



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108617** (13) **C2**
(51) МПК (2015.01)
C12P 13/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2012 02052	(72) Винахідник(и):	Бу Лян (NL), Рамакерс-Франкен Петронела Катаріна (NL)
(22) Дата подання заявки:	20.07.2010	(73) Власник(и):	ДСМ АЙПІ АСЕТС Б.В., Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.05.2015	(74) Представник:	Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	09166374.0	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2006/005604 A, 19.01.2006 JP 4 349 890 A, 04.12.1992 JP 56 151 494 A, 24.11.1981 EP 1 260 588 A, 27.11.2002
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	24.07.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.06.2012, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.05.2015, Бюл.№ 10		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/EP2010/060480, 20.07.2010		

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ 1,4-ДІАМІНОБУТАНУ

(57) Реферат:

Даний винахід належить до нового способу одержання 1,4-діамінобутану (ДАБ). Спосіб, запропонований даним винаходом, передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, яка включає біокаталітичне одержання щонайменше одного N-захищеного попередника ДАБ.

Даний винахід також належить до способу одержання ДАБ, який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, яка включає стадії:

- біокаталітичного одержання N-захищеного попередника ДАБ, що приводить до біокаталітичної реакційної суміші, що містить N-захищений попередник ДАБ,
- виділення N-захищеного попередника з біокаталітичної реакційної суміші й
- перетворення N-захищеного попередника на ДАБ. У кращому варіанті, даний винахід належить до способу одержання ДАБ, у якому щонайменше N-захищений попередник ДАБ вибирають з групи, яка складається з N5-захищеного орнітину, N-захищеного ДАБ і N-захищеного 4-амінобутиральдегіду.

UA 108617 C2

Даний винахід відноситься до способу одержання 1,4-діамінобутану (DAB, ДАБ), який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію.

Сполука ДАБ є важливою сировиною для одержання деяких важливих технічних пластмас: поліаміду-4,6 або у формі гомополімеру або співполімеру, який містить, наприклад, приблизно 5 мас. % мономера поліаміду-6 (капролактаму). Гомополімер, поліамід-4,6 (найлон-4,6), описаний ще в 1938 році (US-A-2,130,948, Carothers). Він є продуктом поліконденсації мономерів ДАБ і адипінової кислоти. На даний час головним чином продукти на основі поліаміду-4,6 виробляє і продає фірма DSM у Нідерландах під торговельною маркою STANYL®.

Відомий ряд хімічних способів синтезу ДАБ. Такі хімічні способи мають той недолік, що вихідні матеріали одержують із джерел, які вважають невідновлюваними. Таким чином існує реальна потреба розробки нових і здійснених способів синтезу ДАБ, що ґрунтуються на використанні поновлюваних вуглецевих джерел, які використовують біохімічні способи (і які також називаються "біотрансформацією").

Спосіб одержання ДАБ, який передбачає щонайменше одну ферментативну стадію, описаний в РСТ заявках, опублікованих як в WO2006/005603 і в WO2006/00504. Обидва документа описують ферментативне одержання ДАБ у мікроорганізмі, який має підвищений рівень орнітиндекарбоксилазної активності.

Даний спосіб відноситься до альтернативного способу одержання ДАБ. Спосіб запропонований даним винаходом передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, яка включає біокаталітичне одержання щонайменше одного N-захищеного попередника ДАБ і наступне *in vitro* перетворення N-захищеного попередника на ДАБ.

Було показано, що виділення ДАБ після біокаталітичного одержання супроводжується значними труднощами. В WO2007/079944 описане виділення органічного аміну, наприклад, ДАБ. У конкретному варіанті здійснення, описаного в ньому, концентрують безклітинне поживне середовище, яке містить сульфатну або фосфатну сіль аміну (тому, наприклад, DAB-дисульфат) і додають основу, наприклад, аміак. Залежно від умов утворюється двошарова система. Із шару, який містить бажано органічні сполуки, може бути виділений потрібний амін.

Докладний опис винаходу

Відповідно до одного з варіантів здійснення спосіб одержання ДАБ передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію й містить стадії (а) біокаталітичного одержання N-захищеного попередника ДАБ, що призводить до одержання біокаталітичної реакційної суміші, яка містить N-захищений попередник ДАБ, (b) виділення N-захищеного попередника з біокаталітичної реакційної суміші, (c) перетворення N-захищеного попередника на ДАБ.

Згідно з конкретним варіантом здійснення даний винахід, який відноситься до одержання ДАБ передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, яка включає біокаталітичне одержання щонайменше одного N-захищеного попередника ДАБ, обраного із групи, яка складається із N⁵-захищеного орнітину, N-захищеного ДАБ і N-захищеного 4-амінобутиральдегіду й наступної конверсії *in vitro* N-захищеного попередника в ДАБ.

Що стосується "перетворення *in vitro*", то тут це означає перетворення N-захищеного попередника ДАБ на ДАБ у середовищі, яке перебуває за межами клітини. Перетворення *in vitro* може бути перетворенням щонайменше під дією одного біокаталізатора або може бути хімічним перетворенням, яке передбачає щонайменше одну хімічну стадію або можуть бути комбінацією щонайменше однієї біокаталітичної і однієї хімічної стадії.

Що стосується "N-захищеного попередника ДАБ", то тут це означає сполуку, яка містить захищену аміногрупу і яка може бути перетвореною на ДАБ за допомогою щонайменше однієї хімічної або біокаталітичної реакції або комбінації біокаталітичної та хімічної реакцій.

Що стосується "N⁵-захищеного орнітину", то тут це означає молекулу орнітину, яка містить захисну групу при його N⁵ атомі; що стосується "N-захищеного ДАБ", то тут це означає молекулу ДАБ, яка містить захисну групу при одній з її аміногруп; і що стосується "N-захищеного 4-амінобутиральдегіду", то тут це означає молекулу 4-амінобутиральдегіду, яка містить захисну групу при аміногрупі.

Захисні групи, про які йшла мова вище, можуть бути обраними із групи, яка включає з ацильні групи, які містять 1-6 атомів вуглецю або можуть бути гуанідильною групою. Таку захисну групу слід вибирати так, щоб була можливість здійснити щонайменше одне біокаталітичне перетворення, легко виділити N-захищений попередник з біокаталітичної реакційної суміші (наприклад, з ферментаційного поживного середовища) і наступні біокаталітичні й/або хімічні реакції, що в остаточному підсумку приводить до одержання ДАБ.

N-захищені попередники ДАБ можуть бути отримані ацилюванням, наприклад, 4-амінобутиральдегіду або орнітину. Наприклад, ацилюванням ангідридом оцтової кислоти в мурашиній кислоті для введення формільної захисної групи або реакцією ангідридів C₂-C₆

карбонових кислот або хлорангідридів для введення N-ацетильної, N-пропіонільної, N-бутирильної, N-валерильної або N-капроїльної захисної групи, відповідно.

Попередниками, захищеними N-гуанідильною групою, є, наприклад, протеїногенний аргінін або N-гуанідиламінобутиральдегід або N-гуанідил-ДАБ. Описаний ферментативний шлях, наприклад, в EP1260588, який описує біохімічне одержання агматину з аргініну під дією аргініндекарбоксилази. Агматин є N-гуанідил-захищеним ДАБ. Агматин (N-гуанідил-захищений ДАБ) може бути легко депротектованим з утворенням ДАБ шляхом кислотного гідролізу, наприклад, кип'ятінням агматину в концентрованому розчині мінеральної кислоти, наприклад, у водному концентрованому розчині хлористоводневої або сарної кислоти. Це приводить до утворення дигідросоли ДАБ і побічних продуктів: діоксиду вуглецю й аміаку (останній перебуває у формі його амонієвої солі з використаною мінеральною кислотою). Для одержання ДАБ у формі його вільного аміну, слід виділити його дигідросіль, повторно розчинити й нейтралізувати основою.

Відповідно до наступного варіанта здійснення даний винахід відноситься до способу одержання ДАБ, згідно з яким щонайменше утворюється один N-захищений попередник ДАБ, причому даний N-захищений попередник обраний із групи, яка складається з N⁵-ацетилорнітину, N-ацетилДАБ і ацетил-4-амінобутиральдегіду.

Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення спосіб одержання ДАБ, який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, складається зі стадій: (а) біокаталітичного одержання N⁵-ацетилорнітину, яка призводить до одержання біокаталітичної реакційної суміші, яка містить N⁵-ацетилорнітин, (b) виділення N⁵-ацетилорнітину з біокаталітичної реакційної суміші й (c) перетворення N⁵-ацетилорнітину на ДАБ.

Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення спосіб одержання ДАБ, який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, складається зі стадій: (а) біокаталітичного одержання N⁵-ацетилДАБ, що призводить до біокаталітичної реакційної суміші, яка містить N-ацетилДАБ, (b) виділення N-ацетилДАБ з біокаталітичної реакційної суміші й (c) перетворення N-ацетилДАБ на ДАБ.

Відповідно до одного з конкретних варіантів здійснення спосіб одержання ДАБ, який включає щонайменше одну біокаталітичну стадію, складається зі стадій: (а) біокаталітичного одержання N-ацетил-4-амінобутиральдегіду, що призводить до біокаталітичної реакційної суміші, яка містить N-ацетил-4-амінобутиральдегід, (b) виділення N-ацетил-4-амінобутиральдегіду з біокаталітичної реакційної суміші й (c) перетворення N-ацетил-4-амінобутиральдегіду на ДАБ.

При посиланні на амін або N-захищений амін у прямому або непрямому вигляді, наприклад, N-захищений ДАБ, мають на увазі, що ці терміни позначають нейтральну аміногрупу, відповідний заряджений протонований амін, а також його солі.

Визначення

Термін "або", так, як він використовується тут, визначається як "і/або" за винятком особливо зазначених випадків.

Термін, які використовуються в однині, означають – "щонайменше один" за винятком окремо зазначених випадків.

Мають на увазі, що при посиланні на іменник (наприклад, сполуку, добавку тощо) в однині, включається також і множина.

При посиланні на сполуку, яка існує у вигляді стереоізомерів, така сполука може бути представлена кожним із цих стереоізомерів або їх комбінацією. Таким чином, при посиланні на амінокислоту, яка існує у вигляді енантіомерів, амінокислота може бути L-енантіомером або D-енантіомером або бути представленою їх комбінацією. У випадку, коли існує природний стереоізомер, кращою сполукою є природний стереоізомер.

Коли згадується фермент при посиланні на клас ферментів (EC) у дужках, клас ферментів є таким класом, у якому фермент класифікований або може бути класифікований відповідно до Номенклатури Ферментів, наданої Комітетом з Номенклатури Міжнародного Союзу з Біохімії й Молекулярної Біології (NC-IUBMB), причому дана номенклатура може бути знайдена в <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. Мають на увазі, що включені й інші придатні ферменти, які поки не виділені в окремий клас, але власне можуть бути класифікованими.

Термін "гомологічний" або "гомолог" або "ортолог" відноситься до споріднених послідовностей, які мають функціональний зв'язок, і звичайно визначаються, виходячи зі ступеня ідентичності послідовності. Ці терміни можуть описувати взаємозв'язок, виявлений в генах одних видів, підвидів, різновидів, сортів або штамів і відповідних або еквівалентних генів інших видів, підвидів, різновидів, сортів або штамів. Вони можуть також описувати взаємозв'язок між геном, знайденим у природі й штучно сконструйованим геном або між двома штучно сконструйованими генами. Функціональний взаємозв'язок може проявлятися одним з декількох

способів, які включають, але не обмежуються (а) ступенем ідентичності послідовності; (b) однією й тією ж або подібною біологічною функцією. Бажано, проявляються як (а), так і (b). Мають на увазі також, що термін гомолог охоплює послідовності нуклеїнових кислот (послідовності полінуклеотидів), які відрізняються від іншої послідовності нуклеїнової кислоти через виродженість генетичного коду й кодують ту саму поліпептидну послідовність.

Всюди в тексті, де використано термін "гомолог" у застосуванні до поліпептиду, мова йде про поліпептид, який має ту ж саму або подібну біологічну функцію й деякою мірою ідентичну послідовність щодо стандартного поліпептиду. Конкретно мова йде про ідентичність послідовності, яка відповідає щонайменше 30 %, бажано щонайменше 40 %, особливо бажано щонайменше, 60 %, особливо бажано щонайменше, 65 %, особливо бажано щонайменше, 70 %, особливо бажано щонайменше, 75 %, особливо бажано щонайменше, 80 %, конкретно щонайменше 85 %, особливо бажано, щонайменше, 90 %, щонайменше 91 %, щонайменше, 92 %, щонайменше, 93 %, щонайменше, 94 %, щонайменше, 95 %, щонайменше, 96 %, щонайменше, 97 %, 98 % або щонайменше, 99 %.

