, 90, 99, 105, 113, 155, 177, 277, 281, 306 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 8 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+90+99+105+113+281+306+311 또는 2+90+105+113+155+177+277+281 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 12**

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,  
2+90+105+113+155+177+281+306+311 위치로 구성된 군으로부터 선택된 9 이상의 아미노산의 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 13**

제 1 항에 있어서,  
2+90+105+113+155+177+277+281+306+311 위치로 구성된 군으로부터 선택된 10 이상의 아미노산 위치를 포함하는 변이주 익스팬다제.

**청구항 14**

제 2 항, 제 3 항 및 제 4 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,  
익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여, 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성이 2.5 배 이상 개선된 변이주 익스팬다제.

**청구항 15**

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,  
서열번호 1에서 제시된 바와 같은 유전자 *cefE*에 의해 코딩된 스트렙토마이세스 클라볼리케러스의 익스팬다제의 변이체인 변이주 익스팬다제.

**청구항 16**

제 15 항에 있어서,  
D2, S59, M73, T89, N90, M99, Y101, T105, G113, C155, H170, P177, G209, T213, Y217, H244, R249, D251, L277, A278, E280, C281, T293, G300, R306, R307 및 A311 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2, 59, 89, 90, 99, 105, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2, 89, 90, 99, 105, 177, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된 변

이주 익스팬다제.

**청구항 17**

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 변이주 익스팬다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드.

**청구항 18**

제 17 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 또는 카세트.

**청구항 19**

제 17 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 18 항의 벡터 또는 카세트로 형질전환된 숙주 세포.

**청구항 20**

변이주 익스팬다제의 생산을 유도하는 조건 하에서 제 19 항에 따른 숙주 세포를 배양시키고, 선택적으로 폴리펩타이드를 회수하는 것을 포함하는 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 변이주 익스팬다제의 생산 방법.

**청구항 21**

$\beta$ -락탐 화합물의 생성을 유도하는 조건 하에서 제 20 항에 따른 숙주 세포를 배양시키고, 선택적으로  $\beta$ -락탐 화합물을 회수하는 것을 포함하는 대상의  $\beta$ -락탐 화합물을 생성하는 방법.

**청구항 22**

제 21 항에 있어서,

$\beta$ -락탐 화합물을 N-데아실화하여 N-데아실화  $\beta$ -락탐 화합물을 생성하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 23**

익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드를 코딩하는 클로닝된 유전자, 바람직하게는 스트렙토마이세스 클라 불리게러스로부터 익스팬다제를 코딩하는 *cefE*를 돌연변이시켜 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자의 콜렉션을 획득하는 단계;

적당한 숙주에서 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자의 콜렉션을 발현시키고, 적당한 기질, 바람직하게는 ad-6-APA를 사용하여 개선된 활성을 위한 변이주 익스팬다제의 콜렉션을 스크리닝하는 단계; 및

선택적으로, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 뉴클레오타이드를 코딩하는 유전자 또는 적당한 기질 상에서 개선된 활성을 갖는 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자 하나 이상을 사용하여 단계 1 및 2를 1회 또는 수회 반복하는 단계를 포함하는,

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항에 따른 변이주 익스팬다제를 획득하는 방법.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 변이주 익스팬다제(*expandase*) 효소, 상기 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 상기 변이주 익스팬다제 효소를 코딩하는 상기 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 미생물, 및 5-카복시펜타노일-6-아미노페니실란산 (아디필-6-APA = ad-6-APA)의 고리 확장(*expansion*)에서의 상기 변이주 익스팬다제 효소 또는 상기 미생물의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

<2> 베타-락탐 항생물질은, 긴 역사의 임상 용도를 갖는 가장 중요한 항생 화합물 군이다. 이 군 중에서, 두드러진 것들은 페니실린과 세팔로스포린이다. 페니실린은 페니실륨(*Penicillium*)(예: 페니실륨 크리소게눔; *P. chrysogenum*)과 같은 다양한 사상균류에 의하여 자연적으로 생산된다. 세팔로스포린은 아크레모늄(*Acremonium*)(예: 아크레모늄 크리소게눔; *A. chrysogenum*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)(예: 스트렙토

마이세스 클라블리게러스; *Streptomyces clavuligerus*)와 같은 각종 미생물에 의해 자연적으로 생산된다.

- <3> 고전적인 균주의 개선 기술의 결과로서, 페니실린 크리소게눔과 아크레모늄 크리소게눔에서의 항생물질의 생산 수준이 과거 수 십년에 걸쳐 현저하게 증가해 왔다. 페니실린과 세팔로스포린을 유도하는 생합성 경로에 대한 지식이 증가하고 재조합 DNA 기술이 도래함에 따라, 생산 균주의 개선을 위한 새로운 도구들이 이용 가능해졌다.
- <4> 잉골리아(Ingolia) 및 퀴너(Queener)의 문헌 [Med. Res. Rev. (1989) 9: 245-264 (biosynthesis route and enzymes)] 및 아하로노위쯔(Aharonowitz), 코헨(Cohen) 및 마틴(Martin)의 문헌 [Ann. Rev. Microbiol. (1992) 46:461-495(gene cloning)]에서 볼 수 있는 바와 같이,  $\beta$ -락탐 생합성과 관련된 대부분의 효소가 확인되었고 그것의 상응하는 유전자가 클로닝되었다.
- <5> 페니실린 크리소게눔에서의 페니실린의 생합성에서 처음 2개의 단계는 3개의 아미노산, 즉 L-5-아미노-5-카르복시펜탄산(L- $\alpha$ -아미노아디프산)(A), L-시스테인(C) 및 L-발린(V)의 트라이펩타이드 LLD-ACV로의 축합, 및 이후 상기 트라이펩타이드의 고리화에 의한 아이소페니실린 N의 형성이다. 이 화합물은 전형적인  $\beta$ -락탐구조를 함유한다.
- <6> 세번째 단계는, 효소 아실트랜스퍼라제(AT)의 작용에 의하여 L-5-아미노-5-카르복시펜탄산의 친수성 측쇄를 소수성 측쇄에 의하여 치환시키는 것을 포함한다.
- <7> EP-A-0448180호에서, AT에 의해 매개되는 효소 교환 반응이 세포 소기관인 미소체 내에서 일어난다고 기술하고 있다. 실질적인 양의 데아세톡시세팔로스포린 C(DAOC)가 데아세톡시세팔로스 C 신타제(EC 1.14.20.1 - DAOCs, 또한 본원에서 익스팬다제로서 지칭됨)를 발현하는 비구매된(non-precursed) 페니실린 크리소게눔 형질전환체에 의해 형성된다는 사실은, 페니실린 크리소게눔 중에 상당량의 페니실린 N(익스팬다제에 대한 천연 기질)이 존재한다는 것을 의미한다(알비(Alvi) 등의 문헌 [J Antibiot (1995) 48:338-340]). 그러나, DAOC의 D- $\alpha$ -아미노-아디필 측쇄는 용이하게 제거될 수 없다.
- <8> 세팔로스포린은 페니실린보다 훨씬 더 고가이다. 고가인 이유 중 하나는, 일부 세팔로스포린(예컨대, 세팔렉신(cephalexin))이 페니실린으로부터 다수의 화학적 전환에 의하여 제조되기 때문이다. 또 다른 이유는, 지금까지 D- $\alpha$ -아미노-아디필 측쇄를 가진 세팔로스포린만이 발효될 수 있었기 때문이다. 이와 관련하여 지금까지 가장 중요한 출발물질인 세팔로스포린 C가 임의 pH에서 물에 매우 가용성이고, 따라서 이는 성가시고 고가인 칼럼 기술을 이용한 시간이 오래 걸리고 고가 분리 과정들을 포함한다. 이러한 방법으로 얻어진 세팔로스포린 C는 많은 화학적 및 효소적 전환에 의하여 치료학적으로 사용되는 세팔로스포린으로 전환되어야 한다.
- <9> 중간물질 7-아미노-데아세톡시세팔로스포린산(7-ADCA)을 제조하기 위해 산업에서 현재 선호하는 방법은 페니실린 G의 확장 및 유도체화를 유도하는 복잡한 화학적 단계들을 포함한다. 7-ADCA를 생산하기 위해 필요한 화학적 단계들 중 하나는 5원 페니실린 고리 구조를 6원 세팔로스포린 고리 구조로 확장하는 것을 포함한다(예컨대, 미국 특허 제4,003,894호 참조). 이러한 복잡한 화학적 처리는 고가이고 환경에 유해하다.
- <10> 결과적으로, 바람직하게는 발효 동안 효소 촉매작용과 같은 효소 반응으로 상기 화학적 과정들을 대체하려는 큰 요구가 있었다. 화학적 확장 과정을 생물학적 과정으로 대체하는데 있어서 중요한 열쇠는 세팔로스포린 생합성 경로에서의 중심적인 효소인 "익스팬다제"이다.
- <11> 박테리아 스트렙토마이세스 클라블리게러스(*Streptomyces clavuligerus*)로부터의 익스팬다제 효소는, 경우에 따라 페니실린 고리 확장을 수행하는 것으로 알려졌다. 페니실린 크리소게눔에 도입될 때, 이것은 캔트웰(Cantwell) 등의 문헌 [Proc. R. Soc. Lond. B. (1992) 248: 283-289]에 기술된 바와 같이, 페니실린 고리 구조를 세팔로스포린 고리 구조로 전환시킬 수 있다. 익스팬다제 효소는 이것의 상응하는 유전자를 갖는 것과 같이 생화학적으로 그리고 기능적으로 잘 특성화되었다(EP-A-0366354호). *cefE* 유전자(스트렙토마이세스 클라블리게러스의 익스팬다제를 코딩하는 유전자 - EP-A-0341892호)의 물리적 지도, 및 *cefE*를 이용한 페니실린 크리소게눔에서의 DNA 서열 및 형질전환 연구 모두가 이미 기재되어 있다. 스트렙토마이세스 클라블리게러스 익스팬다제 효소의 DNA 및 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시된다.
- <12> 익스팬다제 효소를 위한 또 다른 공급원은 예를 들어, 박테리아 노카디아 락탐두런스(*Nocardia lactamdurans*, 이전에는 스트렙토마이세스 락탐두런스(*Streptomyces lactamdurans*)이다. 효소의 생화학적 특성 및 효소를 코딩하는 유전자의 DNA 서열은 이미 기재되어 있다(각각, 코테스(Cortes) 등의 문헌 [J. Gen. Microbiol. (1987) 133:3165-3174]; 및 코퀴(Coque) 등의 문헌 [Mol. Gen. Genet. (1993) 236:453-458] 참조).

