(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101379185 B
(45)授权公告日 2012.08.29

(21)申请号 200780004615.X

(22)申请日 2007.02.05

(30)优先权数据
0602339.4 2006.02.06 GB

(85)PCT申请进入国家阶段日
2008.08.06

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2007/051072 2007.02.05

(87)PCT申请的公布数据
WO2007/090810 EN 2007.08.16

(73)专利权人 葛兰素集团有限公司
地址 英国米德尔塞克斯

(72)发明人 戴维·M·安德森
安德鲁·J·科利斯 刘林
瑟吉·波德科维罗夫
克里斯托弗·普雷斯顿

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 张平元

(51)Int.Cl.
C12N 9/06(2006.01)
C12N 15/52(2006.01)
C12N 9/12(2006.01)
C12P 19/38(2006.01)

(56)对比文件
WO 01/02580 A1,2001.01.11, 说明书第1页第11-29行.
沈荣坤等. 应用大肠杆菌的核苷磷酸化酶合成胸苷.《华东理工大学学报》.1996, 第22卷(第6期),701-706.
Sarla Purohit and Christopher K.Mathews.Nucleotide sequence reveals overlap between T4 phage genes encoding dihydrofolate reductase and thymidylate synthase.《The Journal of Biological Chemistry》.1984, 第259卷(第10期),6261-6266.

审查员 周茂新

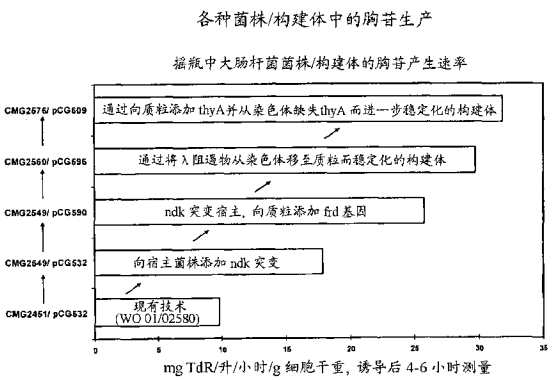
权利要求书 1 页 说明书 18 页 附图 8 页

(54)发明名称

新方法

(57)摘要

本发明公开了包括DNA构建体宿主细胞组合在内的新生物。该生物包括含有编码酶的DNA序列的转录单位(如操纵子),这些酶促进dUMP转化为dTMP所需单碳单位的供应。实例包括:二氢叶酸还原酶基因,如T4 frd;丝氨酸羟甲基转移酶基因,如glyA;3-磷酸甘油酸脱氢酶基因,如serA;以及THF合酶基因,如ADE3。该生物用于生产所含尿苷水平显著下降的胸苷的生物方法中。



CN 101379185 B

1. 一种在培养基中培养时能产生胸苷的细菌，其中所述细菌具有 TMPase 和胸苷酸合酶基因，其特征在于该细菌含有遗传修饰，该遗传修饰通过增加 dUMP 转化为 dTMP 所需单碳单位的可用性，结果使胸苷生物合成途径以消耗 UdR 为代价优先地产生 TdR，其中所述遗传修饰包含大肠杆菌的 thyA 基因或噬菌体 T4 的 td 基因的过表达和导入能够表达二氢叶酸还原酶 (EC1.5.1.3) 的 T4 frd 转录单位，并且其中已将编码核苷二磷酸激酶 (EC2.7.4.6) 的宿主菌株基因敲除或以其它方式失活或切去，其中所述细菌是大肠杆菌。

新方法

技术领域

[0001] 本发明涉及胸苷的生物法生产。更具体地是，本发明涉及一种利用遗传操作的生物材料 (genetically manipulated biological materials) 的方法。该遗传操作的生物材料包括产胸苷的生物，如细菌或一个或多个 DNA 构建体如质粒，该构建体与合适的宿主细胞结合，当在合适的培养基中培养时，将以生物法生产胸苷。

背景技术

[0002] 嘧啶脱氧核糖核苷胸苷可用作药物中间体。在也被称为叠氮或叠氮胸苷 (zidovidine 或 azidothymidine) 的 AZT 的化学合成中尤为重要。它是核苷逆转录酶抑制剂 (NRTI) 类的抗逆转录病毒药物，以“立妥威”(“Retrovir”) 为商标，是第一种批准用于治疗 HIV 感染的药物。

[0003] 通常使用三种或更多种抗逆转录药物的组合来治疗 HIV/AIDS(DeClercq, Med. Chem. Res. 13 :439-478, 2004)。AZT 作为组合治疗的主要成分具有重要和扩展 (expanded) 的作用，并且以多种商标名出售，包括立妥威，齐多唯 (Zidovir)，齐多夫定 (Viro-Z)，阿齐多夫定 (Aviro-Z) 和齐多耶奇 (Zido-H)。

[0004] AZT 在与 NRTI 药物 3TC(拉米夫定 (lamivudine)) 结合时，尤具价值。这两种药物是能够得到的，将它们配制成单一的丸剂，商标名为卡贝兹 (Combivir) 和多唯 (Duovir)。AZT、3TC 和阿巴卡韦 (abacavir) 三种 NRTI 的组合以商品名三协唯 (Trizivir) 出售。其他用于与 AZT 联用的 NRTI 药物包括地丹诺辛 (didanosine)，恩曲他滨 (emtricitabine) 和扎西他滨 (zalcitabine)。

[0005] AZT 也可以用于和 HIV 蛋白酶抑制剂药物包括安普纳韦 (amprenavir)，阿扎那韦 (atazanavir)，茚地纳韦 (indinavir)，利托纳韦 (ritonavir) 和沙奎纳韦 (saquinavir) 联用，以及和非核苷逆转录酶抑制剂 (NNRTI) 包括地拉夫定 (delavirdine)，依法韦仑 (efavirenz) 和奈韦拉平 (nevirapine) 联用。

[0006] AZT 是唯一批准可于怀孕期间使用的抗 -HIV 的药物 (Lyall, et al., HIVMed. 2 : 314-334, 2001)。在 1997 年，约有 600,000 儿童死于母婴传染而感染的 AIDS。怀孕期最后三个月服用 AZT，可将病毒传染的风险降低 67％ (Mitchla & Sharland, Expert Opin. Pharmacother. 1 :239-248, 2000)。

[0007] 对于商业制备在 AZT 生产中所需的大量胸苷而言，发酵技术是一种相对于化学合成具有吸引力的可供选择的方式。发酵工艺是工业领域中行之有效的一种大规模且相对低成本生产生物分子如抗生素、氨基酸和维生素的方式 (Atkinson,& Mavituna, Biochemical Engineering and BiotechnologyHandbook, 2nd Edition, New York, Stockton Press, 1991)。

[0008] 但是自然界中通常找不到“游离”形式的胸苷，但是能以单磷酸胸腺嘧啶脱氧核苷酸的形式产生并以三磷酸形式并入到 DNA 中。生物系统不能天然地生产大量的胸苷，因此需要突变或工程得到的生物。

[0009] 在EP 0,344,937中，公开了选定用于在有氧培养中生产胸苷的短杆菌属(Brevibacterium)的菌株。同时可参考日本专利公开号No.39-16345，其中教导了在发酵生产含有胸苷的多糖中，使用枯草芽孢杆菌(Bacillus subtlis)突变菌株。

[0010] 在US.5,213,972(McCandliss & Anderson)中，公开了用于生产诸如胸苷和2'-脱氧尿苷的嘧啶脱氧核糖核苷(PdN)的工艺，该文献全部内容引用到本文作为参考，同时读者可详细的参考该文献全文。其教导了一种可复制的微生物，所述微生物包含(incorporating)并表达编码PdN磷酸水解酶的DNA序列，该酶能将PdN单磷酸转化为PdN。

[0011] 更具体地是，上述McCandliss & Anderson，描述了用于生产胸苷的发酵方法，包括表达来自枯草芽孢杆菌噬菌体PBS1的脱氧胸苷酸磷酸水解酶(dTMPase)。自然条件下这种类型的酶由噬菌体表达，该噬菌体将诸如2'-脱氧尿苷或5-羟甲基-2'-脱氧尿苷的PdN代替胸苷纳入自身DNA。

[0012] 在US.5,213,972中描述的胸苷发酵中，已通过突变去除了降解胸苷的酶（胸苷磷酸化酶和尿苷磷酸化酶）从而使胸苷积累。所以，dTMPase酶的应用有助于创造允许胸苷合成的途径。但是，dTMPase的单独表达不能保证胸苷生产处于商业上可行的水平。