"Ідентичність послідовності" або "подібність послідовності" тут визначається як взаємозв'язок між двома або декількома поліпептидними послідовностями або двома або декількома послідовностями нуклеїнових кислот, визначений шляхом порівняння послідовностей. Звичайно, проводять порівняння ідентичності або подібності послідовностей за всією довжиною послідовностей, але можна також проводити порівняння тільки між частинами послідовностей, вирівняних одна з одною. У даній галузі техніки "ідентичність" або "подібність" також означає ступінь подібності послідовностей між поліпептидними послідовностями або послідовностями нуклеїнових кислот, залежно від ситуації, що визначається збігом між такими послідовностями. Розроблені кращі способи визначення ідентичності або подібності, які дають найбільшу відповідність між вивченими послідовностями. У контексті даного винаходу краща комп'ютерна програма способу визначення ідентичності й подібності між двома послідовностями представлена BLASTP і BLASTN (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 1990, 215, 403-410, відкрито доступний з NCBI і інших джерел (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Кращими параметрами порівняння поліпептидної послідовності при використанні BLASTP є штраф за відкриття пробілу 10,0, штраф за наступний пробіл 0,5, матриця Blosom 62. Кращими параметрами порівняння послідовності нуклеїнових кислот при використанні BLASTP є штраф за відкриття пробілу 10,0, штраф за наступний пробіл 0,5, повна матриця ДНК (матриця тотожності ДНК).

Що стосується "біотрансформації" або "біокаталітичної реакції", то тут це означає біохімічну реакцію, у якій як каталізатор використовують фермент. Скрізь відповідно до даного винаходу, указують, що коли використовують біокаталізатор, щонайменше, одна реакційна стадія в даному способі каталізується біологічним матеріалом або речовиною, виділеними з біологічного джерела, наприклад, з організму, або біомолекулою, виділеною з нього. Зокрема, біотрансформація може бути ферментативною стадією. Зокрема, біокаталізатор може містити один або кілька ферментів. Біокаталізатор може бути використаний у будь-якій формі. У конкретному варіанті здійснення використовують один або кілька ферментів, виділених із природного оточення (виділених з організму, у яких вони утворюються), наприклад, у вигляді розчину, емульсії, дисперсії, (суспензії) ліофілізованих клітин, у вигляді лізату або будучи іммобілізованими на основі. В одному з варіантів здійснення один або кілька ферментів утворюють частину живого організму (наприклад, живих цілих клітин). Ферменти можуть виконувати каталітичну функцію усередині клітини. Також можливо, щоб фермент міг секретуватися в середовище, де перебувають клітини.

Що стосується "біокаталітичної реакційної суміші", то це означає тут середовище, у якому проходить біокаталітична реакція. Це може бути клітинне оточення (для внутрішньоклітинних або позаклітинних біокаталітичних реакцій) або безклітинне середовище.

Що стосується "ферментативної стадії", то тут це означає стадію способу, на якій утворення або конверсія конкретної хімічної сполуки відбувається в одноклітинному організмі, особливо бажано в мікроорганізмі в культурі клітин. "Ферментативне одержання" означає тут одержання хімічної сполуки в мікроорганізмі, який містить біокаталізатор у культурі клітин, що містить ферментоване джерело вуглецю, у якому вуглець входить до складу кожної із зазначених сполук, які можуть перетворюватися на конкретну хімічну сполуку, яка може бути отриманою або в якому клітини містять сполуку для перетворення її на конкретну хімічну сполуку, яка може бути отриманою із джерела вуглецю. Мікроорганізм може бути природним виробником конкретної хімічної сполуки або він може набути здатність продукувати конкретну хімічну сполуку в результаті трансформації геном, який кодує щонайменше один придатний фермент, використовуючи технології рекомбінантної ДНК. Природний виробник конкретної хімічної

сполуки може бути також трансформований геном, який кодує щонайменше один придатний фермент, використовуючи технологію рекомбінантної ДНК для того, щоб збільшити продукцію потрібної хімічної сполуки й/або зменшити продукцію компонентів, які можуть знизити продуктивність потрібної хімічної сполуки або перешкодити здійсненню подальших стадій способу відповідно до даного винаходу.

Кращі мікроорганізми для ферментативного одержання N-захищеного попередника ДАБ можуть мати еукаріотичне або прокаріотичне походження. Зокрема, вони можуть бути обрані із клітин тварин (у тому числі людини), рослинних клітин, бактерій, археобактерій, дріжджів і грибів. Найкраще, якщо мікроорганізми обрані із групи, яка складається з бактерій, наприклад, *Bacillus* (зокрема, *B. subtilis*), *Brevibacterium* (зокрема, *B. ketoglutamicum*), коринібактерій (зокрема, *C. glutamicum*), *Escherichia* (зокрема, *E. coli*), *Klebsiella* (зокрема, *K. pneumoniae*), молочнокислих бактерій (зокрема, *L. lactis*), пропіонових бактерій, псевдомонад (зокрема, *P. putida*), *Rodococcus* (зокрема, *R. erythropolis*), *Streptomyces* (зокрема, *S. coelicor* і *S. clavuligerus*), дріжджів, наприклад, *Kluyveromyces* (зокрема, *K. fragilis*), *Penicillium* (зокрема, *P. chrysogenum*), *Saccharomyces* (зокрема, *S. cerevisiae*), *Aspergillus* (зокрема, *A. niger*), *Pichia* (зокрема, *P. pastoris*), *Hansenula*, *Schizosaccharomyces* (зокрема, *S. pombe*), *Yarrowia* (зокрема, *Y. lipolytica*), грибів, наприклад, *Talaromyces*.

У найкращому варіанті здійснення ферментативне одержання N-захищеного попередника відбувається в мікроорганізмі, у якому N-захищений попередник утворюється *in vivo*. Бажано, утворення N-захищеного попередника відповідно до даного винаходу є біотрансформацією в N-захищений попередник з будь-якого придатного джерела вуглецю.

Джерело вуглецю для способу ферментації може, зокрема, містити щонайменше одну сполуку, обрану із групи монофункціональних спиртів, поліфункціональних спиртів, карбонових кислот, діоксиду вуглецю, жирних кислот, гліцеридів, у тому числі сумішей, які містять будь-які із зазначених сполук. Придатні монофункціональні спирти включають метанол і етанол; придатні поліфункціональні спирти включають гліцерин і вуглеводи. Придатні жирні кислоти або гліцериди можна, зокрема, одержати у формі придатної до вживання в їжу олії, бажано рослинної олії.

Зокрема, можна використовувати вуглеводи, оскільки вуглеводи звичайно можна одержати в більших кількостях з біологічно поновлюваних джерел, наприклад сільсько-господарських продуктів, бажано, сільсько-господарських відходів. Переважно використовують вуглевод, обраний із групи, яка складається із глюкози, фруктози, сахарози, лактози, сахарози, крохмалю, целюлози й геміцелюлози. Найкращими є глюкоза, олігосахариди, які містять глюкозу, і полісахариди, які містять глюкозу.

Крім того, як джерело вуглецю можуть бути використані амінокислоти або їх похідні, глутамат або його похідні й/або орнітин або його похідні.

Як джерело азоту можуть бути використані неорганічні азотовмісні сполуки, наприклад, аміак, солі амонію, сечовина, нітрати й нітриди або органічні азотовмісні сполуки, наприклад, амінокислоти або їх похідні, особливо бажано, глутамат або його похідні й/або орнітин або його похідні.

Коли тут посилаються на біокатализатор, це може відноситися до організму, який експресує щонайменше один фермент, необхідний для біокаталітичної функції, або це може відноситися щонайменше до одного ферменту, отриманого або виділеного із цього організму. Організм може мати еукаріотичне або прокаріотичне походження. Зокрема, організм може бути обраний з поміж тварин (у тому числі людини), рослин, бактерій, археобактерій, дріжджів і грибів.

В одному з варіантів здійснення біокатализатор утворюється у тваринах, зокрема, у їхніх частинах, наприклад, печінці, підшлунковій залозі, мозку, нирках, серці або інших органах. Тварини можуть, зокрема, бути обрані із групи ссавців, особливо бажано, можуть бути обрані із групи приматів (наприклад, *Homo sapiens*), *Leporidae*, *Muridae*, *Suidae* і *Bovidae*.

Придатними рослинами як джерелом біокатализаторів можуть бути рослини, обрані із групи *Asplenium*; *Cucurbitaceae*, зокрема, *Cucurbita*, наприклад, *Cucurbita moschata* (сквош), або *Cucumis*; *Mercurialis*, наприклад, *Mercurialis perennis*; *Hydnocarpus*; і *Ceratonia*.

Придатні бактерії як джерела біокатализаторів можуть, зокрема, бути обрані із групи *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Deinococcus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Geobacillus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Novosphingobium*, *Paracoccus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermus*, *Vibrio* і *Zymomonas*.

Придатні археобактерії як джерело біокатализаторів можуть, зокрема, бути обрані із групи *Aeropyrum*, *Archaeoglobus*, *Halobacterium*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*,

Methanocaldococcus, Methanococcus, Methanopyrus, Methanosarcina, Methanosphaera, Pyrobaculum і Thermoplasma.

Придатні гриби як джерело біокаталізаторів можуть, зокрема, бути обрані із групи *Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus* і *Trichoderma*.

5 Придатні дріжджі як джерело біокаталізаторів можуть, зокрема, бути обрані із групи *Candida*, *Cytophagia*, *Hansenula*, *Humicola*, *Kluuyveromyces*, *Mucor*, *Rhizoctonia*, *Saccharomyces* і *Yarrowia*.

Фахівцям у даній галузі техніки буде ясно, що можуть бути використані біокаталізатори, які зустрічаються в природі (дикого типу) або мутанти біокаталізаторів, які зустрічаються в природі, і які проявляють бажану активність в способі запропонованому даним винаходом. Властивості біокаталізатора, що зустрічається в природі, можуть бути поліпшені використанням біологічних способів, відомих фахівцям у даній галузі техніки, наприклад, молекулярною еволюцією або раціональним дизайном. Мутанти біокаталізаторів дикого типу можуть, наприклад, бути отримані модифікацією кодувальної ДНК в організмі, здатному діяти як біокаталізатор або здатному продукувати біокаталітичну сполуку (наприклад, фермент), використовуючи способи мутагенезу, відомі фахівцям у даній галузі техніки (випадковий мутагенез, сайт-спрямований мутагенез, спрямовану еволюцію, рекомбінацію генів тощо). Зокрема, ДНК може бути модифікована так, щоб вона кодувала фермент, який би відрізнявся від ферменту дикого типу щонайменше на одну амінокислоту, так, щоб вона кодувала фермент, який би відрізнявся від ферменту дикого типу наявністю одного або декількох заміщень амінокислот, делецій і/або інсерцій або так, щоб мутант поєднував у собі послідовності двох або декількох вихідних ферментів або впливав на експресію подібним чином модифікованої ДНК у придатній клітині (хазяїні). Останнє може бути досягнуте способами, відовими фахівцям у даній галузі техніки, наприклад, оптимізацією кодону або оптимізацією пар кодонів, наприклад, на основі способу, описаного в WO 2008/000632.

Мутантний біокаталізатор може мати поліпшені властивості, наприклад, у відношенні одного або декількох наступних аспектів: селективності щодо субстрату, активності, стабільності, стійкості до дії розчинників, рН профілю, температурного профілю, субстратного профілю, чутливості до інгібування, використання кофакторів і спорідненості до субстрату. Мутанти з поліпшеними властивостями можуть бути ідентифіковані застосуванням, наприклад, скринінгу з придатною високою пропускну здатністю або селективних способів, заснованих на способах, відомих фахівцям у даній галузі техніки.

Коли посилаються на біокаталізатор, зокрема, на фермент із конкретного джерела, рекомбінантні біокаталізатори з конкретного джерела, рекомбінантні біокаталізатори, зокрема, ферменти, які перебувають в організмі донора, але, які фактично утворюються в організмі хазяїна (генетично модифікованому), звичайно мають на увазі, що вони включені як біокаталізатори, зокрема, ферменти з першого організму.

Умови реакції для будь-якої біокаталітичної стадії в контексті даного винаходу можуть бути обрані залежно від відомих характеристик даного біокаталізатора, зокрема, ферменту, інформації, представленої тут і необов'язково від деяких звичайних експериментів.