<13> 최근에, 신규 익스팬다제(cefE) 유전자 및 효소가 스트렙토마이세스 줘몬지넨시스(*Streptomyces jumonjinensis*), 스트렙토마이세스 암보파시엔스(*Streptomyces ambofaciens*) 및 스트렙토마이세스 차트레우세스(*Streptomyces chartreuses*)에서 발견되었다(예: 수(Hsu) 등의 문헌 [(2004), Appl. and Environm. Microbiol. 70, 6257-6263] 참조). 하기 표 1은 수 개의 익스팬다제로부터 아미노산 서열의 상동성을 요약한 것으로서, 효소 공급원에 따라 서열의 상동성이 67 내지 85%이라는 것을 보여 준다.

표 1

수 개의 익스팬다제의 아미노산 서열 상동성(수 등으로부터 입수된 데이터)	스트렙토마이세스 클라블리케러스	스트렙토마이세스 줘몬지넨시스	스트렙토마이세스 암보파시엔스	스트렙토마이세스 차트레우세스	노카디아 락탐 두렌스
스트렙토마이세스 클라블리케러스	100				
스트렙토마이세스 줘몬지넨시스	81	100			
스트렙토마이세스 암보파시엔스	81	85	100		
스트렙토마이세스 차트레우세스	76	77	79	100	
노카디아 락탐 두렌스	70	68	70	67	100

- <14>
- <15> 원핵 세포에서 주로 일어나는 세팔로스포린의 생합성에 있어서, 테아세톡시세팔로스포린-C는 테아세톡시세팔로스-C 하이드록실라제 또는 하이드록실라제(EC 1.14.11.26 - DACS)로 명명되는 효소 테아세틸세팔로스포린 C 신타제에 의해 테아세틸세팔로스포린-C로 계속하여 전환된다. 이러한 하이드록실라제를 코딩하는 유전자는 *ceff*-유전자로 지칭된다(예: 수 등 참조). 진핵 세포(예: 아크레모늄 크리소게눔(*Acremonium chrysogenum*))에서 발견되는 익스팬다제는, 익스팬다제 및 하이드록실라제 활성 둘 다의 존재로 인해, 페니실린 N을 테아세톡시세팔로스포린-C로 직접적으로 전환시키는 촉매 작용을 하고, 따라서 코딩된 유전자는 *cefEF*로 지칭된다(수 등 참조).
- <16> 본원에서 정의된 바와 같이, 용어 "익스팬다제"는 익스팬다제 효소(EC 1.14.20.1, *cefE* 유전자에 의해 코딩됨) 및 또한 하이드록실라제 활성을 갖는 익스팬다제(EC 1.14.20.1 + EC 1.14.11.26, *cefEF* 유전자에 의해 코딩됨)와 관련된다.
- <17> 익스팬다제 효소가 페니실린 N의 5원 사이아졸리딘 고리를 DAOC의 6원 다이하이드로사이아진 고리로 확장하는 것을 촉매화하기 때문에, 상기 효소는 물론 화학적 과정의 고리 확장 단계를 대체할 논리적인 후보 물질이 될 것이다. 불행하게도, 상기 효소는 세팔로스포린 생합성 경로의 페니실린 N 중간물질 상에서 작용하지만, 페니실린 V 또는 페니실린 G와 같은, 페니실린 크리소게눔에 의하여 생산된 쉽게 이용 가능한 저렴한 페니실린 상에는 작용하지 않거나 비교적 비효율적으로 작용한다. 페니실린 N은 상업적으로 이용 가능하지 않고, 확장될 때조차 그것의 D- $\alpha$ -아미노-아디필 측쇄는 페니실린 아실라제에 의하여 쉽게 제거될 수 없다.
- <18> 익스팬다제 효소가 특정 측쇄를 갖는 페니실린을 대응하는 7-ADCA 유도체로 확장할 수 있다고 보고되어 있다. 익스팬다제의 이러한 특징은 EP-A-0532341호, W095/04148호 및 W095/04149호에 명시된 기술에서 연구되었다. 이러한 기재에 있어서, 페니실린 G의 7-ADCA로의 통상의 화학적 시험관 내 전환이 익스팬다제 유전자로 형질전환된 재조합 페니실린 크리소게눔 균주에서의 특정 6-아미노페니실란산(6-APA) 유도체의 생체 내 전환으로 대체되었다.
- <19> 더욱 구체적으로, EP-A-0532341호는 페니실린 크리소게눔에서의 아실트랜스퍼라제 효소의 기질인 공급 원료로서의 아디필 측쇄(또한, 아디필로서 언급됨)와 조합된 페니실린 크리소게눔의 익스팬다제 효소의 생체 내 용도를 기술하고 있다. 이로 인해, 아디필-6-APA가 형성되며, 이것은 페니실린 크리소게눔 균주에 도입된 익스팬다제 효소에 의해 전환되어 아디필-7-ADCA를 수득한다. 최종적으로, 아디필 측쇄가 제거되어 최종 산물로서 7-ADCA를 형성한다고 기술하고 있다. 더욱이, EP-A-0540210호는 아디필-7-ADAC 및 아디필-7-ACA의 유사한 생산을 교시하고 있다.
- <20> 또 다른 시도로서, *cefE*로 형질전환된 페니실린 크리소게눔을 사용한 페니실린 G의 확장이 EP0828850호에서 제안되었다. 더욱이, 페니실린 G의 확장을 증가시키기 위해, 스트렙토마이세스 클라블리케러스의 변이주 *cefE* 유전자를 사용하는 것에 대해 기술하고 있다. 미국 특허 제5,919,680호, WO 98/02551호, WO 99/3399호, WO



01/85951호 및 EP 1348759호 모두는 페니실린 G 상에서 더 높은 익스팬다제 활성을 갖는 효소를 코딩하는 변이주 *cefE* 유전자를 기술하고 있다.

<21> 그럼에도 불구하고, 상기 변이주 익스팬다제는 여전히 세팔로스포린의 생산을 위한 상업적으로 매력적인 공정을 제공하지 못하고 있다.

<22> 따라서, 아디필-6-APA의 확장으로부터 세팔로스포린을 제조하는 공정을 더욱 개선시킬 필요가 있다. 이러한 공정은, 세팔로스포린 코어 물질로부터 측쇄 물질을 효과적으로 제거한다는데 그 특징이 있다. 이러한 공정을 더욱 개선시키는 하나의 단계는 아디필-6-APA 상에서 익스팬다제의 활성을 개선시키는 것이다.

**발명의 상세한 설명**

<23> 제 1 양태에 있어서, 본 발명은 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드의 변이체인 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다. 바람직하게는, 본 발명은, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여, 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성이 2.5배 이상 개선된 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다. 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성의 측정은 "물질 및 방법"에 기술되어 있다. 더욱 바람직하게는, 변이주 익스팬다제의 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성은 3배 이상, 더욱 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상, 더욱 바람직하게는 6배 이상, 더욱 바람직하게는 7배 이상, 더욱 바람직하게는 8배 이상, 더욱 바람직하게는 9배 이상, 더욱 바람직하게는 10배 이상, 더욱 바람직하게는 11배 이상, 더욱 바람직하게는 12배 이상, 더욱 바람직하게는 13배 이상, 더욱 바람직하게는 14배 이상, 더욱 바람직하게는 15배 이상, 더욱 바람직하게는 16배 이상, 더욱 바람직하게는 17배 이상, 더욱 바람직하게는 18배 이상, 더욱 바람직하게는 19배 이상, 더욱 바람직하게는 20배 이상으로 개선된다. 본 발명은 또한 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 *cefE* 유전자에 의해 코딩된 익스팬다제 효소의 아미노산 서열의 아미노산 위치 번호를 사용하여 2, 59, 73, 89, 90, 99, 101, 105, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 293, 300, 306, 307 및 311 위치로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 바람직하게 변형된 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다. 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 *cefE* 유전자의 뉴클레오타이드 서열 뿐만 아니라 상기 *cefE* 유전자에 의해 코딩된 아미노산 서열이 서열번호 1에 도시되어 있다. 더욱 바람직하게는, 변이주 익스팬다제는 2, 59, 89, 90, 99, 105, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된다. 가장 바람직하게는, 변이주 익스팬다제는 2, 89, 90, 99, 105, 177, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된다.