[0013] 在WO 01/02580（其全部内容加入本发明作为参考，同时读者也可详细地全文参考该专利）中，描述了通过表达dTMPase的细胞导致胸苷产生提高的改进。

[0014] 但是在生物法产生胸苷的生产中存在的问题在于发酵工艺中伴随生产出2'-脱氧尿苷(UdR)。这两种分子具有相似的性质，只是在结构上具有一个甲基的不同，因而下游处理过程中的分离是困难并且费用昂贵的。对于医药应用如AZT的合成而言，可能需要高纯度、低UdR水平的胸苷。

[0015] 如果通过发酵以生物法生产的胸苷能相比于目前工艺表现出显著降低的UdR水平，从而最小化或消除对于为了去除该物质而进行的下游纯化的需求，那么这将是有益的。

[0016] “显著降低”意味着在发酵获得的胸苷产品中，(污染的)UdR水平组成低于25%，更优选地更低于10%，更优选地更低于5%到4%、3%和2%，到1%以及更低的水平。

[0017] 理想地是，应该获得“高”水平的胸苷。胸苷水平可以作为“单位产率(specific productivity)”数据表示，其中测定量在诱导4-6小时后确定。优选大于5mg TdR/l/hr/g细胞干重的水平，更具体地是大于10mg TdR/l/hr/g细胞干重的水平，还更优选大于15到20和25的单位产率数据。

[0018] 这些水平的TdR应该最优选与上述降低的UdR水平一起获得，由此可将数据组合为，例如可获得效价为5g/l的TdR，其含有少于如5%的UdR。

[0019] 确实，现有技术的工艺，如WO01/02580中公开的，在宿主菌株CMG2451中使用质粒pCG532，可在摇瓶试验中产生34.5%的平均UdR含量。在如此高的水平，使得从UdR中分离胸苷的下游处理是困难的并且代价昂贵。

[0020] 本发明的目标在于修饰生产胸苷的生物，从而使它们能生产胸苷而不大量伴生出UdR。

[0021] 这里运用的术语“生物(organism)”包括通过表达其染色体中的编码DNA（如EP 0344937中所公开）或将其作为宿主的DNA（如US 5,213,927和WO 01/02580中所公开）而能够生产胸苷的生物。该宿主DNA可能作为一个或多个DNA构建体存在，如作为一个或多个质粒存在。

[0022] 具体地，本发明的目标在于提供一种与 WO01/02580 公开的构建体 / 宿主组合相比，在生产的胸苷质量方面的改进。

[0023] 进一步地，本发明的目标在于确保对构建体的任何基因修饰是稳定的，从而当构建体导入宿主细胞并且培养其组合时，该宿主无法在构建体不存在时进行自身增殖，即如果构建体丢失，则生物死亡。

发明内容

[0024] 意想不到地是，在胸苷生产中发现一个显著的限速步骤，该步骤发生于 dUMP 到 dTMP 的转化过程中，从而使 dUMP 可能同时指向 UdR 的产生。这种限制作用不能通过简单的过表达催化转化反应的胸苷酸合酶来缓解。但是，通过确保供应就绪 (ready supply) 的甲基供体的可用性，本申请人确定能生产污染性 UdR 水平显著下降（从约 35％到少于 5％并且有些情况少于 1％）的胸苷。

[0025] 根据本发明的第一方面，提供一种在培养基中培养时能产生胸苷的生物，该生物含有一个或多个对其 DNA 进行的遗传修饰或一些对其生长必需的染色体外 DNA，其特征在于该生物含有一个或多个遗传修饰，由于所述一个或多个遗传修饰增加了 dUMP 转化为 dTMP 所需单碳单位的可用性，所以所述修饰使胸苷生物合成途径以消耗 UdR 为代价优先地产生 TdR。

[0026] 上述一个或多个修饰优选地是这样的修饰，所述修饰增加了用于将 dUMP 转化为 dTMP 的胸苷酸合酶可用的 5,10- 亚甲基四氢叶酸 (CH_2-THF) 量。CH_2-THF 是两类已知胸苷酸合酶 (EC2.1.1.45 和 EC2.1.1.148) 的常见一碳单位供体。对这两种酶催化的反应的比较如图 2。

[0027] 在大多数情况下，供体分子的亚甲基还原为甲基所需的氢原子由 CH_2-THF 自身提供，因此 dUMP 到 dTMP 的转化反应需要同时发生 CH_2-THF 到二氢叶酸 (DHF) 的转化反应。这种形式的酶以 EC2.1.1.45 表示，由诸如大肠杆菌 thyA 基因或 T4 噬菌体 td 基因编码。

[0028] 在以 EC2.1.1.148 表示，由诸如幽门螺杆菌 (Helicobacter pulori) 的 thyX 基因编码的酶的可选形式中，以还原形式的黄素核苷酸如黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 提供两个氢原子。在这种情况下，在胸苷酸合酶反应中将 CH_2-THF 转化为四氢叶酸 (THF)，同时将 $FADH_2$ 转化为 FAD(Myllykallio，H.et al.，Science 297 :105-107，2002)。

[0029] 通常情况下通过将一碳单位转移到 THF 来再生 CH_2-THF。在利用 EC2.1.1.45 胸苷酸合酶的生物体内，必须存在通过二氢叶酸还原酶 (EC1.1.5.3) 的作用将 DHF 转化为 THF 作为第一步，二氢叶酸还原酶由例如大肠杆菌 folA 基因或 T4 frd 基因表达。使用 EC 2.1.1.148 形式的胸苷酸合酶则不需要这一步。

[0030] 由 THF 产生 CH_2-THF 的主要代谢路径是一种经过丝氨酸和甘氨酸的途径，起始于糖代谢中间体 3- 磷酸甘油酸。这种丝氨酸 - 甘氨酸 -C_1 途径如图 3 所示。第一关键步骤是在磷酸甘油酸脱氢酶的作用下产生 3- 磷酸羟基丙酮酸，该酶由例如大肠杆菌 serA 基因编码。

[0031] 在该途径中，CH_2-THF 在两步反应中产生 :第一步是通过如大肠杆菌 glyA 基因编码的丝氨酸羟甲基转移酶的作用将 L- 丝氨酸转化为甘氨酸。第二步是通过是至少四个基因的产物的甘氨酸裂解酶复合体将甘氨酸转化为二氧化碳和氨。

[0032] 在许多生物体内，也能使用甲酸提供碳原子通过三步反应从 THF 产生 CH_2-THF，如图 4 所示。甲酸可来源于中心代谢中间体丙酮酸。在真核生物中这三种所需的酶活性可存在于单一的三功能蛋白质中，如通过例如酿酒酵母 (Saccharomyces cerevisiae)ADE3 基因编码。

[0033] 在促进 CH_2-THF 的可用性的生产胸苷的生物中，染色体或染色体外 DNA 的基因修饰，致使在 UdR 水平显著下降的同时，胸苷以令人满意的产率生产。这种类型的基因修饰能用于逆转 UdR 的增加，所述 UdR 的增加是使用如 US 5,213,972 和 WO 01/02580 中教导的遗传操作来增加总 PdN 产量时的结果，因此这种类型的修饰能改善工艺产量而没有不可接受的 UdR 杂质的增加。

[0034] 优选地但不是必需地是，所述生物是细菌，更优选地是大肠杆菌。但是如先前鉴定的现有技术文件公开的短杆菌属 (Brevibacterium) 和芽孢杆菌属 (Bacillus) 菌种，以及其他产胸苷的生物如棒状杆菌属 (Corynebacterium) 细菌或酵母也能根据本发明的描述进行选用和修饰。可以理解地是，在产胸苷的生物中有多种不同的可以提高 CH_2-THF 可用性的模式，同时在每种情况下最高效的模式将依赖于生物的遗传背景。

[0035] 优选地，该生物也包括能够过表达胸苷酸合酶的转录单位 (染色体上的或染色体外的)，所述胸苷酸合酶由例如 td 或 thyA 基因编码 ；和一个或多个能使胸苷自 dTMP 产生的基因，例如，由例如 dTMPase 基因编码的脱氧胸苷酸磷酸水解酶。

[0036] 在优选的实施方式中，在胸苷酸合酶是产生 DHF 的 EC 2.1.1.45 型时，该生物包括一种在表达时能促进 DHF 转化为 THF 的基因。所述基因可以是二氢叶酸还原酶基因，如 folA 或 frd。优选的二氢叶酸还原酶基因是噬菌体基因，更优选地是 T 偶数噬菌体 (T even phage) 基因，最优选地是 T4 噬菌体基因 frd。

[0037] 可将二氢叶酸还原酶基因直接导入生物的染色体 DNA 中 ；或者可将其纳入 DNA 构建体，接下来使该构建体以所述生物作为宿主。优选地，DNA 构建体是载体，如质粒，病毒，转座子或者微型染色体。