Використані значення рН реакційного середовища, можуть бути обрані в широких межах, обумовлених активністю біокаталізатора за цих значень рН. Можуть бути використані лужні, нейтральні або кислі умови залежно від біокаталізатора та інших факторів. У тому випадку, якщо спосіб передбачає використання мікроорганізму, наприклад, для експресування ферменту, який є каталізатором у даному способі винаходу, рН вибирають таким чином, щоб цей мікроорганізм був здатний виконувати свою заплановану функцію або функції. Зокрема, рН може перебувати в межах чотирьох одиниць рН нижче нейтрального значення рН і двох одиниць рН вище нейтрального значення рН, тобто між рН 3 і рН 9 у випадку бажано водної системи при 25 °С. Систему вважають водною, якщо вода є єдиним розчинником або переважаючим розчинником (> 50 мас. %, зокрема > 90 мас. % розраховуючи на загальну масу рідини), у якому, наприклад, може бути розчинена невелика кількість спирту або іншого розчинника (< 50 мас. %, зокрема < 10 мас. % розраховуючи на загальну масу рідини) (наприклад, як джерело вуглецю) у такій концентрації, щоб присутній мікроорганізм зберігав свою активність. Зокрема при використанні дріжджів і/або грибів кращими є кислі умови, зокрема, рН може перебувати в діапазоні від рН 3 до рН 8 розраховуючи на бажано водне середовище при 25 °С. За бажання рН може бути змінений з використанням кислоти й/або основи або забуферений відповідною комбінацією кислоти й основи.

Умови інкубації можуть бути обрані в широких межах, обумовлених збереженням достатньої активності біокаталізатора й/або її зростанням. Вони включають аеробні, мікроаеробні умови, умови з обмеженим вмістом кисню й анаеробні умови.

60 Анаеробні умови тут визначаються як умови за відсутності кисню або умови, за яких кисень

практично не поглинається біокатализатором, зокрема, мікроорганізмом, і звичайно відповідають швидкості поглинання кисню, меншій, ніж 5 ммоль/лгодину, зокрема, швидкості поглинання кисню, меншій, ніж 2,5 ммоль/лгодину або меншій, ніж 1 ммоль/лгодину.

Аеробні умови є умовами, за яких наявна достатня кількість кисню розчиненого в середовищі для необмеженого росту, здатна підтримувати швидкість поглинання кисню із значенням щонайменше рівним 10 ммоль/лгодину, особливо краще більше ніж 20 ммоль/лгодину, ще краще, більше ніж 50 ммоль/лгодину, і найкраще, більше ніж 100 ммоль/лгодину.

Умови з обмеженим вмістом кисню визначають як умови, за яких поглинання кисню обмежується переносом кисню з газової фази в рідину. Нижню межу для умов з обмеженим вмістом кисню визначають за нижньою межею для анаеробних умов, тобто звичайно при швидкості, рівній щонайменше 1 ммоль/лгодину, і, зокрема, рівної щонайменше 2,5 ммоль/лгодину або щонайменше 5 ммоль/лгодину. Верхню межу для умов з обмеженим вмістом кисню визначають за нижньою межею для аеробних умов, тобто при швидкості, меншій, ніж 100 ммоль/лгодину, меншій, ніж 50 ммоль/лгодину, меншій, ніж 20 ммоль/лгодину або меншій, ніж 10 ммоль/лгодину.

Питання про те, чи є умови аеробними, анаеробними або умовами з обмеженим вмістом кисню, залежить від умов, за яких проводиться спосіб, зокрема, від кількості й складу вхідного потоку газу, реальних властивостей перемішування/перенесення мас, характерних для використаного устаткування, типу використаного мікроорганізму й щільності мікроорганізмів.

Застосована температура не є критичною доти, доки біокатализатор, зокрема фермент, має достатню активність. Звичайно, температура може бути рівною щонайменше 0 °C, зокрема, щонайменше 15 °C, особливо бажано щонайменше 20 °C. Потрібна максимальна температура залежить від біокатализатора. Звичайно, така максимальна температура відома в даній галузі техніки, наприклад, зазначена в специфікації у випадку комерційно доступного біокатализатора або може бути визначена за стандартною методикою, виходячи зі звичайних загальних знань і представленої тут інформації. Температура звичайно дорівнює 90 °C або менше, бажано, 70 °C або менше, зокрема, 50 °C або менше, особливо бажано 40 °C або менше.

Зокрема, якщо біокаталітична реакція відбувається поза організмом хазяїна, реакційне середовище, яке містить органічний розчинник, може бути використаним у високій концентрації (наприклад, у більшій, ніж 50 %, або в більшій, ніж 90 мас. %), у випадку, якщо використовують фермент, який зберігає достатню активність у такому середовищі.

У кращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до біокаталітичного способу, у результаті якого утворюється N-захищений попередник ДАБ, N⁵-захищений орнітин. Наприклад, одержання N⁵-ацетилорнітину може включати одну або кілька наступних реакцій, які каталізуються ферментами:

1. глутамат в N-ацетилглутамат
2. N-ацетилглутамат в N-ацетилглутамат-5-фосфат
3. N-ацетилглутамат-5-фосфат в N-ацетилглутаматнапівальдегід
4. N-ацетилглутаматнапівальдегід в N²-ацетилорнітин
5. N²-ацетилорнітин в N⁵-ацетилорнітин

Реакцію 1) можна каталізувати ферментом, обраним із групи ацилтрансфераз (ЕС 2.3.1), бажано, із групи амінокислотних N-ацетилтрансфераз (ЕС 2.3.1.1). Бажано, фермент повинен бути специфічним до ацетил-КоА як донора ацетильної групи й до глутамату як акцептора ацетильної групи. Амінокислотна N-ацетилтрансфераза може бути отримана із прокаріот або еукаріот. Типові білки, які можуть каталізувати реакцію 1) наведено в таблиці 1 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Реакцію 2) можна каталізувати ферментом, обраним із групи ацетилглутаматкіназ (ЕС 2.7.2.8). Фермент може використовувати АТФ як кофактор. Ацетилглутаматкіназа може бути отриманою із прокаріот або еукаріот. Типові білки, які можуть каталізувати реакцію 2) наведено в таблиці 1 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Реакцію 3) можна каталізувати ферментом, обраним із групи оксидоредуктаз (ЕС 1.2.1), бажано із групи N-ацетил-гамма-глутамілфосфатредуктаз (ЕС 1.2.1.38). Цей фермент може використовувати NADH або NADPH як кофактор. N-ацетил-гамма-глутамілфосфатредуктаза може бути отриманою із прокаріот або еукаріот. Типові білки, які можуть каталізувати реакцію 3) наведено в таблиці 1 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Реакцію 4) можна каталізувати ферментом, обраним із групи трансаміназ (ЕС 2.6.1), бажано, із групи ацетилорнітинтрансаміназ (ЕС 2.6.1.11). Цей фермент може використовувати глутамат

як донор аміногрупи. Ацетилорнітинтрансфераза може бути отримана із прокаріот або еукаріот. Типові білки, які можуть каталізувати реакцію 4) наведено в таблиці 1 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Реакцію 5) можна каталізувати N-ацилтрансферазою, наприклад, глутамат-N-ацетилтрансферазою (EC 2.3.1.35).

Глутамат може бути отриманий з придатного джерела вуглецю в результаті реакцій біосинтезу глутамату, добре відомих у даній галузі техніки. Бажано, використовують мікроорганізми, які акумулюють велику кількість глутамінової кислоти, наприклад, *Corynebacterium glutamicum*. У даній галузі техніки добре відомі способи одержання глутамінової кислоти, наприклад, генетичною інженерією (Kimura E., Adv Biochem Eng Biotechnol. 2003; 79: 37-57).

Альтернативно, одержання N⁵-ацетилорнітину може містити одну або кілька наступних реакцій, каталізованих ферментами:

- 6) глутамат в N-ацетилглутамат
- 7) N-ацетилглутамат плюс орнітин в N²-ацетилорнітин
- 8) N²-ацетилорнітин в N⁵-ацетилорнітин

Таблиця 1

Ферменти для реакційних стадій 1-8

Реакційна стадія	Номер доступу в базі даних Uniprot	Фермент	Мікроорганізм
1/6	P0A6C5	Амінокислотна ацетилтрансфераза	<i>Escherichia coli</i>
1/6	P40360	Амінокислотна ацетилтрансфераза, мітохондріальна	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	Q01217	Білок ARG5,6, мітохондріальний	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2	P0A6C8	Ацетилглутаматкіназа	<i>Escherichia coli</i>
3	Q01217	Білок ARG5,6, мітохондріальний	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3	Q8ZKL8	N-ацетил гамма-глутамілфосфат редуктаза	<i>Salmonella typhimurium</i>
4	P18335	Ацетилорнітин/сукцинілдіамінопімелатамінотрансфераза	<i>Escherichia coli</i>
4	P18544	Ацетилорнітинумінотрансфераза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5/7/8	Q04728	Біфункціональний білок ARG7, який бере участь у біосинтезі аргініну, мітохондріальний	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5/7/8	Q9HW04	Глутамат-N-ацетилтрансфераза	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
5/7/8	Q59280	Глутамат-N-ацетилтрансфераза	<i>Corynebacterium glutamicum</i>

Реакція 6) ідентична до реакції 1) і її можна каталізувати тим же самим типом ферментів.

Реакцію 7) можна каталізувати ферментом, обраним із групи ацилтрансфераз (EC 2.3.1), бажано, глутамат-N-ацетилтрансфераз (EC 2.3.1.35). Бажано, фермент використовує орнітин як акцептор ацетильної групи, завдяки чому утворюється глутамат і N-ацетилорнітин як продукт реакції. Глутамат-N-ацетилтрансферази може проявляти гідролітичну активність у відношенні N-ацетилглутамату, утворюючи як продукти гідролізу глутамат і ацетат. Бажано, використаний фермент не проявляє помітної гідролітичної активності; альтернативно фермент дикого типу може бути модифікований так, що його гідролітична активність буде суттєво нижчою в порівнянні з ферментом дикого типу. Глутамат-N-ацетилтрансфераза може бути отриманою із прокаріот або еукаріот. Типові білки, які можуть каталізувати реакцію 7) наведено в таблиці 1 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Реакція 8) ідентична до реакції 5) і її можна каталізувати тим же самим ферментом.

У додатковому кращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до біокаталітичного способу, у результаті якого N-захищений ДАБ утворюється з N⁵-захищеного орнітину. Звичайно,

придатна декарбоксилаза проявляє декарбоксилазну активність у відношенні N⁵-захищеного орнітину й здатна каталізувати перетворення N⁵-захищеного орнітину на N-захищений ДАБ.

Фермент, здатний декарбоксилувати N⁵-захищений орнітин, може, зокрема, бути обраний із групи декарбоксилаз (Е.С. 4.1.1), бажано із групи орнітиндекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.17),
 5 діамінопімелатдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.20), декарбоксилаз розгалуженоланцюгових альфа-кетокислот (Е.С. 4.1.1.72), декарбоксилаз альфа-кетозовалерату, декарбоксилаз альфа-кетоглутарату (Е.С. 4.1.1.71).

Одна або декілька придатних декарбоксилаз може бути обрана із групи оксалатдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.2), ацетоацетатдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.4),
 10 валіндекарбоксилаз/лейциндекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.14), аспартат-1-декарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.11), 3-гідроксиглутаматдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.16), лізиндекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.18), аргініндекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.19), 2-оксиглутаратдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.71) і діамінобутиратдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.86).

Декарбоксилаза може, зокрема, бути декарбоксилазою із організму, обраного із групи
 15 гарбузових; огірків; дріжджів; грибів, наприклад, *Candida flareri*, *Hansenula* sp., *Kluyveromyces marxianus*, *Neurospora crassa*, *Rhizopus javanicus*, і *Saccharomyces cerevisiae*; ссавців, зокрема, з мозку ссавців; і бактерій, наприклад, *Bacillus cadaveris*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas* sp. і *Zymomonas mobilis*.

У додатковому кращому варіанті здійснення даний винахід відноситься до біокаталітичного
 20 способу, у результаті якого N-захищений ДАБ утворюється з N-захищеного 4-амінобутиральдегіду. Наприклад, одержання N-ацетилДАБ може передбачати одну або кілька наступних реакцій, які каталізуються ферментами:

9. глутамат в 4-амінобутират

10. 4-амінобутират в N-ацетил-4-амінобутират

25 11. N-ацетил-4-амінобутират в N-ацетил-4-амінобутиральдегід

12. N-ацетил-4-амінобутиральдегід в N-ацетилДАБ

Реакцію 9) можна каталізувати ферментом, обраним із групи декарбоксилаз (Е.С. 4.1.1), бажано із групи глутаматдекарбоксилаз (Е.С. 4.1.1.15). Глутаматдекарбоксилаза може бути
 отримана із прокаріот або еукаріот або архебактерій.