<24> 본원의 문맥에서 "변형 또는 변이주 익스팬다제"는 익스팬다제 활성을 갖는 임의 효소를 의미하며, 이것은 자연 원료로부터 입수된 것이 아니며, 이것의 아미노산 서열은 자연 익스팬다제 효소의 완전한 아미노산 서열과 다르다.

<25> 가장 바람직하게는, 본 발명은, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여, 아디필-6-APA에 대한 시험관 내 익스팬다제 활성은 2.5배 이상, 바람직하게는 3배 이상, 더욱 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상, 더욱 바람직하게는 6배 이상, 더욱 바람직하게는 7배 이상, 더욱 바람직하게는 8배 이상, 더욱 바람직하게는 9배 이상, 더욱 바람직하게는 10배 이상, 더욱 바람직하게는 11배 이상, 더욱 바람직하게는 12배 이상, 더욱 바람직하게는 13배 이상, 더욱 바람직하게는 14배 이상, 더욱 바람직하게는 15배 이상, 더욱 바람직하게는 16배 이상, 더욱 바람직하게는 17배 이상, 더욱 바람직하게는 18배 이상, 더욱 바람직하게는 19배 이상, 더욱 바람직하게는 20배 이상 개선되고, 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 *cefE* 유전자에 의해 코딩된 익스팬다제 효소의 아미노산 서열의 아미노산 위치 번호를 사용하여 2, 59, 73, 89, 90, 99, 101, 105, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 293, 300, 306, 307 및 311 위치로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 바람직하게 변형된 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다. 더욱 바람직하게는, 변이주 익스팬다제는 2, 59, 89, 90, 99, 105, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된다. 가장 바람직하게는, 변이주 익스팬다제는 2, 89, 90, 99, 105, 177, 251, 278, 280 및 293 위치로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된다.

<26> 익스팬다제의 활성은 다양한 조건 하에서 측정될 수 있다. 활성 검정에서 기질(예컨대, 아디필-6-APA)의 농도는, V<sub>g</sub>가 활성을 결정하는 조건 하에서 (이 경우, 기질 농도는 매우 더 높는데, 예컨대 그의 기질에 대한 익스팬다제의 K<sub>m</sub>보다 5 내지 20배 높다) 또는 부가적으로 이 익스팬다제의 활성을 결정하는 조건 하에서 (이 경우, 기



질 농도는 거의 동일하거나 (매우) 더 낮는데, 예컨대 그의 기질에 대한 익스팬다제의  $K_M$ 보다 0.05 내지 0.2배 미만으로 낮다) 익스팬다제 활성이 측정되는지 여부를 결정한다. 변이주 익스팬다제의 개선 요인은 이러한 다양한 조건 하에서 측정될 수 있다.

<27> 아미노산 위치에서의 변형은, 자연에서 발생하는 20개의 L-아미노산으로 된 균으로부터 선택된 또 다른 아미노산에 의한 치환을 포함한다 - 표 2 참조. 다르게는, 아미노산 위치에서의 변형은 상기 위치에서 아미노산의 결손을 포함한다. 더욱이, 아미노산 위치에서의 변형은 상기 아미노산의 C-말단 또는 N-말단에서의 하나 이상의 아미노산의 치환을 포함한다.

표 2

아미노산	3문자 코드	1문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글라이신	Gly	G
히스티딘	His	H
아이소류이신	Ile	I
류이신	Leu	L
라이신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

<28> 본 발명에 사용된 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드는, 표 1에 요약된 익스팬다제 효소와 같이, 바람직하게는 서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 갖는 익스팬다제 활성의 폴리펩타이드, 및 70% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열번호 1과의 상동 백분율(percentage identity)을 갖는 아미노산 서열을 갖는 익스팬다제 활성을 갖는 폴리펩타이드로 구성된 균으로부터 선택된다.

<30> 본 발명은 바람직하게는 적어도 하기 위치에서 변형된 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다:

<31> \* 2, 59, 73, 89, 90, 99, 101, 105, 113, 155, 170, 177, 209, 213, 217, 244, 249, 251, 277, 278, 280, 281, 293, 300, 307 및 311로 구성된 균으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;

<32> \* 2, 59, 89, 90, 99, 105, 113, 170, 177, 209, 213, 217, 249, 251, 278, 280 및 293으로 구성된 균으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;

<33> \* 2, 89, 90, 99, 105, 177, 251, 278, 280 및 293으로 구성된 균으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;

<34> \* 2, 89, 277, 281 및 300으로 구성된 균으로부터 선택된 2 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+281 또는 89+281 또는 277+300 위치;

<35> \* 2, 89, 281, 293 및 311로 구성된 균으로부터 선택된 3 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+89+281 또는 89+281+311 또는 89+281+293 위치;

<36> \* 2, 73, 89, 90, 217, 244, 277, 280, 281, 306, 307 및 311로 구성된 균으로부터 선택된 4 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+277+280+281 또는 2+281+307+311 또는 73+89+281+311 또는 89+217+281+311 또는 89+244+281+311 또는 89+281+307+311 또는 277+281+306+311 또는 89+281+306+311 또는 90+281+306+311 위치;

<37> \* 2, 73, 89, 90, 155, 213, 249, 278, 281, 293, 300, 306, 307 및 311로 구성된 균으로부터 선택된 5 이상의

아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+89+281+306+311 또는 2+155+281+306+311 또는 73+89+213+281+311 또는 89+78+218+307+311, 89+281+293+300+311 또는 89+249+281+307+311 위치;

- <38> \* 90+105+113+281+306+311로 구성된 군으로부터 선택된 6의 아미노산 위치;
- <39> \* 2, 73, 89, 105, 113, 155, 170, 177, 251, 277, 280, 281, 293, 300, 306, 307 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 7 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 73+89+281+293+300+307+311 또는 105+113+155+177+281+306+311 또는 155+177+277+280+281+306+311 위치;
- <40> \* 2, 89, 90, 99, 105, 113, 155, 177, 277, 281, 307 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 8 이상의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+90+99+105+113+281+306+311 또는 2+90+105+113+155+177+277+281 위치;
- <41> \* 2+90+105+113+155+177+281+306+311로 구성된 군으로부터 선택된 9의 아미노산의 위치;
- <42> \* 2, 59, 90, 101, 105, 113, 155, 177, 209, 277, 281, 307 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 10의 아미노산 위치, 더욱 바람직하게는 2+90+105+113+155+177+277+281+306+311 위치; 및
- <43> \* 2, 90, 105, 113, 155, 177, 277, 281, 293, 307, 및 311로 구성된 군으로부터 선택된 11의 아미노산의 위치.
- <44> 또한, 본 발명은, 이전 본원에서 정의한 바와 같되 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 익스팬다제의 변이체로서, D2, S59, M73, T89, N90, M99, Y101, T105, G113, C155, H170, P177, G209, T213, Y217, H244, R249, L277, E280, C281, T293, G300, R306, R307 및 A311 위치(여기서, 문자+수는 각각의 아미노산(1문자 코드)을 나타내고, 후속적인 수는 서열번호 1에서 제시된 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 익스팬다제 효소의 아미노산 서열에서의 아미노산 위치를 나타낸다)로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형된 변이주 익스팬다제를 제공하는 것이다.
- <45> 스트렙토마이세스 클라블리게러스의 익스팬다제의 변이주인 바람직한 변이주 익스팬다제는 적어도 하기 위치에서 변형된다:
- <46> \* D2, S59, M73, T89, N90, M99, T105, G113, C155, H170, P177, G209, T213, Y217, H244, R249, D251, L277, A278, E280, C281, T293, G300, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;
- <47> \* D2, S59, T89, N90, M99, T105, G113, H170, P177, G209, T213, Y217, R249, D251, A278, E280 및 T293으로 구성된 군으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;
- <48> \* D2, T89, N90, M99, T105, P177, D251, A278, E280 및 T293으로 구성된 군으로부터 선택된 1 이상의 아미노산 위치;
- <49> \* D2, T89, L277, C281 및 G300으로 구성된 군으로부터 선택된 2 이상의 아미노산 위치;
- <50> \* D2, T89, C281, T293 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 3 이상의 아미노산 위치;
- <51> \* D2, M73, T89, N90, Y217, H244, L277, E280, C281, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 4 이상의 아미노산 위치;
- <52> \* D2, M73, T89, N90, C155, T213, R249, A278, C281, T293, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 5 이상의 아미노산 위치;
- <53> \* N90+T105+G113+C281+R306+A311로 구성된 군으로부터 선택된 6의 아미노산 위치;
- <54> \* D2, M73, T89, T105, G113, C155, H170, P177, D251, L277, E280, C281, T293, G300, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 7 이상의 아미노산 위치;
- <55> \* D2, T89, N90, M99, T105, G113, C155, P177, L277, C281, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 8 이상의 아미노산 위치;
- <56> \* D2+N90+T105+G113+C155+P177+C281+R306+A311로 구성된 군으로부터 선택된 9의 아미노산 위치;
- <57> \* D2, S59, N90, T105, G113, T105, G113, C155, P177, G209, L277, C281, R306, R307, 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 10의 아미노산 위치; 및
- <58> \* D2, N90, T105, G113, C155, P177, L277, C281, R306, R307 및 A311로 구성된 군으로부터 선택된 11의 아미

노산 위치.