[0038] 当使用 DNA 构建体将 DNA 导入宿主细胞时，优选地保证设计的构建体在供试宿主体内稳定存在。

[0039] 在详细的优选实施方式和最佳模式中，该生物是大肠杆菌宿主菌株 CMG2576，该菌株来源于 WO 01/02580 公开的菌株 CMG2451，带有质粒 pCG609，该质粒来源于 WO 01/02580 公开的 pCG532。它们的构成在实施例 3 和 4 中更全面的详细说明。两次稳定化处理这种组合以确保在“非诱导”条件下生长期间将质粒保持在宿主菌株中。

[0040] 将 TMPase 基因与噬菌体 λP_L 启动子偶联插入到宿主染色体。该质粒携带在其自身启动子控制下的噬菌体 λcI_{857} 温度敏感型阻遏物，该阻遏物从 WO 01/02580 中公开的宿主菌株染色体上重新定位。如果质粒丢失将没有阻遏物产生，同时表达 TMPase 基因，从而将 TMP 转化为胸苷，继而使生物死亡。

[0041] 申请人确定该稳定化机制在需要培养多代的大规模培养中使用是不足的，因为质粒丢失伴随着染色体上定位的 TMPase 基因的同时失活是频繁的足以使缺少质粒的衍生菌株生长的情况。添加第二种稳定化的机理，其中将一种生长和存活必需的基因从染色体上缺失并将其重新定位于质粒上。在 CMG2576 和 pCG609 组合中，这种基因是 ThyA，将其克隆进质粒，使其在 lac 启动子的控制下。

[0042] 没有功能性 ThyA 基因，细胞不能产生 TMP，因此不能产生用于合成 DNA 的 TTP，进而死亡。该机制特别有效，因为基因能够容易地进行突变而丧失功能，但是不容易重新产生一个完全丧失功能的基因。此外，缺失的酶的产物是磷酸化的化合物，该化合物不能通过从功能细胞传出并且进入那些丢失质粒所带基因的细胞来“互养共栖”(cross-feed)。

[0043] 为了说明本发明更概括的方面，在详细说明中给出了进一步的实例，所述实例不总是直接可比的。摇瓶试验数据经常包括在第二个质粒中导入“试验基因”。但是这种多质粒系统没有进行标度试验 (scale test)，同时它们在大规模培养的遗传稳定性尚未确定。

[0044] 根据本发明的第二个方面，提供一种生产胸苷的方法，包括在培养基中培养生物，该生物包括对其 DNA 进行的一个或多个遗传修饰或一些对其生长必需的染色体外 DNA，其特征在于该生物含有一个或多个遗传修饰，由于所述一个或多个遗传修饰增加了 dUMP 转化为 dTMP 所需单碳单位的可用性，结果使胸苷生物合成途径以消耗 UdR 为代价优先地产生 TdR。

[0045] 优选地，UdR 含量低于胸苷含量的 5％。

[0046] 以单位产率表示的胸苷含量，优选大于 5mg TdR/l/hr/g 细胞干重，更优选大于 7.5 到 10，再以 2.5 为一级直到 25mg TdR/l/hr/g 细胞干重和更高。

[0047] 根据本发明的第三个方面，提供能支持本发明所述生物的生长和胸苷生产的培养基。

[0048] 根据本发明的再一方面，提供自胸苷生产的叠氮胸苷，所述胸苷根据本发明所述的方法生产。

[0049] 本发明的优选实施方式

[0050] 在第一个并且是优选的实施方式中，将基因间接导入生物作为染色体外 DNA，最优选地是以质粒形式导入（而不是直接导入染色体）。优选的基因是表达这样一种酶的基因，该酶能确保将脱氧尿苷单磷酸 (dUMP) 转化成胸腺嘧啶脱氧核苷单磷酸 (dTMP) 的胸苷酸合酶（如 EC 2.1.1.45，EC 2.1.1.148）与供应就绪 (ready supply) 的甲基一起提供，从而与转化为 UdR 相反，将大多数的 dUMP 甲基化为 dTMP。

[0051] 在该优选的实施方式中，优选的胸苷酸合酶是 EC 2.1.1.45 型，同时优选的基因是帮助将二氢叶酸 (DHF) 转化为四氢叶酸 (THF) 的基因。合适的基因是编码二氢叶酸还原酶的基因。这可以是野生型或去调控的细菌基因或噬菌体基因。特别优选的基因，同时也是用作示例性说明本发明的一个基因是噬菌体 T4 的 frd 基因 (T4frd)。

[0052] 在另一个实施方式中，进行基因修饰用于帮助将 THF 转化为 5,10- 亚甲基四氢叶酸 (CH_2-THF)。所有这些遗传修饰有一个共同的目的就是推动 dUMP 优先转化为 dTMP 而非 UdR。

[0053] 已显示有作用的一些基因修饰不是作为优选修饰的一种替代方式，就是与其组合起作用，这些基因修饰包括如下：

[0054] ●对酶进行修饰，该酶直接作用于转化 THF 为 CH_2-THF 的反应。一个这样的修饰是导入一个表达丝氨酸羟甲基转移酶的基因，该酶将 L- 丝氨酸转化为甘氨酸的同时催化 THF 转化成 CH_2-THF，例如大肠杆菌的 glyA。其它这样的修饰可包括导入表达一个或多个甘氨酸裂解酶复合体成分的一种或多种基因，该酶复合体催化 THF 转化成 CH_2-THF，同时转化甘氨酸成为二氧化碳和氨，如大肠杆菌的 gcvT，gcvH，gcvP 和 lpd 基因。

[0055] ●进行基因修饰，该修饰直接作用于由甲酸提供所需单碳单位的 THF 到 CH_2-THF 的转化反应。一种这样的修饰是导入一个或多个表达甲酰四氢叶酸合酶 (formyl-THF-synthase)，次甲基四氢叶酸环化水解酶和 CH_3-THF 脱氢酶活性的基因。一个例子是编码具有全部这些活性的三功能蛋白质的酵母 ADE3 基因。另一个例子是，仅向大肠杆菌中导入甲酰四氢叶酸合酶基因，该转化所需的其它酶已存在。

[0056] ●进行基因修饰，该修饰增加反应底物的可用性，该反应作用于 THF 向 CH_2-THF 的转化。一个这种例子是通过导入基因来促进作为丝氨酸羟甲基转移酶底物的 L- 丝氨酸的可用性，该基因例如表达 3- 磷酸甘油酸脱氢酶的大肠杆菌 serA 基因，所述 3- 磷酸甘油酸脱氢酶能催化从糖到 L- 丝氨酸途径中的第一步反应。另一些例子包括导入表达从 3- 磷酸 -D- 甘油酸产生 L- 丝氨酸所涉及的随后酶的基因，例如大肠杆菌的 serC 和 serB，或者任何的基因修饰，该修饰能增加酵母 ADE3 基因编码的酶复合体所需甲酸的可用性。

[0057] 本发明的各个方面与 US 5,213,972 和 WO 01/02580 二者的教导相比有显著的进步，同时提供了改进的 DNA 构建体和含有该构建体的宿主细胞以用于商业生产胸苷。它们还能应用于对其它产胸苷生物的修饰。

[0058] 本发明其它的目的，特点和优势将在接下来的描述中变得清晰。但应当理解地是，这些代表了本发明优选实施方式并且仅以举例方式说明。在本发明精神和范围内的各种不同修饰和改变对本领域的技术人员是显而易见的。

[0059] 本发明的构建体可能是染色体上的或更优选是染色体外的，如位于载体上。

[0060] 本发明的载体包括质粒，病毒（包括噬菌体），转座子，和微型染色体，优选地是质粒。

[0061] 可以根据本领域的技术人员已知的任何方便的方法将载体导入宿主细胞，所述方法例如 P1 转导，电穿孔或者转化。

[0062] 用于本发明中合适的宿主细胞包括真核生物（如真菌）和原核生物（如细菌）。原核生物包括大肠杆菌、沙门氏菌属 (Salmonella)、假单孢菌属 (Pseudomonas)、短杆菌属、芽孢杆菌属 (Bacillus) 菌株以及它们的突变菌株。

[0063] 优选地，本发明的载体包括调控元件（例如启动子如 λ P_L，操纵基因，激活剂，阻遏物如 λ 阻遏物，尤其是温度敏感性变体，和 / 或增强子），合适的终止序列，启始序列和核糖体结合位点。另外载体还可包括选择性标记。可供选择地，调控元件（尤其是 λ 阻遏物）可位于宿主细胞染色体上。