Реакцію 10) можна каталізувати ферментом, обраним із групи ацилтрансфераз (Е.С. 2.3.1), бажано, із групи амінокислотних N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.1), гліцин-N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.13), аспартат-N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.17), глутамат-N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.35), D-амінокислотних N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.36) і діаміно-N-ацетилтрансфераз (Е.С. 2.3.1.57). Бажано, фермент, який використовується є селективним щодо субстрату, 4-амінобутирату. Фермент дикого типу може мати низьку активність/селективність щодо 4-амінобутирату як акцептора аміногрупи. Такі ферменти дикого типу можуть бути модифіковані так, що їх активність/селективність щодо 4-амінобутирату стає значно вищою в порівнянні з ферментами дикого типу. Застосований фермент може використовувати ацетил-KoA як донор ацетильної групи. Альтернативно фермент може також використовувати N-ацетильовану амінокислоту як донор ацетильної групи, наприклад, N-ацетилглутамат. Фермент може бути отриманий із прокаріот або еукаріот або архебактерій.

Альтернативно, N-ацетил-4-амінобутират може бути перетворений на N-ацетил-4-амінобутиральдегід у результаті наступних реакцій, які каталізуються ферментами:

11a. N-ацетил-4-амінобутират в N-ацетил-4-амінобутират фосфат

45 11b. N-ацетил-4-амінобутират фосфат в N-ацетил-4-амінобутиральдегід

Реакцію 11a) можна каталізувати ферментом, обраним із групи фосфотрансфераз (Е.С. 2.7.2), бажано із групи ацетаткіназ (Е.С. 2.7.2.1), аспартаткіназ (Е.С. 2.7.2.4), бутираткіназ (Е.С. 2.7.2.7), ацетилглутаматкіназ (2.7.2.8) і глутамат-5-кіназ (2.7.2.11).

Реакцію 11b) можна каталізувати ферментом, обраним із групи оксидоредуктаз (Е.С. 1.2.1), бажано із групи N-ацетил-гамма-глутамілфосфатредуктаз (Е.С. 1.2.1.38).

Типові білки, які можуть каталізувати реакційну стадію 9) через реакцію 11) наведено в таблиці 2 разом з їхнім номером доступу в базі даних Uniprot і (мікро)організмом, який є їх джерелом.

Таблиця 2

Ферменти для реакційних стадій 9-11(a/b)

Реакційна стадія	Номер доступу в базі даних Uniprot	Фермент	Мікроорганізм
9	P69908	Глутаматдекарбоксилаза	E. coli
9	Q04792	Глутаматдекарбоксилаза	S. cerevisiae
10	P0A951	Діаміноацетилтрансфераза	E. coli
10	P21673	Діаміноацетилтрансфераза	H. sapiens
10	P41929	Лізінацетилтрансфераза	Yarrowia lipolytica
11	P77674	гамма-амінобутиральдегіддегідрогеназа	E. coli
11a	P0A6C8	Ацетилглутаматкіназа	E. coli
11b	P11446	N-ацетил-гамма-глутамілфосфатредуктаза	E. coli
11b	Q01217	N-ацетил-гамма-глутамілфосфатредуктаза	S. cerevisiae

Реакція 12) відноситься до біокаталітичного способу, у результаті якого N-захищений ДАБ утворюється з N-захищеного 4-амінобутиральдегіду.

Звичайно відповідна амінотрансфераза проявляє амінотрансферазну активність у відношенні N-захищеного 4-амінобутиральдегіду, проявляючи здатність каталізувати перетворення N-захищеного 4-амінобутиральдегіду на N-захищений ДАБ.

Амінотрансфераза може, зокрема, бути обраною із групи аспаратамінотрансфераз, омега-амінотрансферази (EC 2.6.1), амінотрансферази класу III (EC 2.6.1), 4-амінобутиратамінотрансфераз (EC 2.6.1.19), L-лізин-6-амінотрансферази (EC 2.6.1.36), 5-аміновалератамінотрансфераз (EC 2.6.1.48), лізин:піруват-6-амінотрансфераз (EC 2.6.1.71) і путресцинамінотрансферази (EC 2.6.1.82).

В одному з варіантів здійснення амінотрансфераза може бути обраною із групи аланінамінотрансфераз (EC 2.6.1.2), лейцинамінотрансфераз (EC 2.6.1.6), амінотрансфераз аланін-оксикислот (EC 2.6.1.12), β-аланінпіруватамінотрансфераз (EC 2.6.1.18), (S)-3-аміно-2-метилпропіонатних амінотрансфераз (EC 2.6.1.22), L, L-діамінопімелатних амінотрансфераз (EC 2.6.1.83).

Амінотрансфераза може зокрема бути обраною з поміж амінотрансфераз ссавців, рослин або мікроорганізмів. В кращому випадку, амінотрансфераза може бути виділена з *Asplenium*, краще, *Asplenium unilaterale* або *Asplenium septentrionale*, *Bacillus*, зокрема, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cereus* і *Bacillus subtilis*, *Ceratonia*, краще, *Ceratonia siliqua*, *Enterobacter*, *Erwinia*, краще, *E. carotovora*, *Escherichia*, краще *E. coli*, *Legionella*, *Mercurialis*, зокрема, *Mercurialis perennis*, краще, зі пропостків *Mercurialis perennis*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Pseudomonas*, зокрема, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter*, зокрема, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, краще, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella*, краще, *Sh. boydii*, *Sh. flexneri*, *S. sonnei*, *Staphylococcus*, зокрема, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio*, зокрема, *Vibrio fluvialis*, або дріжджів, зокрема, *Saccharomyces cerevisiae*.

У випадку якщо фермент виділяють із ссавців, він може, зокрема, бути виділений із нирок ссавців, печінки ссавців, із серця ссавців або мозку ссавців. Наприклад, придатний фермент може бути обраний із групи, яка включає 4-амінобутиратамінотрансферазу з печінки ссавців, зокрема, 4-амінобутиратамінотрансферазу з печінки свині; 4-амінобутиратамінотрансферазу з мозку ссавців, зокрема, 4-амінобутиратамінотрансферазу з мозку людини, свині або пацюка; омега-амінотрансферазу *Vibrio fluvialis*, 4-амінобутиратамінотрансферазу з *E. coli* і 5-аміновалератамінотрансферазу з *Clostridium*, зокрема, з *Clostridium aminovalericum*.

Зокрема, амінодонор може бути обраним із групи, яка включає аміак, амонійні іони, аміни й амінокислоти. Відповідні аміни є первинними амінами й вторинними амінами. Амінокислота може мати D- або L-конфігурацію. Прикладами амінодонорів є аланін, глутамат, ізопропіламін, 2-амінобутан, 2-аміногептан, фенілметанамін, 1-феніл-1-аміноетан, глутамін, тирозин, феніلالанін, аспартат, альфа-аміноізобутират, бета-аланін, 4-амінобутират і альфа-аміноадипат.

У додатковому кращому варіанті здійснення спосіб одержання N-захищеного ДАБ включає

біокаталітичну реакцію, яка протікає в присутності ферменту, здатного каталізувати реакцію відновного амінування в присутності джерела амонію, обраного із групи оксидоредуктаз, що діють на CH-NH_2 групу донорів (ЕС 1.4), зокрема, із групи амінокислотних дегідрогеназ (ЕС 1.4.1). Звичайно, придатна амінокислотна дегідрогеназа проявляє 6-дегідрогеназну активність у відношенні 6-амінокапронової кислоти, каталізуючи перетворення N-захищеного 4-амінобутиральдегіду в N-захищений ДАБ. Зокрема, придатна амінокислотна дегідрогеназа може бути обраною із групи діамінопімелатних дегідрогеназ (ЕС 1.4.1.16), лізин-6-дегідрогеназ (ЕС 1.4.1.18), глутаматдегідрогеназ (ЕС 1.4.1.3; ЕС 1.4.1.4) і лейциндегідрогеназ (ЕС 1.4.1.9).

В одному з варіантів здійснення амінокислотна дегідрогеназа може бути обраною з поміж амінокислотних дегідрогеназ, класифікованих як глутаматдегідрогенази, які діють разом з NAD або NADP як акцепторами (ЕС 1.4.1.3), глутаматдегідрогеназ, які діють разом з NADP як акцептором (ЕС 1.4.1.4), лейциндегідрогеназ (ЕС 1.4.1.9), діамінопімелатних дегідрогеназ (ЕС 1.4.1.16) і лізин-6-дегідрогеназ (ЕС 1.4.1.18).

Амінокислотна дегідрогеназа може зокрема бути отриманою з організмів, обраних із групи *Corynebacterium*, зокрема, *Corynebacterium glutamicum*; *Proteus*, зокрема, *Proteus vulgaris*; *Agrobacterium*, зокрема, *Agrobacterium tumefaciens*; *Geobacillus*, зокрема, *Geobacillus stearothermophilus*; *Acinetobacter*, зокрема, *Acinetobacter* sp. ADP1; *Ralstonia*, зокрема, *Ralstonia solanacearum*; *Salmonella*, зокрема, *Salmonella typhimurium*; *Saccharomyces*, зокрема, *Saccharomyces cerevisiae*; *Brevibacterium*, зокрема, *Brevibacterium flavum*; і *Bacillus*, зокрема, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus* або *Bacillus subtilis*. Наприклад, придатна амінокислотна дегідрогеназа може бути виділена з діамінопімелатних дегідрогеназ із *Bacillus*, зокрема, *Bacillus sphaericus*; діамінопімелатних дегідрогеназ із *Brevibacterium* sp.; діамінопімелатних дегідрогеназ із *Corynebacterium*, зокрема, діамінопімелатних дегідрогеназ із *Corynebacterium glutamicum*; діамінопімелатних дегідрогеназ із *Proteus*, зокрема, діамінопімелатних дегідрогеназ із *Proteus vulgaris*; лізин-6-дегідрогеназ із *Agrobacterium*, зокрема, *Agrobacterium tumefaciens*, лізин-6-дегідрогеназ із *Geobacillus*, зокрема, з *Geobacillus stearothermophilus*; глутаматдегідрогеназ, які діють із NADH або NADPH як кофакторами (ЕС 1.4.1.3) з *Acinetobacter*, зокрема, глутаматдегідрогеназ із *Acinetobacter* sp. ADP1; глутаматдегідрогеназ (ЕС 1.4.1.3) з *Ralstonia*, зокрема, глутаматдегідрогеназ із *Ralstonia solanacearum*; глутаматдегідрогеназ, які діють разом з NADPH як кофактором (ЕС 1.4.1.4) з *Salmonella*, зокрема, глутаматдегідрогеназ із *Salmonella typhimurium*; глутаматдегідрогеназ (ЕС 1.4.1.4) з *Saccharomyces*, зокрема, глутаматдегідрогеназ із *Saccharomyces cerevisiae*; глутаматдегідрогеназ (ЕС 1.4.1.4) з *Brevibacterium*, зокрема, глутаматдегідрогеназ із *Brevibacterium flavum* і лейциндегідрогеназ із *Bacillus*, зокрема, лейциндегідрогеназ із *Bacillus cereus* або *Bacillus subtilis*.

Біокаталітичний фермент може бути використаний у будь-якій формі. Наприклад, біокаталітичний фермент може бути використаний, наприклад, у формі дисперсії, емульсії, розчину або в іммобілізованій формі (наприклад, нанесеним на основу, наприклад, дисперсний або монолітний матеріал) – у вигляді неочищеного ферменту, у вигляді комерційно доступного ферменту, у вигляді ферменту, додатково очищеного з комерційно доступного препарату, у вигляді ферменту, отриманого з його джерела комбінацією відомих способів очищення, у складі цілих клітин (необов'язково пермеабілізованих і/або іммобілізованих), які природнім шляхом або завдяки генетичній модифікації мають гідролітичну активність або в лізатах клітин, які проявляють таку активність.

Біокаталітичний фермент може бути отриманий або виділений з будь-якого організму, зокрема, із тварин, рослин, бактерій, цвілевих грибів, дріжджів або грибів.