- <59> (아미노산에 대한 1문자 코드를 사용하는) 스트렙토마이세스 클라볼리게러스의 익스팬다제에서의 각 위치에서의 바람직한 변형은 다음과 같다:
- <60> \* 친수성 아미노산 Y, N, H, D, Q, E, K, R, S 또는 T, 바람직하게는 Y, N, Q 또는 H에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 2 위치에서의 D. 가장 바람직하게는 치환 D2Y, D2N 및 D2H이다.
- <61> \* A, V, I, L, N, Q, H, K 또는 R, 바람직하게는 N, Q, H, L 또는 I에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 73 위치에서의 M. 가장 바람직하게는 치환 M73H 및 M73I이다.
- <62> \* K, R, A, C, P, V, I, L, 또는 M, 바람직하게는 A, V, I, L, R 또는 K, 더욱 바람직하게는 A, V 또는 K에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 89 위치에서의 T. 가장 바람직하게는 치환 T89K이다.
- <63> \* H, R, K, N, Q, W, S, C, T 또는 Y, 바람직하게는 K, R, N, S, W에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 90 위치에서의 N. 가장 바람직하게는 치환 N90W 및 N90S이다.
- <64> \* A, R, K, Q, E, N, D, S 또는 T, 더욱 바람직하게는 K, Q, E 또는 T에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 99 위치에서의 M. 가장 바람직하게는 치환 M99T이다.
- <65> \* A, V, I, L, R, K, H, Q 또는 N, 바람직하게는 V, I, L, R 또는 K에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 105 위치에서의 T. 가장 바람직하게는 치환 T105I 및 T105K이다.
- <66> \* A, P, Q, K, R, E, D 또는 N, 더욱 바람직하게는 A, D, E, Q, K 또는 R에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 113 위치에서의 G. 가장 바람직하게는 치환 G113D이다.
- <67> \* A, N, S, T, V, W, 더욱 바람직하게는 A, S, T, V 또는 W에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 155 위치에서의 C. 가장 바람직하게는 치환 C155W이다.
- <68> \* K, E, L, A, V, T, I, 더욱 바람직하게는 L, A, V, T, I에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 177 위치에서의 P. 가장 바람직하게는 치환 P177L 및 P177I이다.
- <69> \* Q, G, A, V, I, R, S, 더욱 바람직하게는 G, A, V, I, S에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 213 위치에서의 T. 가장 바람직하게는 치환 T213A이다.
- <70> \* A, V, H, P, T, N 또는 Q, 더욱 바람직하게는 A, P, N, Q 또는 H에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 217 위치에서의 Y. 가장 바람직하게는 치환 Y217H이다.
- <71> \* N, Q, K 또는 R, 더욱 바람직하게는 K 또는 R에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 244 위치에서의 H. 가장 바람직하게는 치환 H244R이다.
- <72> \* G, S, T, N, D, Q, E, K, R, H 또는 C, 더욱 바람직하게는 G, S, D, N 또는 C에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 249 위치에서의 R. 가장 바람직하게는 치환 R249C이다.
- <73> \* G에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 251 위치에서의 D.
- <74> \* E, A, Q, K, R, H 또는 T, 더욱 바람직하게는 Q, E, K, R, H, T에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 277 위치에서의 L. 가장 바람직하게는 치환 L277Q, L277T 및 L277K이다.
- <75> \* G, A, Q, K, R 또는 H, 더욱 바람직하게는 G, Q 또는 R에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 280 위치에서의 E. 가장 바람직하게는 치환 E280G이다.
- <76> \* Y, S, L, W, A, S, T 또는 H, 더욱 바람직하게는 A, S, T, W, H 또는 Y에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 281 위치에서의 C. 가장 바람직하게는 치환 C281 Y이다.
- <77> \* S, D, N, K 또는 R, 더욱 바람직하게는 S, K 또는 R에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 293 위치에서의 T. 가장 바람직하게는 치환 T293K이다.
- <78> \* A, S, T, N, D, Q, E, K, R, H 또는 L, 더욱 바람직하게는 A, S, T, K, R, H 또는 L에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 300 위치에서의 G. 가장 바람직하게는 치환 G300S, G300K 및 G300L이다.
- <79> \* H 또는 결손에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 306 위치에서의 R.
- <80> \* T, K, A, S, V, G, D, N, Q, E, R, H, I 또는 결손, 더욱 바람직하게는 S, T, K, R, H, I 또는 결손에 의해

치환된 서열번호 1에 따른 307 위치에서의 R. 가장 바람직하게는 치환 R307T, R307I 및 R307 결손이다.

- <81> \* D에 의해 치환된 서열번호 1에 따른 311 위치에서의 A.
- <82> 크게 바람직한 변이주 익스팬다제는 표 3 및 4에 요약되어 있는 변이주 익스팬다제이다. 바람직하게는, 본 발명에 의해 제공된 변이주 익스팬다제는 본원에서 진술된 아디필-6-APA에 대해서 2.5배 이상 개선된 익스팬다제 활성을 갖는다. 다르게는, 본 발명에 의해 제공된 변이주 익스팬다제는, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드와 비교하여, 1.5배 이상, 더욱 바람직하게는 3배 이상, 더욱 바람직하게는 4배 이상, 더욱 바람직하게는 5배 이상, 더욱 바람직하게는 6배 이상, 더욱 바람직하게는 7배 이상, 더욱 바람직하게는 8배 이상 Pen-G 상에서 개선된 익스팬다제 활성을 갖는다. Pen-G 상에서 개선된 활성을 갖는 변이주 익스팬다제는 하기에서 추가로 설명되는 바와 같이 페닐아세틸-7-ADCA의 생산 공정에서 유리하게 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 의해 제공된 변이주 익스팬다제는 아디필-6-APA 및 Pen-G 둘 다에서 개선된 익스팬다제를 갖는다.
- <83> 본 발명은 또한 아이소-페니실린 N(iPN)을 사용하여 익스팬다제 활성을 감소시키거나 심지어 존재하지 않는 변이주 익스팬다제의 제공에 관한 것이다. 바람직하게는 아디필-6-APA 또는 Pen-G으로는 익스팬다제 활성은 영향 받지 않지만, 더욱 바람직하게는 아디필-6-APA 또는 Pen-G 또는 둘 다로 익스팬다제 활성은 진술된 바와 같이 개선된다. 이러한 더욱 바람직한 변이주 익스팬다제의 이점은, 아이소-페니실린 N(iPN)으로 인한 익스팬다제 활성의 감소 또는 부재로 인해 ad-7-ADCA 또는 페닐아세틸-7-ADCA를 형성하는 발효 과정에서 부산물이 적게 형성된다는 것이다.
- <84> 바람직한 변이주 익스팬다제는 선택적으로 ad-6-APA 기질 상의 개선된 익스팬다제 활성과 함께 기질로서 아이소-페니실린 N(iPN)의 사용에 의한 감소 또는 심지어 부재의 익스팬다제 활성을 가지며, 서열번호 1의 아미노산 번호에 따라 89의 위치에서 변형됨으로써 자연적으로 발생하는 아미노산이 바람직하게는 양으로 하전된 아미노산(예컨대, 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘)에 의해 치환되고, 가장 바람직하게는 라이신에 의해 치환된다.
- <85> 크게 바람직한 변이주 익스팬다제는 H401, H402, H403, H501, H502, H503, H504, H505, H506, H507, H508, H601, H602, H603, H604, H605, H606, H607, H608, H609, H650, H651, H652, H653, H654, H655, H656, H657, H658, H659, H660, H661, H662, G601, G602, G603, G604, G605, G606, G607, G608, G609, G610, G611, G613, G614, H701, H702, H703, H704, H705, H706으로 구성되는 군으로부터 선택된다(표 3 및 4 참조).
- <86> 제 2 양태에서, 본 발명은 본 발명의 변이주 익스팬다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드의 제공에 관한 것이다. 본 발명에 따른 변이주 익스팬다제를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는, 본 발명에 따른 적절한 아미노산 서열을 코딩하는 임의 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 다르게는, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 여러 아미노산에 대한 코돈 사용이 스트렙토마이세스 클라블리게러스에서의 코돈 사용으로부터 벗어나는 코딩 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 코돈 사용은 변형된 익스팬다제를 코딩하는 DNA 단편으로 형질전환될 수 있거나 형질전환된 특정 숙주 세포의 코돈 사용에 적용될 수 있다.
- <87> 제 3 양태에 있어서, 본 발명은 진술된 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 또는 발현 카세트의 제공에 관한 것이다.
- <88> 제 4 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 발현 벡터 또는 발현 카세트로 형질전환된 숙주 세포의 제공에 관한 것이다. 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 변이주 익스팬다제의 생성에 사용될 수 있거나, 숙주 세포는 대상의 베타-락탐 화합물의 생산에 사용될 수 있다.
- <89> 본 발명의 변이주 익스팬다제의 생산을 위한 숙주 세포는 세포 외에서 또는 세포 내에서 이들의 효과적인 단백질 또는 효소의 생산을 위해 당해 기술에서 공지된 숙주 세포, 예를 들면 미생물(예: 진균류, 효모, 및 박테리아)이 바람직하다. 바람직한 숙주 세포의 보기는 다음과 같은 속을 포함하지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다: 아스퍼길러스(*Aspergillus*)(예: 아스퍼길러스 니거(*A. niger*), 아스퍼길러스 오리제(*A. oryzae*)), 페니실륨(*Penicillium*)(예: 페니실륨 에머소니이(*P. emersonii*), 페니실륨 크리소게눔), 사카로마이세스(*Saccharomyces*)(예: 사카로마이세스 세레비시아(*S. cerevisiae*)), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*)(예: 클루이베로마이세스 락티스(*K. lactis*)), 바실러스(*Bacillus*)(예: 바실러스 썩틸리스(*B. subtilis*), 바실러스 리체니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*)), 대장균(*Escherichia*) (이 콜라이(*E. coli*)), 스트렙토마이세스(예: 스트렙토마이세스 클라블리게러스)).
- <90> 대상의 베타-락탐 화합물의 생성을 위한 숙주 세포는 이들의 효과적인 베타-락탐 화합물의 생성을 위해 당해 기술에 공지된 숙주 세포인 것이 바람직하다. 바람직한 숙주 세포의 예는 다음의 속을 포함하지만, 이것으로 한정되는 것은 아니다: 페니실륨(예: 페니실륨 크리소게눔), 아크레모늄(*Acremonium*)(예: 아크레모늄 크리소게눔