[0064] 根据本发明修饰的宿主细胞在胸苷的商业生产中特别有用。在本发明特别有利地应用中，含有（携带或者并入）根据本发明（尤其与 US 5,213,972 或者 WO 01/02580 的教导相结合）修饰的质粒的大肠杆菌宿主细胞能用在胸苷的商业生产中。所以，根据本发明修饰的宿主细胞另外还可包括来源于如 PBS1 的 dTMPase 和 US 5,213,972 教导的突变如 deoA，tdk-1 和 udp-1，以及在 WO 01/02580 中教导的对构建体的进一步改进如 T4 nrdCAB，T4 td，dcd 和 udk。

[0065] 一般来说，使用如 WO 01/02580 教导的发酵方法，该方法涉及将细胞浸没 (submerge) 在合适容器内包含的培养基中。在合适的条件下培养之后，收集产生的胸苷并纯化（富集），如果需要，根据标准的方案纯化至药用的级别。该纯化的胸苷随后能用于药物的生产，如用于药用组合物如 AZT 的生产。

[0066] 附图简述

[0067] 仅以实例的方式，参考下列的附图来说明本发明，其中：

[0068] 图 1 显示胸苷生物合成的途径；

[0069] 图 2 显示胸苷酸合酶反应（转化 dUMP 为 dTMP）；

[0070] 图 3 显示从 L- 丝氨酸和甘氨酸再生 CH_2-THF；

[0071] 图 4 显示从甲酸再生 CH_2-THF；

[0072] 图 5 总结了改进 CH_2-THF 再生的方法；

[0073] 图 6 显示质粒 pCG532 的图谱（现有技术教导）；

[0074] 图 7 显示质粒 pCG609 的图谱；

[0075] 图 8 显示质粒 pCG376 的图谱；和

[0076] 图 9 对比了一些宿主 / 质粒中的胸苷生产。

[0077] 详细描述

[0078] 图 1 使用添加有 TMPase 基因的大肠杆菌 K12 为例显示了胸苷生物合成途径的复杂性及相关的遗传学。胸苷以 TdR 表示，2' - 脱氧尿苷以 UdR 表示，在图示的右下角。UdR 在化学上不同于 TdR 之处在于，比 TdR 缺少一个甲基。这两种化合物间的结构类似性使纯化困难并且代价昂贵。本发明涉及进行基因修饰，该修饰能以消耗 UdR 的生产为代价影响 TdR 的优先形成。

[0079] 本申请人确定，通过确保向 dUMP 到 dTMP 的工艺步骤提供增加的一碳单位如 CH_2-THF 的供给，可有效的控制 TdR 相对于 UdR 的水平，所述工艺步骤由例如胸苷酸合酶基因（如 td，thyA 或者 thyX）表达的胸苷酸合酶催化。

[0080] 这主要是通过确保 dUMP 转化成 dTMP 所产生的消耗后的一碳供体分子能快速循环到其作为 CH_2-THF 的活化状态而实现。图 2 显示胸苷酸合酶的两种可供选择的机理，每一种产生不同的消耗后的一碳供体。当胸苷酸合酶是 EC 2.1.1.45 型，例如由 thyA 或 td 基因编码时，消耗后的供体是 DHF。当该酶是 EC 2.1.1.148 型，例如由 thyX 基因编码时，消耗后的供体是 THF。

[0081] 因为 CH_2-THF 直接的前体是 THF，显而易见地，在使用 EC2.1.1.45 型胸苷酸合酶的生物，如大肠杆菌中，第一步反应必须是 DHF 到 THF 的转化。通过向这种生物导入二氢叶酸还原酶基因，其编码催化上述反应的酶，本申请人能够显著降低污染性 UdR 水平，并且额外地增加胸苷的生产量，如实施例 6 所述。

[0082] 这种方法能实现对根据 US 5,213,972 和 / 或 WO 01/02580 教导原理产生的胸苷发酵工艺产量的进一步改进。用于增加嘧啶脱氧核糖核苷总量的以前的遗传修饰，通过导入二氢叶酸还原酶基因，主要导致 UdR 水平的增加，这种额外的产物现在能直接成为 TdR，如实施例 7 所述。

[0083] 在实施例 8 中，已将这种方法与其它修饰结合以确保质粒构建体稳定的存在于它的合适的大肠杆菌宿主菌株内，该质粒构建体携带二氢叶酸还原酶和其它 TdR 生产所需的克隆的基因。这代表了目前对 WO 01/02580 教导的现有技术工艺的最佳模式的改进，但不意味着达到了本发明期望的极限。

[0084] 由图 2 显而易见地是，通过导入二氢叶酸还原酶基因以增加 DHF 到 THF 转化是一种遗传修饰，该修饰能在产胸苷生物中的 CH_2-THF 再生方面产生期望的增加。但是，这种方

法不适合应用于有 EC 2.1.1.148 型胸苷酸合酶的生物。在这些情况下，正如在 DHF 转化为 THF 不是或不再是 CH_2-THF 再生的限制步骤的情况下，有多种可选择的或其他的遗传修饰能用于达到期望的 TdR 生产产量且使 UdR 处于低水平。

[0085] 这些可供选择的修饰通过考虑 THF 生物转化为 CH_2-THF 的路径将变得显而易见，如通过 L- 丝氨酸和甘氨酸，如图 3 所示，或者通过甲酸，如图 4 所示。各种可能的解决方法如图 5 总结。一般来说，合适的修饰或者增加 CH_2-THF 合成的总速率或者改进转化 THF 为 CH_2-THF 所需一碳单位的提供速率。

[0086] 申请人已试验了这些方法的一些实施例。在实施例 9 中，过表达一种酶，该酶能通过将 L- 丝氨酸转化为甘氨酸来将 THF 转化为 CH_2-THF。在实施例 10 中，过表达另一种酶，目的是通过增加代谢物向如图 3 所示的丝氨酸 / 甘氨酸途径的流动，来改进 THF 转化为 CH_2-THF 所需的一碳单位的供应。实施例 11 和 12 运用不同的方法将非固有途径导入大肠杆菌，所述途径用于使用甲酸作为一碳供体将 THF 转化为 CH_2-THF。

[0087] 每种情况中有 i)UdR 水平小幅下降，或 ii)TdR 小幅上升，无相对的 UdR 增加，或者 iii) 前两者的组合。与实施例 6,7,8 中所述增加二氢叶酸还原酶的效果相比，改进是相对较小的，但是应当理解的是，在可选择的或另外的改进型产胸苷生物中，每种情况能更显著，所以是本发明有效的实施例。

[0088] 实施例 1.（比较例）

[0089] 现有技术的构建体 / 菌株

[0090] 以 WO 01/02580 公开的现有技术构建体 / 菌株作为对照，说明本发明的优点。图 6 显示构建体 pCG532，表 1 给出大肠杆菌宿主菌株 CMG2451 的基因型。但是，应当理解的是，并非其中公开的所有基因都构成本发明必需部分，虽然胸苷酸合酶基因（td，在质粒上）和 TMPase（整合到染色体）的存在对其优选实施方式很重要。

[0091] 表 1 ：现有技术宿主菌株 CMG2451 的基因型

[0092]

菌株	基因型
CMG2451	*hsdR*-2 *supE thi deoA*-75 *tdk*-1(λ cI_{857} ΔBAM ΔH1) *nic bio* Δ(chlD-pgl) *nadA*-50::Tn10 *udp*-1 chr::Tn5::dTMPase AZT^R $FUdR^R$

[0093] 实施例 2.

[0094] 胸苷生产的摇瓶试验

[0095] 根据以下方法，将实施例 1 涉及的构建体和菌株在培养基（表 2）中培养。获得的数据用于比较 TdR 产率和 UdR 杂质的相对量（以 TdR 的百分数表示）的目的。

[0096] 所有的实验在 250ml 带挡板的摇瓶中进行，每个试验菌株 7 到 12 个瓶。使用在 LB 培养基中培养的新鲜种子液以大约 2.5％体积的接种量接种于每瓶 20mL 的培养基中。将培养物在 31℃培养至 OD600nm ＝ 5。然后将摇瓶移至不同的摇床，使温度从 35.7℃上调到 36.8℃。温度诱导 4 到 6 小时后取样品分析。

[0097] 表 2 ：摇瓶富集培养基配方

[0098]

成分	量 g/L
磷酸氢二钾	8.0
磷酸二氢钾	8.0
七水合硫酸镁	0.4
硫酸铵	2.0
二水合柠檬酸三钠	0.5
馨森 (Sensient) 的安博里克斯 (Amberex)695,或者奎史特 (Quest) 的海耶斯特 (Hy-Yest)412	10
馨森的安博分 (Amberferm)4015AG	5-10
山梨糖醇	20
碳酸钙	10
痕量元素 1000× 溶液	1mL
酚磺酞 (Phenol red)	0.024

[0099] 培养基在121℃灭菌25分钟之前,用NaOH调整pH至7.0。冷却后,添加生物素(终浓度为1mg/L),维生素B1(10mg/L),烟酸(10mg/L),需要时还可一起添加任选的抗生素,氨苄青霉素(100mg/L),氯霉素(30mg/L),卡那霉素(15mg/L)以及四环素(25mg/L)。结果如表3显示。

[0100] 表3:富集培养基中菌株的平均单位产率(mg TdR/L/hr./g细胞干重)

[0101]

宿主菌株	质粒	单位产率	% UdR	注解
CMG2451	pCG532	8.92	34.5	23个实验的平均值

[0102] 实施例3.