Навіть рядовому фахівцеві в даній галузі техніки буде зрозуміло, що мутанти ферментів, які зустрічаються в природі (дикого типу) з біокаталітичною активністю можуть знайти застосування в способі запропонованому даним винаходом. Наприклад, мутанти ферментів дикого типу можуть бути отримані модифікацією ДНК, яка кодує ферменти дикого типу, з використанням способів мутагенезу, відомих фахівцям у даній галузі техніки (випадковий мутагенез, сайт-спрямований мутагенез, спрямована еволюція, перетасування генів тощо), так, щоб ДНК кодувала фермент, який відрізняється щонайменше однією амінокислотою від ферменту дикого типу або так, щоб вона кодувала фермент, який був би коротшим в порівнянні з ферментом дикого типу й здійснювала експресію модифікованої в такий спосіб ДНК у придатній клітині (хазяїні). Мутанти біокаталітичного ферменту можуть мати поліпшені властивості, наприклад, у відношенні одного або декількох аспектів: селективності щодо субстрату, активності, стабільності, стійкості до дії розчинників, рН профілю, температурного профілю, субстратному профілю.

Коли посилаються на фермент із конкретного джерела, рекомбінантні ферменти, отримані з

першого організму, але, які фактично утворюються в другому (генетично модифікованому) організмі, як правило мають на увазі, що вони включаються як ферменти із цього першого організму.

Клітина, зокрема, рекомбінантна клітина, яка містить один або кілька ферментів для каталізу на одній або декількох реакційних стадіях у способі даного винаходу, може бути сконструйована із використанням способів молекулярної біології, які є відомими в даній галузі як такі (Maniatis et al. 1982 "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller 1972 "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Sambrook and Russell 2001 "Molecular cloning: a laboratory manual" (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York 1987). Наприклад, якщо один або декілька біокаталізаторів утворюються в рекомбінантній клітині (яка може бути гетерологічною системою), такі способи можуть бути використані для створення вектора (наприклад, рекомбінантного вектора), який містить один або кілька генів, які кодують один або декілька зазначених біокаталізаторів. Може бути використано один або кілька векторів, кожний з яких містить один або кілька таких генів. Такий вектор може містити один або кілька регуляторних елементів, наприклад, один або кілька промоторів, які можуть бути функціонально пов'язаними з геном, який кодує біокаталізатор.

Так, термін "функціонально зв'язаний", як він використовується тут, відноситься до зв'язку полінуклеотидних елементів (або кодуючих послідовностей або послідовностей нуклеїнових кислот) у функціональному взаємозв'язку. Послідовність нуклеїнових кислот є "функціонально зв'язаною", якщо вона перебуває у функціональному взаємозв'язку з іншою послідовністю нуклеїнових кислот. Наприклад, промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо це впливає на транскрипцію кодуючої послідовності.

Так, термін "промотор", як він використовується тут, відноситься до фрагмента нуклеїнової кислоти, який виконує функцію контролю над транскрипцією одного або декількох генів, розташованих вище ділянки ініціації транскрипції гена за ходом транскрипції, і структурно ідентифікується наявністю з'єднувального сайту для ДНК-залежної РНК полімерази, сайтів ініціації транскрипції й інших послідовностей ДНК, що включають, але не обмежуються сайтами зв'язування транскрипційних факторів, сайтами зв'язування репресорних і активаторних білків і будь-якими іншими послідовностями нуклеотидів, відомими фахівцям у даній галузі техніки, для прямого або непрямого впливу на регуляцію ступеня транскрипції з даного промотору. "Конститутивний" промотор є промотором, активним за більшості умов, пов'язаних з навколишнім середовищем і з індивідуальним розвитком організму. "Індукований" промотор є промотором, активним за певної регуляції пов'язаної з навколишнім середовищем або стадією розвитку. Термін "гомологічний", коли його використовують для позначення зв'язку між даною (рекомбінантною) нуклеїновою кислотою або поліпептидною молекулою й даним організмом хазяїна або клітиною хазяїна, позначає, що в природі нуклеїнова кислота або поліпептидна молекула утворюються в клітині хазяїна або в організмі хазяїна того ж виду, бажано, тієї ж породи або штаму.

Промотор, який може бути використаний для досягнення експресії послідовностей нуклеїнової кислоти, які кодують фермент, для застосування в даному способі винаходу, зокрема, амінотрансферази, амінокислотної дегідрогенази або декарбоксилази, наприклад, описаних тут вище, може бути нативним відносно послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує експресований фермент, або може бути гетерологічним у відношенні до послідовності нуклеїнової кислоти (кодуючої послідовності), з якою вона функціонально зв'язана. Бажано, промотор є гомологічним, тобто ендегенним щодо клітини хазяїна.

Якщо використовують гетерологічний промотор (у відношенні до послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує фермент, який нас цікавить), то гетерологічний промотор бажано здатний продукувати більш високий стаціонарний рівень транскрипта, що містить послідовність, яка кодує (або яка здатна продукувати більшу кількість молекул транскрипта, тобто молекул мРНК за одиницю часу) у порівнянні із промотором, який є нативним щодо кодуючої послідовності. У цьому контексті придатні промотори включають як конститутивний, так і індукований природні промотори, а також сконструйовані промотори, які добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

"Сильний конститутивний промотор" є промотором, який сприяє ініціюванню мРНК з високою частотою в порівнянні з нативною клітиною хазяїном. Приклади таких сильних конститутивних промоторів у грамполозитивних мікроорганізмах включають SP01-26, SP01-15, veg, рус (промотор піруваткарбоксилази) і amуЕ.

Приклади індукованих промоторів у грамполозитивних мікроорганізмах включає індукований IPTG Pspac промотор, індукований ксилосою PхylA промотор.

Приклади конститутивних та індукованих промоторів у грампозитивних мікроорганізмах включають, але не обмежені *tac*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*, *laciq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara* (P_{BAD}), $SP6$, λ - P_R , і λ - P_L .

Промотори для клітин (міцеліальних) грибів відомі в даній галузі техніки й можуть бути, наприклад, *gpdA* промоторами глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, промоторами протеази, наприклад, *perA*, *perB*, *perC*, *gla* промоторами глюкоамілази, амілази *amyA*, *amyB* промоторами, промоторами каталази *catR* або *catA*, промотором глюкоз оксидази *goxC*, промотором бета-галактозидази *lacA*, *aglA* промотором альфа-глюкозидази, *tefA* промотором фактора елонгації трансляції, промоторами ксиланази, наприклад, *xlnA*, *xlnB*, *xlnC*, *xlnD*, промоторами целюлази, наприклад, *eglA*, *eglB*, *cbhA*, промоторами регуляторів транскрипції, наприклад, *areA*, *creA*, *xlnR*, *racC*, *prtT* або іншими промоторами й можуть бути знайдені серед інших на вебсайті NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>).

Термін "гетерологічний", який використовується у відношенні нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) або білка відноситься до нуклеїнової кислоти або білка, які не зустрічаються в природі як частини організму, клітини, генома або послідовності ДНК або РНК, у якій вони перебувають або які знаходяться в клітині або локалізації або локусах у геномі або послідовності ДНК або РНК, яка відрізняється від тієї, яка існує в природі. Гетерологічні нуклеїнові кислоти або білки не є ендегенними щодо клітини, до якої їх введено, але отримані з іншої клітини, або синтетичним або рекомбінантним шляхом. Звичайно, хоча й необов'язково, такі нуклеїнові кислоти кодують білки, які звичайно не продукуються клітиною, у якій ДНК транскрибується або експресується. Аналогічно екзогенна РНК кодує білки, які звичайно не експресуються в клітині, у якій знаходиться екзогенна РНК. Гетерологічні нуклеїнові кислоти або білки можна також розглядати як чужорідні нуклеїнові кислоти або білки. Будь-яка нуклеїнова кислота або білок, які фахівець у даній галузі техніки може розглядати як гетерологічні або чужорідні щодо клітини, у якій вони експресуються, тут описується терміном гетерологічна нуклеїнова кислота або білок.

Спосіб запропонований даним винаходом може бути здійснений в організмі хазяїні, який може бути новим.

Відповідно, даний винахід також відноситься до клітини-хазяїна, яка містить один або кілька ферментів, здатних каталізувати щонайменше одну реакційну стадію в способі запропонованому даним винаходом.

У конкретному варіанті здійснення клітина-хазяїн відповідно до даного винаходу є рекомбінантною клітиною, яка містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує фермент, здатний каталізувати реакцію трансамінування або відновного амінування з утворенням N^2 -захищеного орнітину з N -захищеного глутаматнапівальдегіду або кодувати фермент, здатний каталізувати N -ацилтрансферазну реакцію з утворенням N^5 -захищеного орнітину з N^2 -захищеного орнітину або кодувати фермент, здатний каталізувати амінотрансферазну реакцію з утворенням N -захищеного ДАБ з N -захищеного 4-амінобутиральдегіду. Зазначена послідовність може служити частиною вектора або може бути вбудована в хромосому ДНК.

Виділення N -захищеного попередника ДАБ

Перед перетворенням N -захищеного попередника на ДАБ, N -захищений попередник слід виділити з біокаталітичної реакційної суміші.

Виділення N -захищеного попередника з біокаталітичної реакційної суміші може бути проведене способами, відомими в даній галузі техніки, для виділення подібних хімічних сполук з біокаталітичної реакційної суміші. Зокрема, при використанні ферментативного способу одержання, наприклад, спосіб виділення може включати щонайменше одну стадію, обрану із групи, яка складається із клітинного поділу (фільтрації, мембранного поділу (MF), седиментації (як гравітаційної, так і центрифужної), кристалізації для видалення клітин. Для економічно прийняттого очищення може знадобитися додаткове концентрування й очищення N -захищеного попередника. Для додаткового концентрування можуть бути використані такі способи, як випаровування й мембранне розділення (RO, NF і UF). Також може бути використаний такий спосіб, як (евтектичне) концентрування заморожуванням.

Може бути необхідним додаткове виділення або за допомогою іонообмінної хроматографії, або кристалізації/осадження.

Цей спосіб необов'язково призводить до повного очищення N -захищеного попередника, але N -захищений попередник повинен бути очищеним щонайменше настільки, щоб наступне перетворення N -захищеного попередника на ДАБ не було значно ускладнене через наявність домішок і побічних продуктів, що утворюються в біокаталітичній реакційній суміші. Необов'язково N -захищений попередник також може бути підданим концентруванню.

Більше того, N -захищений попередник може бути перенесений у середовище, яке оптимізоване для проведення щонайменше однієї наступної стадії.

Перетворення N-захищеного попередника ДАБ на ДАБ

Пряме або непряме перетворення N-захищеного попередника на ДАБ відповідно до даного винаходу може включати щонайменше одну біокаталітичну (зокрема, ферментативну) або хімічну стадію перетворення. Воно також може включати комбінацію біокаталітичної і хімічної

стадій перетворення.

Наприклад, перетворення біокаталітично отриманого N-захищеного ДАБ на незахищений ДАБ може бути проведене в результаті біокаталітичного або хімічного гідролітичного процесу. Для біокаталітичного процесу можуть бути використані відповідні гідролази. У кращому способі даного винаходу проводять біокаталіз деацильовання. Зокрема може бути використаний гідролітичний фермент, здатний каталізувати деацильовання N-Ас-ДАБ, найкраще здатний каталізувати деацильовання N-ацетилДАБ.

Коли N-ацетилДАБ перетворюється на ДАБ або хімічним, або біокаталітичним гідролізом, це звичайно призводить до утворення як ДАБ, так і ацетату. Після виділення ДАБ фракцію, яка містить ацетат, бажано використовують повторно в даному способі. У випадку проведення ферментативного способу ацетат може бути повторно використаний як джерело вуглецю для вирощування мікроорганізму, або, як джерело вуглецю для одержання N-захищеного ДАБ або сполуки, яка може бути перетвореною на N-захищений ДАБ з використанням ферментативного способу.

Термін "гідролітичний фермент" використовують тут у відношенні до ферментів із класифікаційної групи Е.С. 3. Бажано один або декілька використаних гідролітичних ферментів обрані із групи гідролаз складних ефірів карбонових кислот (Е.С. 3.1.1), гідролаз тіолових ефірів (Е.С. 3.1.2) і пептидаз (Е.С. 3.4).

Зокрема може бути використана пептидаза (Е.С. 3.4). Кращими пептидазами є пептидази, обрані із групи карбоксипептидаз серинового типу (Е.С. 3.4.16), металокарбоксипептидаз (Е.С. 3.4.17), карбоксипептидаз цистеїнового типу (Е.С. 3.4.18), серинових ендопептидаз (Е.С. 3.4.21), цистеїнових ендопептидаз (Е.С. 3.4.22), аспарагінових ендопептидаз (Е.С. 3.4.23) і металоендопептидаз (Е.С. 3.4.24), зокрема, серинових ендопептидаз (Е.С. 3.4.21). Зокрема гарні результати отримані із сериною ендопептидазою, бажано, субтилізином (Е.С. 3.4.21.62), наприклад, субтилізину Карлсберга.