(*A. chrysogenum*)), 스트렙토마이세스(예. 스트렙토마이세스 클라블리게러스), 노카디아(*Nocardia*)(예: 노카디아 락탐두런스), 라이소박터(*Lysobacter*)(예: 라이소박터 락탐게너스(*L. lactamgenus*)) 및 플라보박테리아(*Flavobacterium*) 종.

<91> 제 5 양태에 있어서, 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환된 숙주 세포를 변이주 익스팬다제의 생산에 유도적인 조건 하에서 배양하고, 선택적으로 변이주 익스팬다제를 회수하는 것을 포함하는, 본 발명의 변이주 익스팬다제를 생산하는 공정에 관한 것이다. 회수된 변이주 익스팬다제는 목적하는 세팔로스포린을 대응하는 페니실린으로부터 생산하는 세포의 공정에서 유리하게 사용될 수 있으며, 예컨대 회수된 변이주 익스팬다제는 Pen-G로부터 페닐아세틸-7-ADCA를, 또는 아디필-6-APA로부터 아디필-7-ADCA를 생산하는 공정에 사용될 수 있다.

<92> 제 6 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환된 숙주 세포를 대상의 베타-락탐 화합물의 제조에 유도적인 조건 하에서 배양하고, 선택적으로 베타-락탐 화합물을 회수하는 것을 포함하는, 대상의 베타-락탐 화합물을 제조하는 공정에 관한 것이다. 바람직한 베타-락탐 화합물은 페닐아세틸-7-ADCA, 아디필-7-ADCA, 아디필-7-ADAC 및 아디필-7-ACA와 같은 세팔로스포린 군에 속한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 변이주 익스팬다제를 코딩하는 본 발명의 선택된 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 페니실륨 크리소게눔의 선택된 균주를 배양함으로써 페닐아세틸-7-ADCA 또는 아디필-7-ADCA를 생성하는 방법을 제공한다. 크게 바람직한 변이주 익스팬다제는 H401, H402, H403, H501, H502, H503, H504, H505, H506, H507, H508, H601, H602, H603, H604, H605, H606, H607, H608, H609, H650, H651, H652, H653, H654, H655, H656, H657, H658, H659, H660, H661, H662, G601, G602, G603, G604, G605, G606, G607, G608, G609, G610, G611, G613, G614, H701, H702, H703, H704, H705, H706으로 구성되는 군으로부터 선택된다(표 3 및 4 참조). 페닐아세틸-7-ADCA의 생성을 위해서는, 기질로서 Pen-G 상에 높은 개선 인자를 갖는 변이주 익스팬다제가 선택된다. 아디필-7-ADCA의 생성을 위해서는, 기질로서 ad-6-APA 상에 높은 개선 인자를 갖는 변이주 익스팬다제가 선택된다.

<93> 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 전술된 바와 같이 페닐아세틸-7-ADCA 또는 아디필-7-ADCA를 생성하기 위한 공정, 및 이어서 상기 7-ADCA-유도체의 선택적인 정제 후, 페닐아세틸-7-ADCA 및 아디필-7-ADCA의 페닐아세틸 또는 아디필 측쇄 각각을 분할하여 7-ADCA 및 유리된 측쇄 산을 수득하는 공정 단계를 포함하는 7-ADCA의 생성을 위한 공정에 관한 것이다. 상기 분할은 화학적인 수단, 또는 더욱 바람직하게는 아실라제 효소를 사용하는 효소적인 수단에 의해 얻을 수 있다. 아디필 측쇄의 분할을 위한 적당한 아실라제는 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종, 예컨대 슈도모나스 SY-77 또는 슈도모나스 SE-83로부터 입수할 수 있다. 페닐아세틸 측쇄의 분할을 위한 적당한 아실라제는 대장균(*Escherichia coli*) 또는 알칼리게네스 패칼리스(*Alcaligenes faecalis*)로부터의 페니실린 아실라제이다.

<94> 제 7 양태에 있어서, 본 발명은, 페니실린의 5원 싸이아졸리딘 고리의 세팔로스포린의 6원 다이하이드로싸이아진 고리로의 확장이 본 발명의 변이주 익스팬다제에 의해 촉매화된 시험관 내 공정에서 일어나는, 대응하는 페니실린으로부터 세팔로스포린을 생성하는 공정에 관한 것이다. 바람직한 공정에서, 아디필-6-APA은 본 발명의 변이주 익스팬다제에 의해, 바람직하게는 기질로서 아디필-6-APA 상에서 크게 개선된 인자를 갖는 변이주 익스팬다제에 의해 대응하는 아디필-7-ADCA로 확장된다. 또 다른 바람직한 공정에 있어서, Pen-G는 본 발명의 변이주 익스팬다제, 바람직하게는 기질로서 Pen-G 상에서 크게 개선된 인자를 갖는 변이주 익스팬다제에 의해 대응하는 페닐아세틸-7-ADCA로 확장된다. 상기 공정에 이어서, 상기 7-ADCA-유도체의 선택적인 정제 후, 아디필-7-ADCA 및 페닐아세틸-7-ADCA의 측쇄가 분할되어 7-ADCA 및 유리된 측쇄 산을 생성하는 공정 단계가 수반된다 - 상기 참조. 목적하는 최종 산물인 7-ADCA는 아디필-7-ADCA 또는 페닐아세틸-7-ADCA의 측쇄의 화학적 또는 효소적 분할과 관련된, 당해 기술에서 공지된 방법에 따라 회수될 수 있으며, 선택적으로 결과의 7-ADCA는 추가로 정제 및/또는 결정화될 수 있다.

<95> 제 8 양태에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는, 본 발명의 변이주 익스팬다제를 수득하는 방법에 관한 것이다:

<96> 1. 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드를 코딩하는 클로닝된 유전자를 돌연변이시켜 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자 컬렉션(collection)을 수득하는 단계;

<97> 2. 적당한 숙주에서 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자의 컬렉션을 발현시키고, 적당한 기질을 사용하여 개선된 활성을 위한 변이주 익스팬다제의 컬렉션을 스크리닝하는 단계; 및

<98> 3. 선택적으로, 익스팬다제 활성을 갖는 모델 뉴클레오타이드를 코딩하는 유전자 또는 적당한 기질 상에서 개선된 활성을 갖는 변이주 익스팬다제를 코딩하는 돌연변이된 유전자 하나 이상을 사용하여 상기 단계 1 및 2를 1



회 또는 수회 반복하는 단계.