[0103] 从CMG2451开发改进型宿主大肠杆菌菌株CMG2576

[0104] 通过一系列步骤修饰宿主菌株,如下表4列出。共有三个显著的改变,虽然应该理解地是,其中没有一个形成本发明的必需部分。在以下的实施例中,使用中间菌株CMG2549和CMG2560以及最终菌株CMG2576来说明本发明的各个方面。

[0105] CMG2549菌株与CMG2451的不同在于,已经将其染色体上的ndk基因通过用插入的失活的ndk::kan置换而敲除。根据US 5,213,972教导的原理,该变化能用于改进嘧啶核苷的总产量,同时对表明本发明的实用性有着重要的作用,所述实用性在实施例7中有详细叙述。

[0106] CMG2560是通过消除染色体上的λ原噬菌体而构建的,同时修复了引发对生物素和烟酸的需要的突变。这种变化是在携带 λcI_{857} 温度敏感性阻遏物的质粒存在下进行的,缺乏该阻遏物时,插入到染色体中并从 λP_L 启动子表达的dTMPase基因将有活性,而生物体将降解dTMP,因此将不能产生DNA,继而将死亡。

[0107] 最后,CMG2576与CMG2560的不同在于,已将其染色体上的thyA基因用插入失活的thyA748::Tn10置换。该变化是在同时携带 λcI_{857} 阻遏物和克隆的thyA的质粒存在下进行的。没有质粒携带的thyA基因,生物不能合成dTMP,因此将不能合成DNA进而死亡。

[0108] 为了去除染色体上的 λ 阻遏物和失活宿主 thyA 基因而进行的变化的原因如实施例 8 所述。

[0109] 表 4 从 CMG2451 衍生改进型宿主大肠杆菌菌株 CMG2576

[0110]

菌株	基因型	来源[a](derivation)
CMG2451	见表 1	详情在 WO 01/02580 中公开
CMG2532	NA7623 zff-208::Tn10	zff-208::Tn10 来自 CAG18481[b]
CMG2533	CMG2451 ndk::kan zff-208::Tn10	ndk::kan zff-208::Tn10 来自 CMG2532
CMG2549	CMG2533 λ Tn10 tet^S	CMG2533 的 Tn10 缺失和 tet^{Sc}
CMG2560	CMG2549/pCG 195 $\lambda^- nic^+ bio^+$	P1 转导 CMG2549/pCG195 成 nic^+&bio^+
CMG2576	CMG2560/pCG596 thyA748::Tn10	thyA748::Tn10 来自 KL742(CGSC6212[d])

[0111] [a] 突变通过噬菌体 P1 转导引入大肠杆菌。如果突变有选择性的标记，则使用直接 P1 转导。如果突变没有选择性的标记，则使用与邻近 Tn10 插入一起的 P1 共转导。

[0112] [b]Singer et al. Microbiol. Rev. 53 :1-24, 1989.

[0113] [c] 通过将大肠杆菌菌株培养在氯四环素培养基中来产生 Tn10 缺失。(Maloy & Nunn J. Bacteriol. 145 :1110-1112, 1981.)

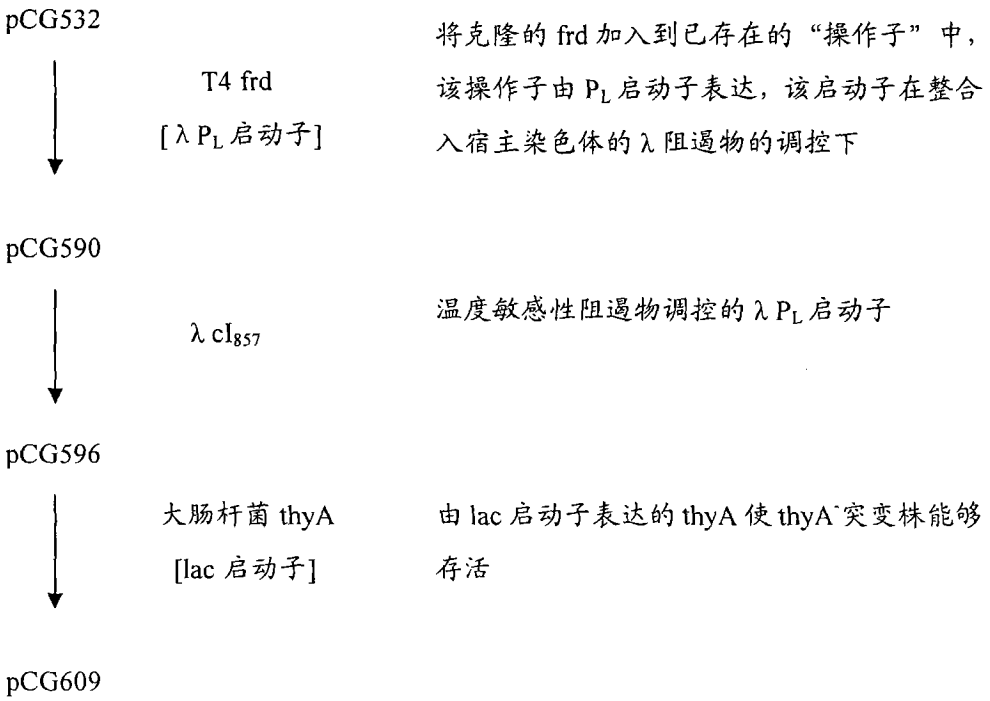
[0114] [d] 所有的 CGSC 菌株均能从耶鲁大学的大肠杆菌遗传保存中心 (E. coliGenetic Stock Center) 获得，邮政信箱 (PO. Box)208104，纽黑文 (New Haven)，CT 06520-8104.

[0115] 实施例 4

[0116] 从 pCG532 开发改进型构建体 pCG609

[0117] 按下列提纲列出的一系列步骤对构建体进行修饰。

[0118]



[0119] 更具体地，基因的来源如下表 5 所显示。质粒 pCG532 和 pCG609 分别如图 6 和图 7 所显示，其中比较了主要的特征。

[0120] 三个对构建体的改变中，只有 T4 frd 基因形成本发明一种实施方式的必需部分。该修饰的效果如以下实施例 6 和 7 所述。其余的改变的进行是为了防止质粒从宿主菌株中丢失，如实施例 8 详述。

[0121] 表 5：从现有技术构建体 pCG532 开发 pCG609

[0122]

质粒	添加的基因	来源
pCG532	现有技术的构建体包括：T4 nrdCAB，td，（λ P_L 启动子）大肠杆菌 udk，dcd	在 WO 01/02580 中详细公开
pCG590	克隆到 pCG532 的 T4 frd	从 pCG581 亚克隆获得 T4 frd（参见实施例 5）
pCG596	克隆到 pCG590 的 λ cI_{857}	转移自宿主菌株染色体
pCG609	克隆到 pCG596 的 thyA	通过 PCR 扩增的大肠杆菌天然 thyA

[0123] 实施例 5

[0124] 从 pCG376 开发试验构建体

[0125] 向确立的宿主菌株 / 质粒组合添加附加基因的效果通过将这些基因导入第二质粒来检测。将所述第二质粒设计成能与 pCG532 和其衍生质粒相兼容，从而使两者均能稳定的存在于单个大肠杆菌宿主中。pCG532 最初来源于天然质粒 ColE1：在 WO 01/02580 中公开了其详细的历史。所述第二质粒以克隆的载体 pACYC177(Chang & Cohen, J. Bacteriol. 134：1141-1156，1978) 为基础，该载体来源于天然质粒 p15A 并能与 ColE1 兼