Прикладами організмів, з яких можуть бути отримані гідролітичні ферменти, включають *Trichoderma* sp, наприклад, з *Trichoderma reesei*; *Rhizopus* sp., наприклад, з *Rhizopus oryzae*; *Bacillus* sp, наприклад, з *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus clausii*, *Bacillus lentus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus halodurans*; *Aspergillus* sp., наприклад, з *Aspergillus oryzae* або *Aspergillus niger*; *Streptomyces* sp., наприклад, з *caespitosus* *Streptomyces* або *Streptomyces griseus*; *Candida* sp.; із грибів; *Humicola* sp; *Rhizoctonia* sp.; *Cytophagia*; *Mucor* sp.; і тканин тварин, зокрема, з підшлункової залози, наприклад, зі свинячої підшлункової залози, бичачої підшлункової залози або овечої підшлункової залози.

Як було зазначено вище, кращим ферментом є субтилізін. У даній галузі відомі різні субтилізینی (дивися, наприклад, US 5,316,935 і цитовані в ньому посилання). Субтилізін А є комерційно доступним субтилізином з Novozymes. Особливо кращим є субтилізін Карлсберга. Було показано, що Alcalase® є особливо придатним для використання в способі запропонованому даним винаходом. Цей продукт наданий Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). Alcalase® є дешевою й доступною в промислових масштабах сумішшю протеолітичних ферментів, яка проводиться *Bacillus licheniformis* (яка містить як основний ферментативний компонент - субтилізін Карлсберга). Експерименти з очищенням субтилізином підтверджують, що субтилізін каталізує переетерифікацію, активацію й утворення пептидного зв'язку.

Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) пропонує озозим, лігуназу, Alcalase®, Alcalase-ultra® (зокрема, ефективну при лужних рН), дураміл, есперазу, канназу, савиназу, савиназу ультра, термаміл, термаміл ультра, новобат, поларзім, ньютразу, новолін, піразу, новокор (бактеріальні лужні протеази).

Протеїназа-К надана New England Biolabs, Ipswich (MA), USA).

Novo Nordisk Biochem North America Inc (Franklinton NC, USA) пропонує Протеазу *Bacillus species* (Esperase 6.0 T; Savinase 6.0 T), Протеазу *Bacillus subtilis* (Neutrase 1.5 MG), Протеазу *Bacillus licheniformis* (Alcalase 3.0 T).

Amano International Enzyme Co (Troy, Va, USA) пропонує Протеазу *Bacillus subtilis* (Proleather; Protease N) і Протеазу *Aspergillus oryzae* (Прозим 6).

Відповідними прикладами ферментів цього класу є, наприклад, ліпаза *Rhizopus japonicus*, ліпаза AP-6 *Aspergillus niger*, ліпаза QL *Alcaligenes* sp, протеаза B *Bacillus amyloliquefaciens* (SEQ ID NO 19), Делволаза *Bacillus licheniformis* (SEQ ID NO 20), *Rhizopus oryzae* ліпаза, еспераза, алькалаза, ацилаза *Aspergillus species*, Прозим, Протеаза М, Протеаза N. Гідролазу

бажано вибирають із групи гідролаз, активних у відношенні до складноефірних зв'язків (ліпази, естерази) (ЕС 3.1), пептидних гідролаз, активних у відношенні до пептидних зв'язків, (пептидаз, протеїназ) (ЕС 3.4) і гідролаз, активних у відношенні до C-N зв'язків, відмінних від пептидних зв'язків (ЕС 3.5).

5 Зокрема гідролази, активні у відношенні до C-N зв'язків, відмінних від пептидних зв'язків, можуть бути обрані із групи гідролаз ефірів карбонових кислот (ЕС 3.1.1) і амідаз, активних у відношенні до лінійних амідів (ЕС 3.5.1), особливо із групи аміноамідаз, більш бажано, із групи аміноамілаз із *Mycobacterium*, більш бажано, із групи аміноамідаз із *Mycobacterium neoaurum*.

10 Хімічний гідроліз N-захищеного ДАБ може включати спосіб, відомий у даній галузі, для проведення подібних реакцій. Відповідний спосіб передбачає деацилювання реагентом $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$, отриманим *in situ* титруванням розчину трифенілфосфату хлором. Цей спосіб широко описаний Saggiari et al. (*Organic Letters* (2004), 6 (22), pp. 3885-3888).

15 Перетворення N⁵-захищеного орнітину на незахищений ДАБ може відбуватися як правило, по-перше, шляхом декарбоксилювання N⁵-захищеного орнітину в захищений ДАБ і наступного гідролізу N-захищеного ДАБ з утворенням незахищеного ДАБ, як це було описано раніше.

Для специфічного декарбоксилювання N⁵-захищеного орнітину з утворенням N-захищеного ДАБ слід використовувати придатний біокаталізатор, наприклад, який проявляє ліазну активність. Відповідні ферменти з ліазною активністю відносяться до класу ЕС 4. Особливо бажано використовувати вуглець-вуглецеві ліази (ЕС 4.1), наприклад, карбоксилази (ЕС 4.1.1), 20 представлені орнітиндекарбоксилазою (SpeC) *Escherichia coli* (ЕС 4.1.1.17), декарбоксилазою розгалужених альфа-кетокислот (KdcA; SEQ ID 8) і декарбоксилазою альфа-кетоізовалерата (KivD; SEQ ID 10) *Lactococcus lactis* і лізиндекарбоксилазою (LysA; SEQ ID 12) *Escherichia coli*.

25 Альтернативно, перше згадане специфічне декарбоксилювання N⁵-захищеного орнітину може бути проведене хімічним перетворенням, відомим у даній галузі техніки для подібних хімічних сполук. Із цією метою відповідні реакції хімічного декарбоксилювання можуть бути проведені нагріванням сполуки у висококип'ячому розчиннику, наприклад, дифенілметані, необов'язково в присутності каталітичної кількості органічного пероксиду або можуть бути проведені нагріванням сполуки з одним або декількома еквівалентами кетону або альдегіду.

30 Наступний гідроліз N-захищеного ДАБ може бути проведений біокаталітичним або хімічним способом, як це описано вище для біокаталітично отриманого N-захищеного ДАБ.

Як альтернатива вищеописаного двухстадійного перетворення може бути використаний одностадійний спосіб одержання ДАБ з N⁵-захищеного орнітину. Цей спосіб може протікати або шляхом початкового деацилювання N⁵-захищеного орнітину й наступного декарбоксилювання, або шляхом початкового декарбоксилювання N⁵-захищеного орнітину й наступного деацилювання відповідно до способів, відомих в даній галузі техніки для подібних сполук. Декарбоксилювання може бути проведене подібно до того, як описано вище. Деацилювання 35 може бути проведене способом, описаним вище для N-захищеного ДАБ.

Перетворення N-захищеного 4-амінобутиральдегіду в незахищений ДАБ може відбуватися при специфічному заміщенні кисню альдегідної групи на аміногрупу, внаслідок чого 40 відбувається утворення N-захищеного ДАБ і при наступному знятті захисту з останнього. Для першого перетворення слід використовувати відповідний біокаталізатор, наприклад, фермент із трансферазною активністю (ЕС 2), як описано вище. Відповідні ферменти із трансферазною активністю для даної конкретної мети представлені трансферазами, які переносять азотовмісні групи (ЕС 2.6), особливо бажано, амінотрансферазами (трансаміази) (ЕС 2.6.1), ще більш бажано 4-амінобутиратамінотрансферазою з печінки ссавців, особливо бажано, 4-амінобутиратамінотрансферазою з мозку свині; 4-амінобутиратамінотрансферазою з мозку людини, свині або пацюка; омега-амінотрансферазою *Vibrio fluvialis*, 4-амінобутиратамінотрансферазою з *E. coli* і 5-аміновалератамінотрансферазою з *Clostridium*, особливо бажано, з *Clostridium* 50 *aminovalepticum*, орнітинтрансаміазою (ЕС 2.6.1.11), L-аланін-3-оксипропіонатамінотрансферазою (ЕС 2.6.2.18) і путресцинамінотрансферазою, наприклад, *Shigella* або *Salmonella*. Особливо придатними амінотрансферазами є, наприклад, омега-амінотрансфераза *Vibrio fluvialis* (SEQ ID 5) або амінотрансферази *Pseudomonas aeruginosa* (gi9946143 (SEQ ID 1) або gi9951072 (SEQ ID 3)), *Paracoccus denitrificans* (ZP00628577; SEQ ID 14), *Bacillus weihenstephanensis* (ZP01186960 (SEQ ID 16)).

55 Інші придатні біокаталізатори для перетворення N-захищеного 4-амінобутиральдегіду на незахищений ДАБ є ферментами, оксидоредуктазами (ЕС 1), особливо бажано, оксидоредуктазами, які діють на CH-NH₂ групи (ЕС 1.4) або CH-NH групи (ЕС 1.5) донорів, і особливо бажано, ферменти класів ЕС 1.4.1, 1.4.3 (бажано 1.4.3.4) і 1.4.99.

Альтернативно, перше перетворення N-захищеного 4-амінобутиральдегіду може бути проведене хімічною конверсією, відомою в даній галузі техніки, для подібних хімічних речовин. Придатні для цих цілей хімічні реакції можуть бути проведені відновним амінуванням N-захищеного 4-амінобутиральдегіду згідно зі способами, відомими в даній галузі техніки, для подібних сполук (дивися, наприклад, DE 4322065). Подібним способом є, наприклад, реакція з аміаком і воднем над гетерогенним каталізатором (наприклад, RaNi , Ni/SiO_2 і/або Al_2O_3 , Ru/C , Rh/C) або гомогенним каталізатором (наприклад, гомогенним каталізатором Rh).

Наступний гідроліз N-захищеного ДАБ може бути проведений біокаталітичним або хімічним способом, як було описано вище для біокаталітично отриманого N-захищеного ДАБ.

Опис фігур

Фіг. 1. ТСХ зразка в кінцевий момент часу біотрансформації N-Ас-орнітину в N-Ас-ДАБ. 1. Глутамат DC; 2) Аспартат DC; 3) LysA; 4) KdcA; 5) KivD; 6) Kgd; 7) Лізин DC; 8) ODC LJ110; 9) ODC DH5 α ; 10) Контроль без ферменту; 11) Контроль без хімічної сполуки; 12) Зразок порівняння N-Ас-орнітину; 13) Зразок порівняння N-Ас-ДАБ; 14) Зразок порівняння N-Ас-орнітину & N-Ас-ДАБ.

Приклади

Загальні способи

Молекулярні й генетичні методики

Стандартні генетичні й молекулярнобіологічні методики зазвичай відомі в даній галузі техніки й описані раніше (Maniatis et al. 1982 "Molecular cloning: a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Miller 1972 "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; Sambrook and Russell 2001 "Molecular cloning: a laboratory manual" (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; F. Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York 1987).

Плазмиди й Штами

pBAD /Myc-His C отриманий від Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Плазмиду pBAD /Myc-His-dest сконструйовано, як описано в WO2005/068643, використовують для експресії білка. E. coli TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) використовують для всіх процедур клонування й для експресії всіх цільових генів.

Середовище

LB середовище (10 г/л триптон, 5 г/л екстракту дріжджів, 5 г/л NaCl) використовують для вирощування E. coli. Антибіотики (50 мкг/мл карбеніциліну) додають для збереження плазмід. Для індукції експресії гена під контролем промотору P_{BAD} у похідних плазмиди pBAD /Myc-His-DEST плазмід, додають L-арабінозу до кінцевої концентрації, рівної 0,2 % (маса/об'єм).

Одержання аміноамідази M. neoaurum

Аміноамідаза була отримана в результаті вирощування штаму ATCC 25795 Mycobacterium neoaurum за наступних умов. Один літр середовища Mycomed, який містить 4,8 г/л нітрilotриоцтової кислоти (NTA), 4 г/л сечовини, 6 г/л глюкози, 20 г/л дріжджового вуглецевого матеріалу (YCB від Difco), 1,55 г/л K_2HPO_4 і 0,85 г/л NaH_2PO_4 . pH води доводять до 7 і засівають вихідною культурою штаму ATCC 2579 Mycobacterium neoaurum, вирощеною в середовищі гліцерину. Попередню культуру струшують на шейкері New Brunswick Scientific G53 (150 об./хв., амплітуда 4 см) при 37 °C протягом 168 годин. Коли оптична щільність ($D_{620 \text{ nm}}$) досягає значення 3.45, використовують 500 мл попередньої культури для засівання 9 л середовища Mycomed. Експресію амідози індують NTA, яка присутня у середовищі Mycomed. Вирощувану культуру перемішують при 375-750 об./хв. і швидкості аерації в діапазоні 0,5-2 л/хв. pH підтримують постійним при значенні, рівному 7, додаванням H_3PO_4 і NaOH. Температура культивування дорівнює 37 °C. Після 44 годин культивування в культуру додають 10 г/л YCB. Після 68 годин культивування в культуру додають 10 г/л глюкози. Через 94 годин культивування культуру збирають центрифугуванням при 12,000 g протягом 10 хвилин. Осад клітин промивають в 20 мМ HEPES/NaOH буфера, pH 7 і далі ліофілізують для зберігання.