- <99> 익스팬다제 활성을 갖는 모델 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자의 클로닝은 당해 기술에서 공지된 방법에 따라 실시될 수 있다.
- <100> 익스팬다제 활성을 갖는 바람직한 모델 폴리펩타이드는, 표 1에 요약된 익스팬다제 효소와 같이, 바람직하게는 서열번호 1에 따른 아미노산 서열을 갖는 스트렙토마이세스 클라블리게러스로부터 입수할 수 있는 익스팬다제 활성을 갖는 폴리펩타이드; 및 70% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열번호 1과의 상동 백분율을 갖는 아미노산 서열을 갖는 익스팬다제 활성을 갖는 폴리펩타이드로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- <101> 전체 유전자에 걸쳐 돌연변이를 형성하는 임의 돌연변이 기법을 사용할 수 있다. 적당한 기법은 실수 유발(EP) PCR(폴리머라아제 연쇄 반응) 및/또는 WO 03/010183호에 따라 정확하게 포화된 돌연변이 프라이머 PCR(sMPP)를 사용하는 것이다.

물질 및 방법

- <102> 1. 일반
- <103> \* 올리고뉴클레오타이드를 인비트로젠(Invitrogen)(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)에 의해 합성하였다.
- <105> \* DNA 서열화는 SEQLAB(독일 괴팅겐 소재) 또는 베이스클리어(Baseclear)(네덜란드 라이덴 소재)에 의해 실시되었다.
- <106> \* 제한 효소는 인비트로젠으로부터 구매하였다.
- <107> \* 브래드포드(Bradford, M. M.)의 문헌 [(1976) Anal Biochem. 72:248-54]에 의해 기술된 방법에 따라 단백질 분석을 실시하였다.
- <108> \* 대장균 DH10B 일렉트로맥스 가능 세포(electromax competent cell)를 인비트로젠으로부터 입수하였다. 프로토콜은 제조자에 의해 전달되었다.
- <109> \* SDS-PAGE 전기영동법은 인비트로젠에 의해 공급된 시스템에서 실시되었다. 뉴페이지 노벡스 비스-트라이스 겔(NuPAGE Novex Bis-Tris Gels)(인비트로젠), 심플블루 세이프스테인 마이크로웨이브 프로토콜(SimplyBlue SafeStain Microwave protocol).
- <110> \* CefE 발현 벡터를 생성시키기 위해, pBAD/Myc-His(인비트로젠으로부터 시판 중임)에서의 암피실린 선택 마커를 제오진(zeozin) 선택 마커에 의해 교체한다. 또한, 말토스 결합 단백질을 야생형 스트렙토마이세스 클라블리게러스 익스팬다제 유전자에 융합시키고, pBAD 프로모터 뒤에 결합시켜서 벡터 pBAD/MH MBP-ScEwt를 생성시킨다. 야생형 CefE를 오류 프론 변이주의 라이브러리에 의해 교환한다.
- <111> 2. 미소적정 플레이트(MTP)에서의 1차 스크리닝
- <112> 성장 및 유도
- <113> 익스팬다제 이 콜라이(*E. coli*) 라이브러리를 루리아-버타니(Luria-Bertani; LB) 배지 플레이트 저염 아가 및 25 $\mu$ g/ml 제오신(Zeocine) 상에서 평판 배양시키고, 37 $^{\circ}$ C에서 밤새도록 배양시킨다. 150  $\mu$ L LB 저염 배지 및 25  $\mu$ g/ml 제오신을 갖는 미소 적정 플레이트(MTP)를 상기 플레이트로부터 접종시키고, 25 $^{\circ}$ C 및 550rpm에서 36시간 동안 배양시킨다.
- <114> MTP로부터 5  $\mu$ L를 1ml 2\*TY(트립톤 및 효모 추출물) 배지 + 50 $\mu$ g/ml 제오신 + 아라비노스를 갖는 깊은 웰 플레이트에 접종시킨다. MTP 중의 나머지 배지에 100  $\mu$ L의 50% 글라이세물을 첨가하고 글라이세물 스톱으로서 -80 $^{\circ}$ C에서 동결시킨다.
- <115> 깊은 웰 플레이트를 25 $^{\circ}$ C 및 550rpm에서 30시간 동안 배양시킨다. 깊은 웰 플레이트 배지를 10분 동안 2750rpm(헤라우스 멀티휴지(Heraeus multifuge) 4kr.)에서 원심분리시킨다. 상청액을 따라버리고 펠렛을 -20 $^{\circ}$ C에서 동결시킨다.
- <116> 세포 유리 추출물(CFE)
- <117> 상기 단락에서 얻은 동결된 펠렛을 200  $\mu$ L 추출 완충액(50mM 트라이스/HCl pH=7.5; 5mM DTT; 0.1mg/ml DNase;

5mM MgSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 및 0.5mg/ml 라이소짐)에서 해동시킨다. 재현탁된 펠렛에 상기 플레이트를 진탕시킨다. 플레이트를 실온에서 30분 동안 배양시키고 2750rpm에서 10분 동안 원심분리시킨다.

<118> 3. 진탕 플라스크에서의 2차 스크리닝

<119> 성장 및 유도

<120> 선택된 콜로니를 10ml LB 저염 + 제오신 25μg/ml에서 플레이트로부터 접종시켜 37°C 및 280rpm에서 배양시킨다. 성장된 배지를 0.010 내지 0.050의 광학 밀도(600nm)에서 25μg/ml 제오신을 갖는 100ml LB 저염에서 접종시킨다 (바이오크롬 울트라스펙(Biochrom Ultraspec) 2000). 37°C 및 280rpm에서 성장시킨 후, 세포를 0.4 내지 0.6의 광학 밀도(600nm)에서 수확한다. 이어서, 아라비노스를 첨가하고(최종 농도 0.2%), 27°C 및 220rpm에서 밤새도록 유도시킨다. 배지를 원심분리시키고, 상청액을 따라버리고, 펠렛을 -20°C에서 동결시킨다.

<121> 이 콜라이 발현 벡터의 클로닝

<122> 융합 단백질을 pBAD/MH MBP-ScEwt 데스트 제오 벡터(Dest zeo vector)에서 *EcoRI/SaII* 분해에 의해 결합시킨다. 이로 인해 야생형 익스팬다제 유전자가 라이브러리 유전자에 의해 치환된다. 상당한 수의 야생형 구조를 방지하기 위하여, 결합 구조를 *SmaI*로 분해시킨다.

<123> 라이브러리의 제작

<124> 결합 혼합물을 사용하여 이 콜라이를 형질전환시켜 대략 12,000 내지 13,000 콜로니 라이브러리를 수득한다. 상기 라이브러리의 품질을 시험하기 위해, 불규칙하게 콜로니 세트를 선택하여 제한 효소로 구조를 분해시킨다. 이것은 약 26%의 라이브러리가 변종 패턴을 갖는다는 것을 보여 준다. 다음, 돌연변이 빈도수를 측정하기 위해 통상의 10개의 클론 상에서 서열 분석을 실시한다. 포화 및 실수 유발 돌연변이 둘 다가 만족스러운 수준으로 존재한다는 것을 서열로 알 수 있다.

<125> 4. 익스팬다제 분석

<126> 50mM 트라이스/HCl pH 7.5; 1mM DTT; 2.7mM 아스코베이트; 0.05mM ATP; 24mM α-케토글루타레이트; 0.06mM FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 4 mM 아디필-6-아미노-페니실란산(ad-6-APA)을 함유한 반응 혼합물 총 300 μL을 75 μL CFE에 첨가하고 바라는 시간 동안 29°C에서 배양시킨다. 10g/L EDTA와 함께 60 μL 말레산을 첨가하여 반응을 정지시킨다. 아디필-7-아미노-테아세톡시-세팔로스포린산(ad-7-ADCA)의 형성을 <sup>1</sup>H-NMR를 사용하여 검출한다. 이들 조건 하에서, 익스팬다제 활성을 V<sub>최대</sub> 조건에 근접하게 측정하며, 이는 ad-6-APA에 대한 스트렙토마이세스 클라블리게러스 야생형 효소의 K<sub>M</sub>이 약 0.4mM이기 때문이다. 다르게는, 0.4mM ad-6-APA를 사용하여 검정을 실시할 수 있다 (ad-6-APA에 대한 스트렙토마이세스 클라블리게러스 야생형 효소의 대략 K<sub>M</sub>).

<127> 페니실린 아실라제(EC 3.5.1.11)에 의해 촉매화된 6-APA 및 아디프산으로부터 아디필-6-APA를 수득하였다. 다르게는, 전구체로서 아디프산의 존재 하에서 예를 들면 적당한 페니실린 크리소계류 균주를 배양시켜 아디필-6-APA를 제조할 수 있다.