容。

[0126] 该系统的优势在于，检测基因的添加可以无需对实施例 4 所述的已有复合构建体进行另外的修饰。但是认识到该系统在无选择性抗生素的条件下可能是不稳定的，所以不适合工业发酵工艺中的大规模应用。

[0127] 使用第二质粒检测的基因以及报道其全核苷酸序列的文献在表 6 中列出。所有的基因都经充分表征，将这些基因根据标准方案通过 PCR 方法克隆。每个基因均由噬菌体 λP_L 启动子表达，因此所述基因和第一质粒上克隆的基因以及整合入宿主大肠杆菌染色体的 dTMPase 一起受 cI_{857} 温度敏感型阻遏物调控。

[0128] 表 6 ：从 pCG376 开发试验构建体

[0129]

质粒	添加的基因	来源或参考文献
pCG376		在 WO 01/02580 中公开
pCG601	源自大肠杆菌 K12 的 glyA	Plamann et al.，Nucleic Acid Res. 11 ：2065-2075，1983
pCG844	源自大肠杆菌 K12 的 serA	Tobey&Grant，J. Biol. Chem. 261 ：12179-12183，1986
pCG870	源自酿酒酵母的 ADE3	Staben&Rabinowitz，J. Biol. Chem. 261 ：4629-4637，1986
pCG881	源自尿酸发酵梭状芽胞杆菌 (C. acidi-urici) 的 fhs	Whitehead&Rabinowitz，J. Bacteriol. 170 ：3255-3261，1988

[0130] 实施例 6

[0131] 向现有的技术宿主菌株 / 构建体添加克隆的 T4 frd 基因的效果

[0132] 实施例 4 所述的 pCG590 与现有技术的构建体 pCG532 的不同之处仅在于添加了来源于噬菌体 T4 的 frd 基因，该基因编码 T4 二氢叶酸还原酶。该 T4 酶经充分表征，能在大肠杆菌中容易的表达 (Purohit et al. J. Biol. Chem. 256 ：9121-9125，1981)。

[0133] 将该基因加入由 λP_L 启动子表达的“操纵子”中，因而当温度上升并且 λcI_{857} 阻遏物失活时，该基因会和 dTMPase（在染色体上）及 T4 基因 nrdC，nrdA，nrdB 和 td（在质粒上）一起受到诱导。

[0134] 使用实施例 2 所述的方法，获得携带质粒 pCG590 的现有技术宿主菌株 CMG2451 的摇瓶数据，并且将该结果与实施例 2 中用相同宿主和现有技术的质粒 pCG532 获得的摇瓶数据相比较。结果如下表 7 所示。

[0135] 表 7 ：在富集培养基中表达和不表达 T4frd 基因时菌株的摇瓶平均单位产率 (mg TdR/L/hr/g 细胞干重）

[0136]

宿主菌株	质粒	单位产率	%UdR	注解
CMG2451	pCG532	8.92	34.5	实施例 1 的数据 23 个实验的平均值
	pCG590	9.43	7.02	*590=532+T4 frd* 基因 4 次实验的平均值

[0137] 显而易见地是，添加 T4 frd 基因极大的降低了产生的 UdR 的水平，因此简化了通过发酵法生产基本上纯的 TdR 的方法。可预期地是，改进 dUMP 到 dTMP 而非到 UdR 的转化应产生额外的胸苷以及减少的 UdR，在本情况中这似乎是正确的。

[0138] 实施例 7

[0139] 向 ndk 突变宿主菌株添加克隆的 T4 frd 基因的效果

[0140] 实施例 3 所述的宿主菌株 CMG2549，不同于现有技术的宿主菌株 CMG2451 之处在于 ndk 基因中的突变，该基因编码核苷二磷酸激酶。据报道，该基因的突变增加了大肠杆菌内的 dCTP 和 dTTP 的胞内库 (Lu et al. J. Mol. Biol.，254 :337-341，1995)。根据 US 5,213,972 教导的原理，在嘧啶脱氧核糖核苷生物合成途径中引入这样的突变，这可以用来使合适的工程生物中的 TdR 和 UdR 的总合成增加。

[0141] 使用实施例 2 的方法，获得与 pCG532 或者 pCG590 组合的两种宿主菌株 CMG2451 和 CMG2549 的摇瓶数据。以这种方法，对 ndk 突变及 T4 frd 添加的效果进行单独和组合的比较。该结果如下表 8 所示。

[0142] 表 8 :在富集培养基中有或没有 ndk 突变以及有或没有克隆的 T4 frd 的菌株的摇瓶平均单位产率 (mg TdR/L/hr/g 细胞干重)

[0143]

宿主菌株	质粒	单位产率	% UdR	注解
CMG2451 (ndk^+)	pCG532	6.01	38.1	每个结果是 9 个摇瓶重复的平均值。 因为在 6 小时处对于 pCG590 构建体未测得可检出的 UdR，所以显示的是 12 小时的结果(12 小时处的单位产率比 6 小时处低)
	pCG590 (T4 frd)	6.67	10.2	
CMG2549 (ndk^-)	pCG532	11.44	36.7	
	pCG590 (T4 frd)	19.64	1.48	

[0144] 令人吃惊地是，当 T4 frd 导入携带 ndk 突变的大肠杆菌宿主时，该基因的添加能更有效地降低 UdR 水平。

[0145] 根据现有技术，虽然 ndk 突变能明显的增加大肠杆菌菌株的脱氧核糖核苷合成能力，但是这种改进所获得的 UdR 含量太高以致于不能在纯胸苷的有成本效益的生产中利用。根据本发明，通过提供 CH_2-THF 的充足供给，能够将 ndk 突变体产生的额外 dUMP 直接变为 dTMP，由此进而转化为胸苷，而不是转化为 UdR。相对现有技术而言，该结果在胸苷产率和低 UdR 含量方面均有非常实质性的改进。

[0146] 实施例 8

[0147] 质粒稳定化在胸苷生产中的效果

[0148] 在宿主菌株 CMG2451 或者其 ndk 突变衍生株 CMG2549 中试验 pCG590 时，申请人发现了在培养获得的大肠杆菌菌株时的质粒丢失。通过将噬菌体 λ cI_{857} 温度敏感型阻遏物从染色体上（宿主菌株 CMG2451 及其前体）重新定位于质粒上（构建体 pCG596 及其衍生体），首先探讨了这种明显的不稳定性。

[0149] 在 31℃或更低的温度，cI_{857} 阻遏物的作用是阻止整合入染色体的并与 λ P_L 启动子一起克隆的 dTMPase 基因的表达。当阻遏物位于质粒上时，质粒的丢失导致 dTMPase 的表达，继而降解 dTMP，致使无质粒的细胞丧失生存能力。使用该原理，如实施例 4 所述构建 pCG596，并且如实施例 3 所述构建其宿主菌株 CMG2560。当根据实施例 2 的摇瓶方案测试所得菌株 CMG2560/pCG596 时，观察到了其相对于菌株 CMG2451/pCG590 在胸苷合成速率中有少量的增加，如表 9 所示。

[0150] 但是，申请人确定该机理在防止质粒丢失上不是完全有效。据发现，丢失质粒与同时的使 dTMPase 基因失活的突变会导致筛选可存活且无质粒的细胞。需要另外的或可供选择的机理以确保该质粒的稳定遗传。

[0151] 将由 lac 启动子表达的大肠杆菌 thyA 基因加入 pCG596 以形成 pCG609。然后可将带有该质粒的宿主菌株中的染色体 thyA 基因缺失。从 thyA 表达胸苷酸合酶是细胞生长和生存必需的，因为细胞没有其他的方式能合成 dTMP。dTMP 自身不能穿过细胞壁，并且不能由带质粒的 $thyA^+$ 细胞“互养”给已丢失该质粒的 thyA 细胞。这种使用了必需基因和不能“互养”的代谢物的机理是尤为有效的，因为基因能容易地突变以失活一种酶活，但是重建一种已经丧失的活性较为不易。

[0152] pCG609 的构建如实施例 4 所述，$thyA^-$ 宿主菌株 CMG2576 的构建如实施例 3。可将所得组合即菌株 CMG2576/pCG609 根据实施例 2 的摇瓶发酵方案进行试验，观察到了相对于 CMG2560/pCG596，其在胸苷产率中还有进一步的少量的增加，如表 9 所示。

[0153] 表 9 :在富集培养基中质粒遗传稳定化菌株和质粒未遗传稳定化菌株的摇瓶平均单位产率 (mg TdR/L/hr/g 细胞干重）

[0154]

宿主菌株	质粒	单位产率	注解
CMG2549	pCG590	25.8	每个结果是多个重复摇瓶试验的平均值，每次 6-8 个三角瓶。显示了 4-6 小时的结果
CMG2560 (λ^-)	pCG596 (λcI_{857})	29.7	
CMG2576 (λ^-,*thy*A)	pCG609 (λcI_{857}, thyA)	31.8	