Ідентифікація плазмід

Плазмиди, які несуть різні гени, ідентифікують генетичними, біохімічними й/або фенотиповими способами, які звичайно відомі в даній галузі техніки, наприклад, стійкістю трансформантів до дії антибіотиків, діагностичному PCR аналізу трансформованої клітини або очищеної плазмідної ДНК, рестрикційному аналізу очищеної плазмідної ДНК або аналізом ДНК послідовності.

Клонування цільових генів

Дизайн конструкцій для експресії

Сайти attb додають до сайту зв'язування рибосом і ініціюючого кодону й після термінуючого трансляцію кодону для полегшення клонування з використанням технології Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Синтез гена й конструювання плазмід

Синтетичні гени були отримані від DNA2.0 і оптимізовані за кодами для експресії в *E. coli* відповідно до стандартних процедур DNA2.0. Гени амінотрансферази з *Vibrio fluvialis* JS17 [SEQ ID No. 5] і *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 [SEQ ID No. 16], які кодує амінокислотні послідовності *V. fluvialis* JS17 омега-амінотрансферази [SEQ ID No. 6] і *B. weihenstephanensis* KBAB4 амінотрансферази (ZP_01186960) [SEQ ID No. 17], відповідно, були оптимізовані за кодоном й підсумковими послідовностями [SEQ ID NO: 7] і [SEQ ID NO: 8] були отримані шляхом синтезу ДНК.

Конструкції генів клонують в рBAD/Мус-His-DEST експресійні вектори, використовуючи Gateway технологію (Invitrogen) за допомогою введених сайтів attB і pDONR201 (Invitrogen) як вихідних векторів, як описано в протоколах виробника (www.invitrogen.com). У такий спосіб отримані експресійні вектори рBAD-Vfl_AT і рBAD-Bwe_AT, відповідно. Відповідні експресійні штами одержують трансформацію хімічно компетентного *E. coli* TOP10 (Invitrogen) відповідними рBAD-експресійними векторами.

Аналогічно, експресійний вектор одержують із геном амінотрансферази з *Paracoccus denitrificans* [SEQ ID No 14], який кодує амінокислотну послідовність SEQ ID No 15.

Клонування за допомогою PCR

Гени амінотрансферази ампліфікують з геномною ДНК за допомогою PCR, використовуючи PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen) відповідно до технічних характеристик виробника, використовуючи праймери, перераховані в таблиці 3.

Таблиця 3

Походження гена	Ген SEQ ID No	Фермент SEQ ID No	Прямий праймер SEQ ID No	Зворотний праймер SEQ ID No
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> gi9946143	1	2	23	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> gi9951072	3	4	25	26

Реакції PCR аналізують за допомогою електрофорезу в агарозному гелі й продукти PCR належного розміру елюють з гелю з використанням набору реактивів QIA для швидкого очищення продуктів PCR (Qiagen, Hilden, Germany). Очищені продукти PCR клонують в рBAD/Мус-His-DEST експресійні вектори, використовуючи Gateway технологію (Invitrogen) за введеними attB сайтами і використовуючи pDONR-zeo (Invitrogen) як вихідний вектор, як описано в протоколах виробника. Послідовність генів, клонованих шляхом PCR, підтверджують секвенуванням ДНК. У такий спосіб одержують експресійні вектори рBAD-Pae-gi9946143_AT, рBAD-Pae-gi9951072_AT and рBAD-Pde_AT_ZP00628577. Відповідні експресійні штами одержують трансформацію хімічно компетентного *E. coli* TOP10 (Invitrogen) з відповідними рBAD-експресійними конструкціями.

Вирощування *E. coli* для експресії білка

Дрібномасштабне вирощування проводять в 96-коміркових планшетах із глибокими комірками, які містять 940 мкл середовища, яке містить 0,02 % (маса/об'єм) L-арабінози. Інокуляцію проводять перенесенням клітин із замороженої вихідної культури за допомогою 96-коміркового штамп (Kühner, Birsfelden, Switzerland). Планшети інкубують на орбітальному струшувачі (300 об./хв., амплітуда 5 см) при 25 °C протягом 48 годин. Звичайно досягають $D_{620\text{nm}}$ рівної 2-4.

Одержання клітинних лізатів

Приготування лізуючого буфера

Лізуючий буфер містить інгредієнти, представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

1M MOPS pH 7.5	5 мл
ДНКаза I ступінь чистоти II (Roche)	10 мг
Лізоцим	200 мг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	123.2 мг
Дитіотреїтол	154.2 мг
H ₂ O (Milliq)	Доводять до 100 мл

Розчин готують безпосередньо перед вживанням.

Одержання екстракту, який не містить клітин, за допомогою лізису

- 5 Клітини, отримані дрібномасштабним вирощуванням (дивись попередній параграф) виділяють центрифугуванням і супернатант видаляють. Клітинну масу, яка утворюється при центрифугуванні, заморожують при -20 °C протягом щонайменше 16 годин й потім розморожують на кризі. 500 мкл свіжоприготовленого буфера для лізису додають у кожну комірку й клітини ресуспендують інтенсивним струшуванням планшета протягом 2-5 хвилин.
- 10 Для успішного лізису планшет інкубують за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Для видалення клітинного дебриса, планшет центрифугують при 4 °C і 6000 g протягом 20 хвилин. Супернатант переносять на новий планшет і зберігають на кризі до наступного використання.

Одержання екстракту, який не містить клітин, за допомогою ультразвуку

- 15 Клітини, отримані середньомасштабним вирощуванням (дивись попередній параграф) збирали центрифугуванням і супернатант видаляли. 1 мл буфера на основі фосфату калію, pH7, додають до 0,5 г вологого клітинного осаду й клітини ресуспендують інтенсивним перемішуванням. Для успішного лізису клітини піддають дії ультразвуку протягом 20 хвилин. Для видалення клітинного дебриса, лізати центрифугують при 4 °C і 6000 g протягом 20 хвилин. Супернатант переносять на новий планшет і зберігають на кризі до наступного використання.

- 20 Біоконверсія N-ацетил-4-амінобутиральдегіду в N-ацетил-ДАБ

Умови скринінгу

- Усі ферменти суспендують в 100 мМ буфері на основі фосфату калію, pH 7,5 до кінцевого об'єму, рівного 100 мкл. Ферментативні реакції починають додаванням 150 мкл вихідного розчину, який містить донор аміногрупи (L-аланін або (S)-альфа-метилбензиламін) і кофактор (PLP). Кінцеві концентрації в реакційній суміші на 250 мкл дорівнюють: N-ацетил-амінобутанал (70 мМ), донор аміногрупи (140 мМ), PLP (12,5 мМ). Два донори аміногрупи випробовують окремо. Реакційні суміші інкубують протягом ночі (16,5 і 16 годин) при 28 °C, струшуючи при 560 об./хв. на орбітальному струшувачі IKA. Після інкубації реакційні суміші блокують і розбавляють додаванням 750 мкл 60 % ацетонітрилу, розведеного 0,2 % мурашиною кислотою.
- 30 Мікротитровані планшети центрифугують при 3500 об./хв. протягом 20 хвилин. Аналіз проводять за допомогою PX-МС аналізу (дивися Resolve Job 2009-02-00649).

Аналітичні Способи:

- У цілому за допомогою PX-МС аналізу було проаналізовано 148 зразків з використанням аналітичного способу, описаного в роботі 2009-01-00306. Межа чутливості; лінійна ділянка: для донора аміногрупи L-аланіну 0 мкмоль/л-550 мкмоль/л і для донора аміногрупи (S)-альфа-метилбензиламіну 0 мкмоль/л-280 мкмоль/л.

Результати біоконверсії N-ацетил-4-амінобутиральдегіду в N-ацетилДАБ

- 40 У цілому проведений скринінг 148 зразків для визначення способу перетворення N-ацетил-4-амінобутиральдегіду в N-ацетил ДАБ. Ступінь перетворення всіх зразків визначають за допомогою PX-МС аналізу. Ступінь перетворення розраховують, виходячи з даних про утворення N-ацетилДАБ. У цілому при використанні L-аланіну як донора аміногрупи було виявлено 31 активних амінотрансфераз (>2 % конверсії). 20 з них також є позитивними при використанні (S)-α-метилбензиламіну як донора аміногрупи. П'ять із цих амінотрансфераз наведено в таблиці 5.

45

Таблиця 5

Амінотрансферази, які демонструють >2 %-ну ступінь конверсії при біоперетворенні N-ацетил-4-амінобутиральдегіду в N-ацетил-ДАБ

Фермент/походження	Відкрита рамка зчитування/вставка	Платформа
Vibrio fluvialis JS17	клон	Sdw/RS AT3
Pseudomonas aeruginosa	Pae_AT_gi9946143	SPEED TA 1
Pseudomonas aeruginosa	Pae_AT_gi9951072	SPEED TA 1
Paracoccus denitrificans	Pde_AT_ZP00628577	Sdw/RS AT3
Bacillus weihenstephanesis	Bwe_AT_ZP01186960	Sdw/RS AT3

Біоперетворення N-ацетилДАБ на ДАБ.

Умови скринінгу

- 5 Усі ферменти суспендують в 100 мМ буфері на основі фосфату калію, pH 7,5 до кінцевого об'єму, рівного 100 мкл. Ферментативні реакції починають додаванням 150 мкл буфера, який містить 13,33 мг/мл N-ацетил-ДАБ HCl в 100 мМ буфері на основі фосфату калію (кінцева реакційна концентрація дорівнює 8 мг/мл \approx 48 мМ N-ацетил-ДАБ). Реакційні суміші інкубують протягом ночі при 37 °C, струшуючи при 460 об./хв. на IKA орбітальному струшувачі. Після інкубації реакційні суміші блокують і розбавляють додаванням 750 мкл 100 мМ HClO₄ в H₂O, pH 1,0. Мікротитрувальні планшети центрифугують при 3500 об./хв. протягом 20 хвилин і аналізують на наявність ДАБ за допомогою HPLC-PCR-FL аналізу, як описано нижче.

Спосіб ВЕРХ-МС аналізу для визначення ДАБ

Приготування зразків:

- 15 Для розведення зразків використовують суміші ацетонітрилу й води з 0,2 % мурашиною кислотою. Процентний вміст ацетонітрилу становить щонайменше 50 %.

Умови РХ:

Колонка	50 × 4,6 мм, HP HILIC, 3 мкм (Alltech)		
Температура колонки	кімнатна температура (24 °C)		
Елюент	A: ацетонітрил, який містить 0,2 % мурашиної кислоти B: вода, яка містить 0,2 % мурашиної кислоти		
Градiєнт	час (хв.)	% елюента B	
	0	5	
	2.5	20	
	10	20	
	11.1	5	
	15	5	
Потiк	1 мл/хв., перед введенням MS потiк роздiляється 1:5		
Об'єм, що вводиться	2 мкл		

Умови МС:

Іонізація	Турбо іон-розпилення позитивних іонів	
Характеристики джерела	Вольтаж іона-розпилення: 5 kV Температура: 400°C Потенціал дефрагментації: 51 V Фокусуючий потенціал: 180 V	
Режим сканування (ДАБ)	режим селективного визначення іонів	m/z 72 (час спокою 200 мсек)

20

За використаних умов ДАБ елюється за 6,3 хвилини

Результати біоконверсії N-ацетилДАБ у ДАБ

- 25 Відбір випробуваних ферментів, які проявляють гідролітичну активність при біоконверсії N-ацетилДАБ у ДАБ продемонстровано в таблиці 6. Деякі із цих ферментів також охарактеризовані своїми послідовностями, наведеними в цій патентній заявці.