**실시예**

실시예 1

제 1 세대의 개선된 익스팬다제(H400 시리즈)

<130> 야생형 스트렙토마이세스 클라블리게러스 *cefE* 유전자(서열번호 1) 상에서 실수유발(EP)PCR(폴리머라제 연쇄 반응)을 실시하여 제 1 세대 익스팬다제 라이브러리를 제작하였다. ad-6-APA의 ad-7-ADCA로의 개선된 전환을 위해 상기 라이브러리를 스크리닝한 후, 3개의 상이한 변이주 유전자를 선택하였다. 변이주는 2.5배까지 개선된 ad-6-APA 확장 활성을 나타낸다(H401, H402, H403: 표 3 참조).

실시예 2

제 2 세대의 개선된 익스팬다제(H500 시리즈)

<133> 정확하게 WO 03/010183 호에 따라 포화된 돌연변이 프라이머 PCR(sMPP)를 사용하여 제 2 세대 익스팬다제 라이브러리를 제작하였다. 제 2 세대 라이브러리의 제작을 위한 주형으로서 제 1 세대로부터 선택된 변이주 유전자(H401, H402 및 H403)를 사용하였다.



- <134> Taq 폴리머라제를 사용하여 sMPP를 실시함으로써 부가적인 돌연변이(불규칙적)를 도입하고, 라이브러리의 변형을 증가시켰다. 디자인된 프라이머를 돌연변이 위치에서 어닐링시키고, 제 1 세대 익스팬다제 히트에서 발견된 돌연변이에서 포화시켰다. 또한, *NdeI* 및 *NsiI* 자리가 각각 도입된 다목적 전진 및 역전 프라이머를 설계하였다. 이로 인해, 생체 내에서 변이주 익스팬다제의 시험을 위한 페니실린 발현 벡터로의 클로닝이 용이하게 되었다.
- <135> 라이브러리를 성장시키고, "물질 및 방법" 단락에서 기술된 바에 따라 익스팬다제의 발현을 유도하였다. "물질 및 방법" 단락에 기술된 바에 따라 NMR을 사용하여 ad-7-ADCA의 형성을 측정하였다.
- <136> 약 150개의 개선된 변이주 익스팬다제를 선택하여 이들의 ad-6-APA 익스팬다제 활성화에 대해 재분석하였다. 이러한 재분석의 결과에 기초하여, "물질 및 방법"에 기술된 바에 따라 진탕 플라스크에서의 최종 시험 및 HPLC에 의한 분석을 위해 17개의 변이주를 선택하였다.
- <137> 17개의 선택된 히트 중 총 15개는 기질로서 ad-6-APA를 사용하여 상당히 개선된 익스팬다제 활성을 보여주었다. 발현 변이주의 오진(flase positive) 선택을 배제시키기 위하여, 단백질 수준을 SDS-PAGE 상에서 정량화하였다. 이것으로부터, 개선된 활성이 이 콜라이에서의 익스팬다제의 더욱 강한 발현 때문이 아니라, 익스팬다제 변이주의 개선된 특이 활성으로 인해 유도된다는 것을 확인하였다.
- <138> 4.5배까지(스트렙토마이세스 클라블리게러스의 야생형 익스팬다제(서열번호 1)에 비교하여) ad-6-APA 익스팬다제의 개선 인자를 보여 주는 총 8개의 변이주 익스팬다제를 확인하였다. 이러한 변이주는 H501 내지 H508로 지정되었다(표 3 참조).

실시예 3

제 3 세대의 개선된 익스팬다제(H600 시리즈)

- <139> 실시예 2의 제 2 세대 익스팬다제에서 얻은 8개의 변이주(H501 내지 H508)를 제 3 세대의 익스팬다제 라이브러리의 제작을 위해 주형으로서 사용하였다. 제 2 세대의 익스팬다제 라이브러리와 동일한 방법으로 라이브러리를 제작하였다. 또한, 익스팬다제의 C-말단에서 SKA 신호 서열을 SKD로 변화시켜 페니실린에서 발현시 시토솔(cytosol)에서 단독으로 익스팬다제의 발현을 유발시켰다.
- <142> 라이브러리를 스크리닝하여서, 스트렙토마이세스 클라블리게러스 익스팬다제와 비교하여 5 내지 11배로 상당히 개선된 22개의 상이한 익스팬다제 변이주 유전자를 수득하였다(표 3, H600 시리즈).
- <143> 기질로서 Pen-G를 7mM로 사용하여 두 번째로 동일한 라이브러리를 스크리닝하여 13개의 추가적인 변이주 익스팬다제를 수득하였다(G601 내지 G611 및 G613 내지 G614; 표 3 참조).

실시예 4

제 4 세대의 개선된 익스팬다제(H700 시리즈)

- <144> 실시예 3의 제 3 세대 익스팬다제에서 얻은 10개의 변이주(G606, G612, H602, H606, H650, H651, H653, H655, H658, H661)를 제 4 세대의 익스팬다제 라이브러리의 제작을 위해 주형으로서 사용하였다. 제 3 세대의 익스팬다제 라이브러리와 동일한 방법으로 이 라이브러리를 제작하였다.
- <147> 라이브러리를 스크리닝하여서, 0.4mM 농도에서 ad-6-APA 상에서 이들의 익스팬다제 활성화에 대해 시험하는 경우 유의적으로 개선된(20배 이하) 6개의 상이한 익스팬다제 변이주 유전자를 수득하였다(표 4, H701 내지 H706).

실시예 5

기질로서 아이소-페니실린 *N*(iPN) 및 페니실린-G(Pen-G)를 사용하는 개선된 변이주 익스팬다제의 활성

- <149> 기질로서 iPN 및 Pen-G를 사용하여 수개의 변이주 익스팬다제의 활성을 측정하였다. ad-6-APA를 동일한 농도의 iPN(4mM)로 대체하는 것을 제외하고는, 상기 "물질 및 방법" 단락에 기술된 바에 따라 기질로서 iPN을 사용하여 분석을 실시하였다. ad-6-APA를 7mM Pen-G로 대체하는 것을 제외하고는, 상기 "물질 및 방법" 단락에 기술된 바에 따라 기질로서 Pen-G를 사용하여 분석을 실시하였다. 표 3은, iPN 및 Pen-G에 대한 다양한 익스팬다제 변이주의 활성을 요약한 것이다.
- <151> 시험된 익스팬다제 변이주 대부분이 iPN으로는 익스팬다제의 활성을 5배 개선시킨 반면, T89K 돌연변이를 갖는 변이주는 iPN에 대해 실질적으로 모든 활성을 상실하였다.

<152> 시험된 다양한 익스팬다제 변이주의 Pen-G에 대한 활성은, 야생형 익스팬다제와 동일하거나(개선 인자는 1임) 또는 8배까지 개선되었다. 기질로서 ad-6-APA 및 Pen-G를 사용하여 단일 변이주에서 수득된 개선된 인자 사이에는 어떠한 상관 관계가 없다는 것을 데이터로부터 알 수 있었다. ad-6-APA 및 Pen-G에 대한 각각의 개선 인자 사이의 비는 0.1(예: H654) 내지 1.2(예: H503)의 범위에서 변화하였다.

<153> 표 3 - 변이주 익스팬다제 및 ad-6-APA, Pen-G 및 iPN에 대한 이것의 익스팬다제 활성(각각의 변이주는 이것의 코드에 의해 식별되며, 스트렙토마이세스 클라블리케러스로부터 모델 익스팬다제(서열번호 1)에 돌연변이가 도입되었으며, 익스팬다제 활성은 "물질 및 방법" 및 실시예 4에 기술된 시험관 내 익스팬다제 분석에 따라 스트렙토마이세스 클라블리케러스로부터 모델 익스팬다제(익스팬다제 활성을 1로 정의함)와 비교하여 개선 인자로서 표시된다.