[0155] 在图 9 中，将这些结果与现有技术报道的菌株 CMG2451/pCG532 及其 ndk 突变衍生菌进行比较。可以看到地是，当添加的遗传物质在生物培养过程中能以稳定存在的形式提供时，以改进胸苷产量的方式加强了本发明在提供低水平 UdR 的胸苷方面的优点。

[0156] 实施例 9

[0157] 添加克隆的 glyA 基因的效果

[0158] 本实施例说明了向现有技术的构建体和宿主菌株中，添加编码丝氨酸羟甲基转移酶的克隆大肠杆菌 glyA 基因的效果。该酶催化丝氨酸转化为甘氨酸，该转化与 THF 到 CH_2-THF 的再生偶联（见图 3）。可以认识到，宿主菌株已携带并表达 glyA 基因，在温度诱导质粒携带的基因表达时，该遗传修饰的效果是简单地提高丝氨酸羟甲基转移酶的水平。

[0159] 将 glyA 基因克隆进能与 pCG532 相兼容的质粒载体 pCG376，如实施例 5 所述。所得质粒 pCG601 携带具有 λP_L 启动子的 glyA 基因。使用如实施例 2 所述的摇瓶试验，将带有 pCG532 及 pCG601 的 CMG2451 与现有技术的仅带有 pCG532 的 CMG2451 进行比较。

[0160] 该结果如表 10 所示，并且可与实施例 6 所述的结果进行比较，实施例 6 表明了向现有技术的宿主菌株和构建体添加 T4 frd 的效果。显而易见地是，添加过表达的 glyA 基因使 UdR 显著的下降。但是，下降的程度比 T4 frd 试验观察到的要小，并且 TdR 增加不显著。

[0161] 表 10：在富集培养基中，过表达或不过表达大肠杆菌 glyA 的菌株的摇瓶平均单位产率（mg TdR/L/hr/g 细胞干重）

[0162]

宿主菌株	质粒	单位产率	%UdR	注解
CMG2451	pCG532	8.92	34.5	pCG376是能与pCG532兼容的克隆用载体 pCG601=pCG376+*glyA*
	pCG532+pCG601	8.79	22.07	

[0163] 对于用来说明本发明的大肠杆菌系统，可以总结地是，dUMP 转化为 dTMP 所需提供的 CH_2-THF 受 DHF 转化为 THF 的速率限制，而不是受 THF 到 CH_2-THF 的速率限制。这就解释了为什么 T4 frd 在还原 UdR 方面比 glyA 更有效。然而，为了达到本发明的目标，即增加胸苷酸合酶可用的 CH_2-THF 的供应，使用的不同方法的相对效率高度依赖于将对其施用本发明的产胸苷生物的遗传背景。

[0164] 可以理解地是，在带有不同的或另外添加的基因和突变的大肠杆菌菌株中，以及在其它产胸苷生物中，CH_2-THF 合成的限速步骤可能在其它位置。确实如果根据 US 5,213,972 和 WO 01/02580 教导的原理对产胸苷生物继续进行改造，那么限速步骤可能移至丝氨酸羟甲基转移酶反应，那么根据本发明原理，克隆的 glyA 基因的添加可在降低胸苷中 UdR 的水平方面显示更明显的优点。

[0165] 实施例 10

[0166] 添加克隆的 serA 基因的效果

[0167] 本实施例将说明通过增加丝氨酸 - 甘氨酸途径（图 3 所示）中的酶的表达来改进从 THF 再生 CH_2-THF 的效果。3- 磷酸甘油酸脱氢酶是在这种途径中催化第一步的酶，所述途径在许多生物包括大肠杆菌中是 CH_2-THF 的主要来源。CH_2-THF 在两个连续的反应中产生：由丝氨酸羟甲基转移酶催化的将 L- 丝氨酸转化为甘氨酸的反应，和甘氨酸裂解酶复合体催化的将甘氨酸转化为二氧化碳和氨的反应。

[0168] 使用实施例5详述的第二质粒试验系统，添加克隆的大肠杆菌serA基因以增加固有3-磷酸甘油酸脱氢酶的水平。这种新遗传修饰的起点是最佳的模式宿主菌株和构建体CMG2576/pCG609，其包括ndk突变、T4 frd基因和遗传稳定化的构建体。推断增加THF合成CH_2-THF的能力的优点，在已改进了DHF转化为THF的能力的这种背景下测试最好。

[0169] 如实施例5所述，将serA基因克隆到质粒载体pCG376。所得质粒pCG844携带具有λP_L启动子的serA基因。使用实施例2所述的摇瓶试验，比较了带有pCG609并结合了pCG376或者pCG844的CMG2576衍生菌。结果如表11所示。

[0170] 在已经非常低的UdR和TdR的比率上没有明显的变化，但是在TdR的生产速率上有少量的增加。与实施例6所述的T4 frd基因的效果相比，这种改进是相对较小的。但是，应当理解地是，过表达型serA基因的添加效果在产生更高水平UdR的不同遗传背景的生物中会更明显。

[0171] 已知L-丝氨酸的积累抑制了3-磷酸甘油酸脱氢酶。但是在本实施例中，不认为是这种情况。但是如果这种情况发生，将优选修饰克隆的serA基因，因为氨基酸序列(asn^{346}到ala)中的单一变化即可消除抑制作用(Al-Rabiee etal.，J.Biol.Chem.271:23235，1997)。

[0172] 表11:在富集培养基中，过表达或不过表达大肠杆菌serA的菌株的摇瓶平均单位产率(mg TdR/L/hr/g细胞干重)

[0173]

宿主菌株	质粒	单位产率	% UdR	注解
CMG2576	pCG609+ pCG376	26.9	1.46	pCG376是能与pCG532兼容的克隆用载体
	pCG609+ pCG844	31.7	1.40	pCG844= pCG376+serA

[0174] 实施例11

[0175] 添加克隆的酵母ADE3基因的效果

[0176] 本实施例说明向产胸苷生物添加另外的CH_2-THF再生途径的效果。在选作阐明本发明的大肠杆菌系统中，使用甲酸作为一碳单位的来源以再生CH_2-THF不是正常的代谢路径。但是，该机理存在于包括酿酒酵母在内的真核生物中，其中单一基因可编码三功能蛋白质，该蛋白质表达以这种路径(见图4)将THF转化为CH_2-THF所需的三种酶活性。

[0177] 本申请人试验了将编码这种三功能蛋白质的源自酵母的基因ADE3添加到他们的组合中的效果，该组合是带有包含T4 frd的遗传稳定化构建体的ndk突变大肠杆菌宿主菌株。将带λP_L启动子的ADE3克隆进如实施例5所述的pCG376，产生构建体pCG870。

[0178] 在使用实施例2方案的摇瓶发酵试验中，比较了仅带有pCG609或同时带有pCG609和pCG870的CMG2576衍生菌。本试验中还包括同时带有pCG609和载体pCG376的CGM2576以用于对照(control)第二质粒的影响。结果如下表12显示。虽然在TdR产率上没有显著的效果，但将UdR含量从已经很低的水平进一步的降低。可以理解的是，虽然在本实施例的遗传背景中效益不显著，但是在有不同或另外添加的基因和突变的大肠杆菌菌株中，或者在其他产胸苷生物中，可更好的认识该优点。

[0179] 另外还可认识到的是，甲酸不是原核生物如大肠杆菌中用于 CH_2-THF 的一碳单位的正常来源，因此本发明的这个方面可能需要另外的遗传修饰以获得其最大效果。例如，可以过表达由丙酮酸产生甲酸的丙酮酸甲酸裂解酶来增加用于 THF 甲基化的甲酸的可用性（见图 5）。

[0180] 表 12：在富集培养基中，表达或不表达酵母 ADE3 基因的菌株的摇瓶平均单位产率（mg TdR/L/hr/g 细胞干重）

[0181]

宿主菌株	质粒	单位产率	%UdR	注解
CMG2576	pCG609	27.2	1.22	4-6 小时结果。 pCG376 是能与 pCG609 兼容的克隆用载体 pCG870=pCG376+ADE3
	pCG609+pCG376	29.9	1.28	
	pCG609+pCG870	27.2	0.71	