Таблиця 6

Гідроліз N-ацетил-ДАБ у ДАБ

Біокаталізатор	Фірма-постачальник	Концентрація ДАБ (мкМ)	SEQ ID No	Uniprot No
<i>Rhizopus japonicus</i> ліпаза	Biocatalysts LTD	690		
<i>Aspergillus niger</i> ліпаза (ліпаза AP-6)	Amano	278		
<i>Alcaligenes</i> sp. ліпаза (ліпаза QL)	Meito Sangyo	186		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> протеаза (протеаза B)	DSM-Gist	142	19	
<i>Bacillus licheniformis</i> протеаза (Delvolase)	DSM-Gist	162	20	
<i>Rhizopus oryzae</i> ліпаза	DSM-Gist	1846		P61872
Еспераза	NOVO	158		
Алкалаза	NOVO	130		
Різновиди <i>Aspergillus</i> (Ацилаза)	Sigma	270		
Прозим 6	Amano	346		
Протеаза М	Amano	206		
<i>Bacillus subtilis</i> (Протеаза N)	Amano	514		
<i>Mycobacterium neoaurum</i> L-аміноамідаза	DSM	1174		
Цердаза	Novozymes	530	21	
Хімічний контроль		108		
Хімічний контроль		104		

Висновок

Показано, що велику кількість гідролітичних ферментів використовують як біокаталізатори для перетворення N-ацетил-ДАБ на ДАБ.

Попередники N-захищеного ДАБ з іншими ацил-захисними групами можуть бути отримані, наприклад, ацилюванням, наприклад, 4-амінобутиральдегіду або орнітину. Наприклад, ацилюванням оцтовим ангідридом у мурашиній кислоті для введення формільної захисної групи або реакцією ангідриду C₂-C₆ карбонових кислот або ацилхлориду для введення N-ацетильної, N-пропіонільної, N-бутирільної, N-валерильної або N-капроїльної захисної групи, відповідно.

Передбачається, що такі попередники N-захищених ДАБ, як, наприклад, N-форміл ДАБ і вищі гомологи з C₃-C₆ ацильними захисними групами, можуть бути аналогічно перетворені на ДАБ за допомогою вищеописаних ферментів.

Біоконверсія N⁵-ацетилорнітину в N-ацетилДАБ

Культивация клітин і експресія

Біоконверсію проводять із використанням декарбоксилаз. Більша частина декарбоксилаз експресується в *E. coli* за стандартних умов.

Попередні культури одержують інокуляцією 5 мл середовища LB^{carb} з *E. coli* Top10, яке містить pBAD-DEST_lysA, pBAD-DEST_kdcA, pBAD-DEST_kivD або pBAD-DEST_kgd з вихідних гліцеринових стоків. Попередні культури інкубують протягом ночі при 28 °C. 0,5 мл кожної попередньої культури розбавляють в 50 мл середовища LB^{carb}. Культури інкубують при 28 °C до досягнення D₆₀₀, рівної 0,6 (у середньому через 3-4 години). Експресію білка індують додаванням арабінози до кінцевої концентрації, рівної 0,02 %. Після нічної інкубації при 28 °C клітини збирають (10 хв., 5000 об./хв., 4 °C). Для аналізу електрофорезом у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) по 1 мл зразка відбирають перед індукцією, через 3 години після індукції й уночі. Клітини осаджують центрифугуванням (5 хв., 13,000 об./хв.) і осад зберігають при -20 °C.

Дві орнітиндекарбоксилази pBAD2_ODC *E. coli* DH5α/LJ110 вирощують і експресують за дещо відмінних умов. У цьому випадку основну культуру вирощують до D₆₂₀, рівної 1,5 перед стимулюванням 50 мкМ IPTG. Усі решта умов залишаються тими ж, що й описані вище.

Одержання зразків, які не містять клітин (CFE) під дією ультразвукового випромінювання

Осади клітин разморожують у кризі й ресуспендують в 2 об'ємах 50 мМ калій-фосфатного (KPi) буфера при pH 7,5. Суспензії клітин піддають дії ультразвукового випромінювання протягом 10 хвилин з періодичними імпульсами протягом 10 секунд. Після дії ультразвукового

випромінювання клітинний дебрис відокремлюють центрифугуванням (20 хв., 13,200 об./хв., 4 °C). Використовують аналіз електрофорезом у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфата натрію (SDS-PAGE) для визначення рівнів експресії й зразки, які не містять клітин (CFE), зберігають при -20 °C.

5

Таблиця 7

Умови біоконверсії для перетворення N-Ас-орнітину в N-Ас-ДАБ

Реакція	200 мМ К- ацетат рН 4,6	200 мМ КФ рН 6,9	200 мМ КФ рН 7,5	200 мМ КФ рН 6,5	100 мМ К- ацетат рН 5,7	200 мМ N-Ас- орні- тину	10 мМ PLP	100 мМ ThD	4М NaCl	50 мМ ЕД ТА	1М MgCl ₂	Фе- рме- нт	Во- да	Усь- ого
	1,875					1,25	0,05		0,25			1	0,575	5
Глутамат DC A			1,875			1,25	0,05			0,5		1	0,325	5
Аспартат DC A				1,875		1,25	0,05				0,025	1	0,8	5
LysA				1,875		1,25		0,05			0,025	1	0,8	5
KdcA				1,875		1,25		0,05			0,025	1	0,8	5
KivD				1,875		1,25		0,05			0,025	1	0,8	5
Kgd					1,875	1,25	0,05				0,025	1	0,8	5
Лізін DC		1,875				1,25	0,05				0,025	1	0,8	5
Орнітин DC LJ110		1,875				1,25	0,05				0,025	1	0,8	5
Орнітин DC DH5a					1,875		0,05				0,025	1	2,05	5
Порожній					1,875	1,25	0,05				0,025		1,8	5
Порожній														

Усі реакції перетворення N-Ас-орнітину на N-Ас-ДАБ проводять при перемішуванні й інкубації при 37 °C. Зразки відбирають у момент часу: 0; 2; 18; 28 і 44 годин і зберігають при -20 °C. Для аналізу 500 мкл кожного зразка додають до 500 мкл ацетонітрилу й центрифугують при максимальній швидкості протягом 10 хвилин. Зразки аналізують ТСХ і елюють сумішшю аміак: метанол (1:1) і проявляють спреєм нінгідрину. Для кількісного аналізу визначають вміст зразків за допомогою PX-MC-MC (LC MS-MS) відповідно до нижчеописаного способу.

Спосіб аналізу ВЕРХ-МС для визначення N-ацетил-ДАБ

Приготування зразків:

Для розведення зразка використовують суміш ацетонітрилу й води з 0,2 % мурашиною кислотою. Процентний вміст ацетонітрилу становить щонайменше 50 %.

Експерименти проводять при використанні PE SCIEX API2000 PX-MC/MC від Applied Biosystems.

Умови PX:

Колонка	50 × 4,6 мм, HP HILIC, 3 мкм (Alltech)	
Температура колонки	кімнатна температура (240C)	
Елюент	А: ацетонітрil, який містить 0,2 % мурашиної кислоти В: вода, яка містить 0,2 % мурашиної кислоти	
Гradient	час (хв.)	% елюента В
	0	5
	2,5	20
	8	20
	8,1	5
	12	5
Потік	1 мл/хв., перед введенням MS потік розділяється 1:5	
Об'єм, який вводиться	2 мкл	

20

Умови МС:

Іонізація

Турбо іон-розпилення позитивних іонів

Характеристики
джерела

Вольтаж іона-розпилення: 5 кV

Температура: 400 °C

Потенціал дефрагментації: 11 V

Фокусуючий потенціал: 350 V

Режим сканування (N-Ас-ДАБ)

режим селективного
визначення іонів

m/z 72 & 114 (час спокою 200 мсек)

За використаних умов N-Ас-ДАБ елюється за 4,2 хвилини.

5 Результати біоконверсії N⁵-ацетил-орнітину в N-ацетил-ДАБ

Для перетворення орнітину на ДАБ зразки, отримані в момент завершення реакції (44 годин) аналізують ТСХ (Фігура 1).

Усі зразки, отримані в момент завершення реакції, аналізують за допомогою РХ-МС-МС (LC MS-MS). Ті з них, які характеризуються величиною, яка є щонайменше на 3 мікромоля більш високою у порівнянні з рівнем контрольних зразків представлено в таблиці 8.

10

Таблиця 8

Результати РХ-МС-МС з біоконверсії

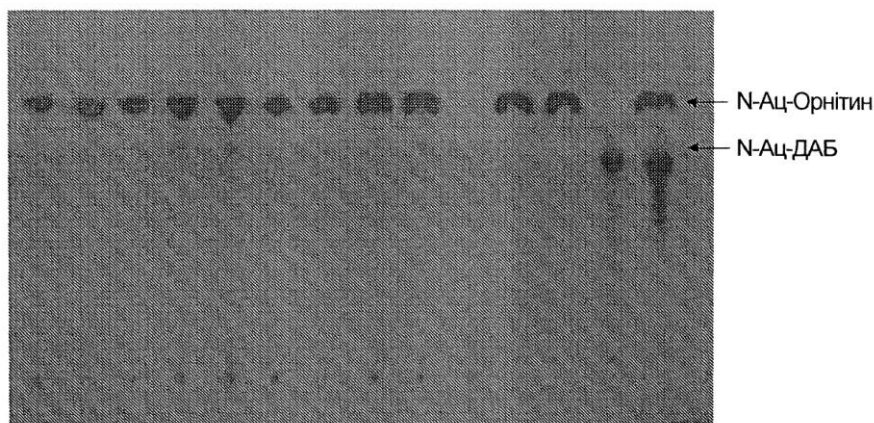
N-ацетил-ДАБ		
	m/z 131 → 72	m/z 131 → 114
зразок	мікромоль/л	мікромоль/л
1	9	-
3	3	-
4	4	3
5	10	8
6	5	4
	ммоль/л	ммоль/л
CB200109	370	344

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 15 1. Спосіб одержання 1,4-діамінобутану [ДАБ], який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, яка включає біокаталітичне одержання щонайменше одного N-захищеного попередника ДАБ і наступне перетворення *in vitro* N-захищеного попередника на ДАБ, де N-захищений попередник ДАБ вибирають з групи, яка складається з N5-захищеного орнітину, N-захищеного ДАБ, N-захищеного 4-амінобутиральдегіду або гуанідил-захищеного попередника.
- 20 2. Спосіб одержання ДАБ, який передбачає щонайменше одну біокаталітичну стадію, який включає стадії:
- а) біокаталітичного одержання N-захищеного попередника ДАБ, що приводить до біокаталітичної реакційної суміші, яка містить N-захищений попередник ДАБ,
- 25 б) виділення N-захищеного попередника з біокаталітичної реакційної суміші,
- с) перетворення N-захищеного попередника на ДАБ,
- де N-захищений попередник ДАБ вибирають з групи, яка складається з N5-захищеного орнітину, N-захищеного ДАБ, N-захищеного 4-амінобутиральдегіду або гуанідил-захищеного попередника.
- 30 3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що принаймні один N-захищений попередник ДАБ вибирають з групи, яка складається з N5-ацетилорнітину, N-ацетил-ДАБ і N-ацетил-4-амінобутиральдегіду.
4. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що біокаталітичною стадією є ферментативна стадія.
- 35 5. Спосіб за п. 4 який **відрізняється** тим, що ферментативна стадія протікає в одноклітинному організмі.

6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що ферментативна стадія протікає в одноклітинному організмі, клітині-хазяїні, вибраній з групи, що складається з тваринних клітин, рослинних клітин, бактерій, архей, дріжджів і грибів.
7. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що виділення N-захищеного попередника з біокаталітичної реакційної суміші проводять щонайменше в одну стадію, вибрану з групи, що складається з фільтрування, седиментації, кристалізації, афінної хроматографії, розділової хроматографії, мембранного поділу й випаровування.
8. Спосіб за п. 2, який **відрізняється** тим, що конверсія на стадії с) N-захищеного попередника в ДАВ передбачає щонайменше одну ферментативну стадію або стадію хімічної обробки.
9. Спосіб одержання ДАВ за будь-яким з пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що N-захищений ДАВ перетворюється на ДАВ під дією гідролітичного ферменту.
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що гідролітичний фермент вибирають з групи, яка складається з гідролаз ефірів карбонових кислот, гідролаз тіолових ефірів, ліпаз і пептидаз, а саме з ліпаз і пептидаз.
11. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що гідролітичним ферментом є пептидаза, вибрана з групи карбоксипептидаз серинового типу, металокарбоксипептидаз, карбоксипептидаз цистеїнового типу, серинових ендопептидаз, цистеїнових ендопептидаз, аспарагінових ендопептидаз і металоендопептидаз, зокрема, із серинових ендопептидаз.
12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що сериновою ендопептидазою є субтилізин, переважно субтилізин Карлсберга.

Фіг. 1



Комп'ютерна верстка В. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601