표 3

변이주		돌연변이	익스팬다제 활성 (개선 인자)		
	코드		ad-6-APA	Pen-G	iPN
1.	H401	L277Q	1.5		
2.	H402	D2N+C281Y	2.5		
3.	H403	T89A	1.5		
4.	H501	T89A+C281Y	3.9	3.0	2.6
5.	H502	D2Y+C281Y+R306Δ+A311D	4.5	4.0	5.3
6.	H503	D2N+T89V+C281Y	3.5	4.0	3.2
7.	H504	T89K+C281Y+T293K	3.9	1.0	0.0
8.	H505	T89K+C281Y	3.3	1.0	0.0
9.	H506	L277Q+G300S	2.9	3.0	4.6
10.	H507	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y	3.7	3.0	3.0
11.	H508	D2H+L277Q+E280G+C281Y	4.6	4.0	5.1
12.	H601	M73H+T89K+C281Y+A311D	7.5	1.2	0.0
13.	H602	T89K+Y217H+C281Y+A311D	7.6	1.1	0.0
14.	H603	T89K+H244R+C281Y+A311D	6.8	1.7	0.0
15.	H604	T89K+C281Y+R307T+A311D	6.9	1.4	0.0
16.	H605	T89K+C281Y+R307T+A311D	7.2	1.5	0.0
17.	H606	M73I+T89K+C281Y+T293K+G300S+R307T+A311D	8.8	1.9	0.0
18.	H607	T89K+C281Y+T293K+G300S+A311D	7.0	1.3	0.0
19.	H608	T89K+C281Y+A311D	5.8	1.0	0.0
20.	H609	M73H+T89K+T213A+C281Y+A311D	6.2	1.3	0.0
21.	H650	T105I+G113D+C155W+P177L+C281Y+R306Δ+A311D	8.2	7.1	11,0
22.	H651	C155W+P177L+L277Q+E280G+C281Y+R306Δ+A311D	10.6	8.9	11,0
23.	H652	L277Q+C281Y+R306Δ+A311D		5.0	10,0
24.	H653	T89V+C281Y+R306Δ+A311D	9.0	5.8	11,0
25.	H654	T89K+R249C+C281Y+R306Δ+A311D	6.3	0.8	0,0
26.	H655	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+C281Y+R306Δ+A311D	8.2	7.1	10,0
27.	H656	D2N+N90S+M99T+T105I+G113D+C281Y+R306Δ+A311D	5.0	3.7	5,0
28.	H657	N90S+T105I+G113D+C281Y+R306Δ+A311D	6.9	4.6	8,0
29.	H658	D2N+T89V+C281Y+R306Δ+A311D	8.4	6.3	10,0
30.	H659	T89K+C281Y+R306Δ+A311D	6.4	0.8	0,0
31.	H660	N90W+C281Y+R306Δ+A311D	5.3	4.4	5,0
32.	H661	D2Y+C155W+C281Y+R306Δ+A311D	9.7	6.4	
33.	H662	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y+R306Δ+A311D	5.6	5.2	6,0
34.	G601	T89V+A278V+C281L+307 결손 +A311D	7.4	6.8	
35.	G602	D2N+T89V+C155W+P177L+L277T+C281Y+A311D	3.9	4.4	

<154>

36.	G603	S59G+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+G209S+C281Y+307 결손 +A311D	6.3	6.4	
37.	G604	D2N+N90W+C281Y+307 결손 +A311D	4.6	5.7	
38.	G605	D2Y+C155W+P177I+C281Y+307 결손 +A311D+SGRS	5.1	4.6	
39.	G606	D2Y+N90S+Y101F+T105I+G113D+C155W+P177I+C281Y+307 결손 +A311D	8.2	8.1	
40.	G607	N90S+T105I+G113D+C155W+P177I+C281Y+R307T+A311D	7.2	6.7	
41.	G608	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177I+L277T+C281Y+R307I+A311D	6.0	4.6	
42.	G609	D2Y+T89V+C281Y+307 결손 +A311D	6.6	4.5	
43.	G610	D2N+T89V+T105I+G13D+C155W+P177L+C281Y+A311D	6.4	7.7	
44.	G611	T89V+T105I+G13D+C155W+P177L+C281Q+307 결손 +A311D	7.0	7.9	
45.	G613	T89V+H170Y+D251G+L277Q+C281Y+307 결손 +A311D	4.3	4.4	
46.	G614	D2Y+N90S+T105I+G113D+C155W+P177L+L277T+C281Y+T293K+307 결손 +A311D	7.2	8.9	

<155>

<156>

표 3으로부터, 1.5 내지 10.6배의 개선 인자를 갖는 변이주 익스팬다제가 수득된다는 것을 알 수 있다.

**표 4**

변이주	코드	돌연변이	아디필-6-APA를 사용하는 익스팬다제 활성 (개선 인자)	
			4 mM	0.4 mM
47.	H701	T105I+G113D+C281Y+G300K+307 결손 +A311D	13	20
48.	H702	N90S+T105I+G113D+C155W+L277K+C281Y+G300L+307 결손 +A311D	12	16
49.	H703	D2Y+M73I+T89K+ T105K+G113D+C281Y+307 결손 +A311D	8	12
50.	H704	M73I+T89K+L277K+C281Y+307 결손 +A311D	8	11
51.	H705	D2N+M73I+T89K+L277Q+E280G+C281Y+307 결손 +A311D	9	13
52.	H706	C155W+C281Y+G300K+307 결손 +A311D	11	16

<157>

**서열목록**

SEQUENCE LISTING

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> Mutant expandases

<130> 24867W0

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 936

<212> DNA

<213> Streptomyces clavuligerus

<220>

<221> exon

<222> (1)..(933)

<223>

<400> 1

atg gac acg acg gtg ccc acc ttc agc ctg gcc gaa ctc cag cag ggc 48  
 Met Asp Thr Thr Val Pro Thr Phe Ser Leu Ala Glu Leu Gln Gln Gly  
 1 5 10 15

ctg cac cag gac gag ttc cgc agg tgt ctg agg gac aag ggc ctc ttc 96  
 Leu His Gln Asp Glu Phe Arg Arg Cys Leu Arg Asp Lys Gly Leu Phe  
 20 25 30

tat ctg acg gac tgc ggt ctg acc gac acc gag ctg aag tcg gcc aag 144  
 Tyr Leu Thr Asp Cys Gly Leu Thr Asp Thr Glu Leu Lys Ser Ala Lys  
 35 40 45

gac atc gtc atc gac ttc ttc gag cac ggc agc gag gcg gag aag cgc 192  
 Asp Ile Val Ile Asp Phe Phe Glu His Gly Ser Glu Ala Glu Lys Arg  
 50 55 60

gcc gtc acc tcg ccc gtc ccc acc atg cgc cgc ggc ttc acc ggg ctg 240  
 Ala Val Thr Ser Pro Val Pro Thr Met Arg Arg Gly Phe Thr Gly Leu  
 65 70 75 80

gag tcg gag agc acc gcc cag atc acc aat acc ggc agc tac tcc gac 288  
 Glu Ser Glu Ser Thr Ala Gln Ile Thr Asn Thr Gly Ser Tyr Ser Asp  
 85 90 95

tac tcg atg tgc tac tcg atg ggc acc gcg gac aac ctc ttc ccg tcc 336  
 Tyr Ser Met Cys Tyr Ser Met Gly Thr Ala Asp Asn Leu Phe Pro Ser  
 100 105 110

ggt gac ttc gag cgg atc tgg acc cag tac ttc gac cgc cag tac acc 384  
 Gly Asp Phe Glu Arg Ile Trp Thr Gln Tyr Phe Asp Arg Gln Tyr Thr  
 115 120 125

gcc tcc cgc gcg gtc gcc cgg gag gtc ctg cgg gcg acc ggg acc gag 432  
 Ala Ser Arg Ala Val Ala Arg Glu Val Leu Arg Ala Thr Gly Thr Glu  
 130 135 140

ccc gac ggc ggg gtc gag gcc ttc ctc gac tgc gag ccg ctg ctg cgg 480  
 Pro Asp Gly Gly Val Glu Ala Phe Leu Asp Cys Glu Pro Leu Leu Arg  
 145 150 155 160

ttc cgc tac ttc ccg cag gtc ccc gag cac cgc agc gcc gag gag cag 528

Phe Arg Tyr Phe Pro Gln Val Pro Glu His Arg Ser Ala Glu Glu Gln 165 170 175	
ccc ctg cgg atg gcg cgg cac tac gac ctg tgc atg gtc acc ctc atc Pro Leu Arg Met Ala Pro His Tyr Asp Leu Ser Met Val Thr Leu Ile 180 185 190	576
cag cag aca ccc tgc gcc aac ggc ttc gtc agc ctc cag gcc gag gtc Gln Gln Thr Pro Cys Ala Asn Gly Phe Val Ser Leu Gln Ala Glu Val 195 200 205	624
ggc ggc gcg ttc acg gac ctg ccc tac cgt ccg gac gcc gtc ctc gtc Gly Gly Ala Phe Thr Asp Leu Pro Tyr Arg Pro Asp Ala Val Leu Val 210 215 220	672
ttc tgc ggc gcc atc gcg acc ctg gtg acc ggc ggc cag gtc aag gcc Phe Cys Gly Ala Ile Ala Thr Leu Val Thr Gly Gly Gln Val Lys Ala 225 230 235 240	720
ccc cgg cac cat gtc gcg gcc ccc cgc agg gac cag ata gcg ggc agc Pro Arg His His Val Ala Ala Pro Arg Arg Asp Gln Ile Ala Gly Ser 245 250 255	768
agc cgc acc tcc agt gtg ttc ttc ctc cgt ccc aac gcg gac ttc acc Ser Arg Thr Ser Ser Val Phe Phe Leu Arg Pro Asn Ala Asp Phe Thr 260 265 270	816
ttc tcc gtc cgg ctg gcg cgc gag tgc ggc ttc gat gtc agc ctg gac Phe Ser Val Pro Leu Ala Arg Glu Cys Gly Phe Asp Val Ser Leu Asp 275 280 285	864
ggc gag acc gcc acg ttc cag gat tgg atc ggg ggc aac tac gtg aac Gly Glu Thr Ala Thr Phe Gln Asp Trp Ile Gly Gly Asn Tyr Val Asn 290 295 300	912
atc cgc cgc aca tcc aag gca tga Ile Arg Arg Thr Ser Lys Ala 305 310	936