[0182] 实施例 12

[0183] 添加克隆的尿酸发酵梭状芽胞杆菌 fhs 基因的效果

[0184] 本实施例说明了另外一种可供选择的机理，该机理用于向大肠杆菌中导入使用甲酸再生 CH_2-THF 的途径。如图 4 所示，催化这种反应需要三种酶。因为大肠杆菌缺少这些酶中的第一个酶甲酰四氢叶酸合酶 (formyltetrahydrofolate synthetase)(EC 6.3.4.3)，所以它不能使用该途径。剩下的这两种酶以 folD 基因编码的双功能蛋白质形式存在。

[0185] 作为编码全部三种酶活性的酵母 ADE3 基因的一种替代，申请人将尿酸发酵梭状芽胞杆菌 fhs 基因导入大肠杆菌的产胸苷菌株，该基因仅编码甲酰四氢叶酸合酶 (formyltetrahydrofolate synthetase)，从而使甲酸途径所需的一套酶完整。对于 ADE3，在使用第二质粒载体的宿主菌株 CMG2576 和构建体 pCG609 的最佳模式组合中试验这种遗传改变。

[0186] 将带有 λP_L 启动子的 fhs 克隆到如实施例 5 所述的 pCG376 中，产生构建体 pCG881。在使用实施例 2 方案的摇瓶发酵试验中，对比了含有 pCG609 以及 pCG881 或 pCG376 的 CMG2576 衍生菌。结果如下表 13 所示。

[0187] 与上述 ADE3 实施例相反，在这种最佳模式菌株和构建体中已经是低水平的 UdR 没有下降。但是，TdR 产率有明显的微量增加。对于前一个实施例，可以理解地是，在具有不同遗传背景，或者结合了影响 THF 转化为 CH_2-THF 所需甲酸的可用性的其他变化的产胸苷生物中，能更好的认识本发明的这个方面。

[0188] 表 13：在富集培养基中，表达或不表达尿酸发酵梭状芽胞杆菌 fhs 基因的菌株的摇瓶平均单位产率 (mg TdR/L/hr/g 细胞干重)

[0189]

宿主菌株	质粒	单位产率	%UdR	注解
CMG2576	pCG609+pCG376	19.3	0.294	12 小时结果，三个试验的平均值。pCG881=pCG376+fhs
	pCG609+pCG881	23.7	0.361	

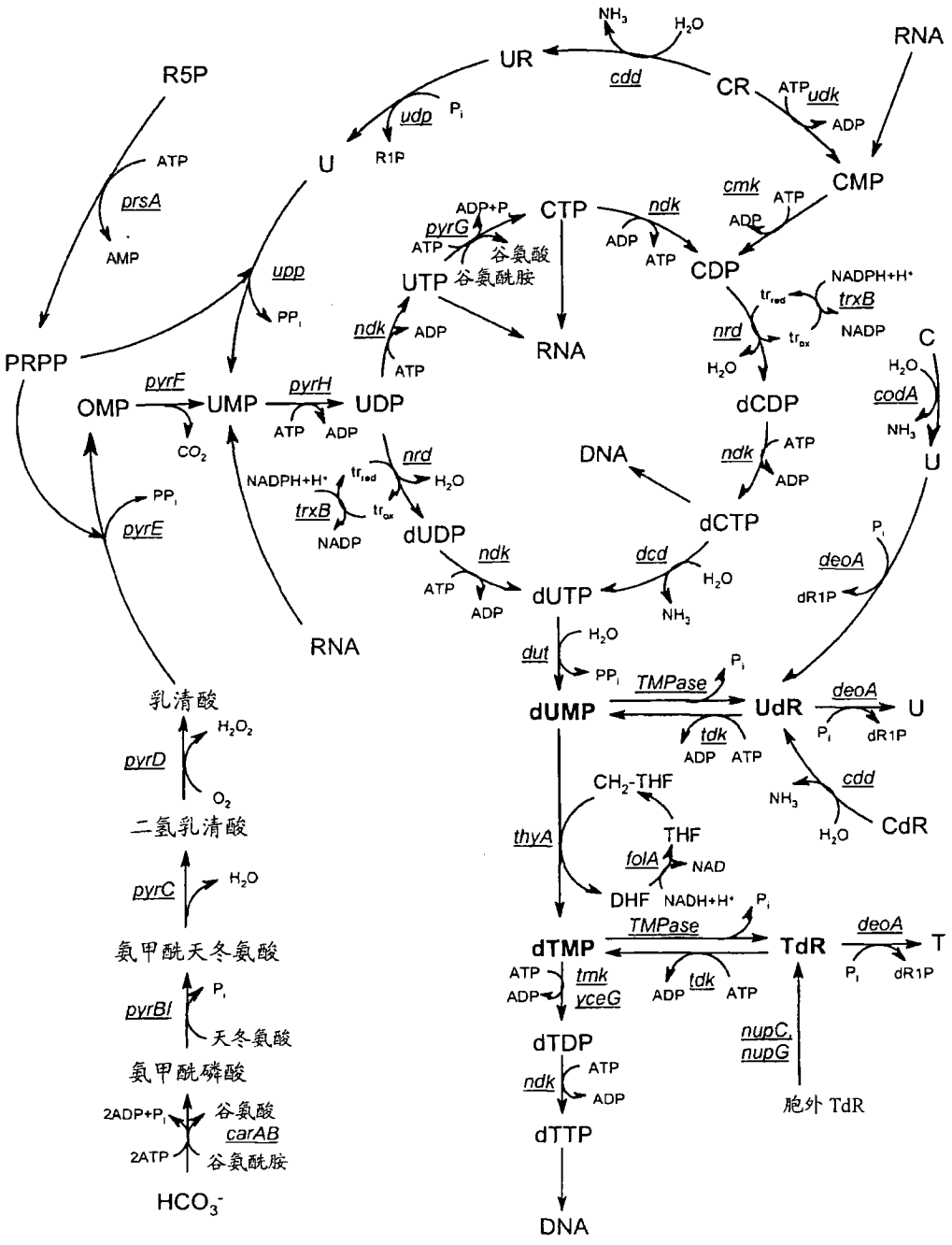


图 1 :大肠杆菌 K12 中的胸苷生物合成

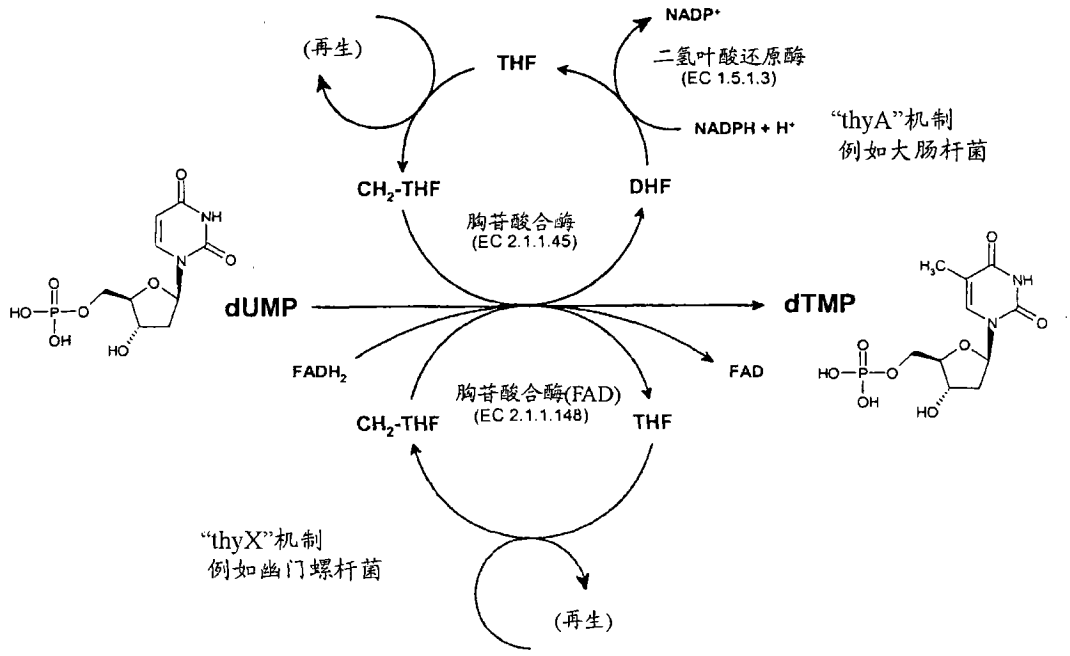


图 2 :胸苷酸合酶反应

dUMP	脱氧尿苷酸
dTMP	胸腺嘧啶脱氧核苷酸
CH_2-THF	5,10- 亚甲基四氢叶酸
THF	四氢叶酸
DHF	二氢叶酸
NADPH	还原性烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NAD	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
$FADH_2$	还原性黄素腺嘌呤二核苷酸
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸

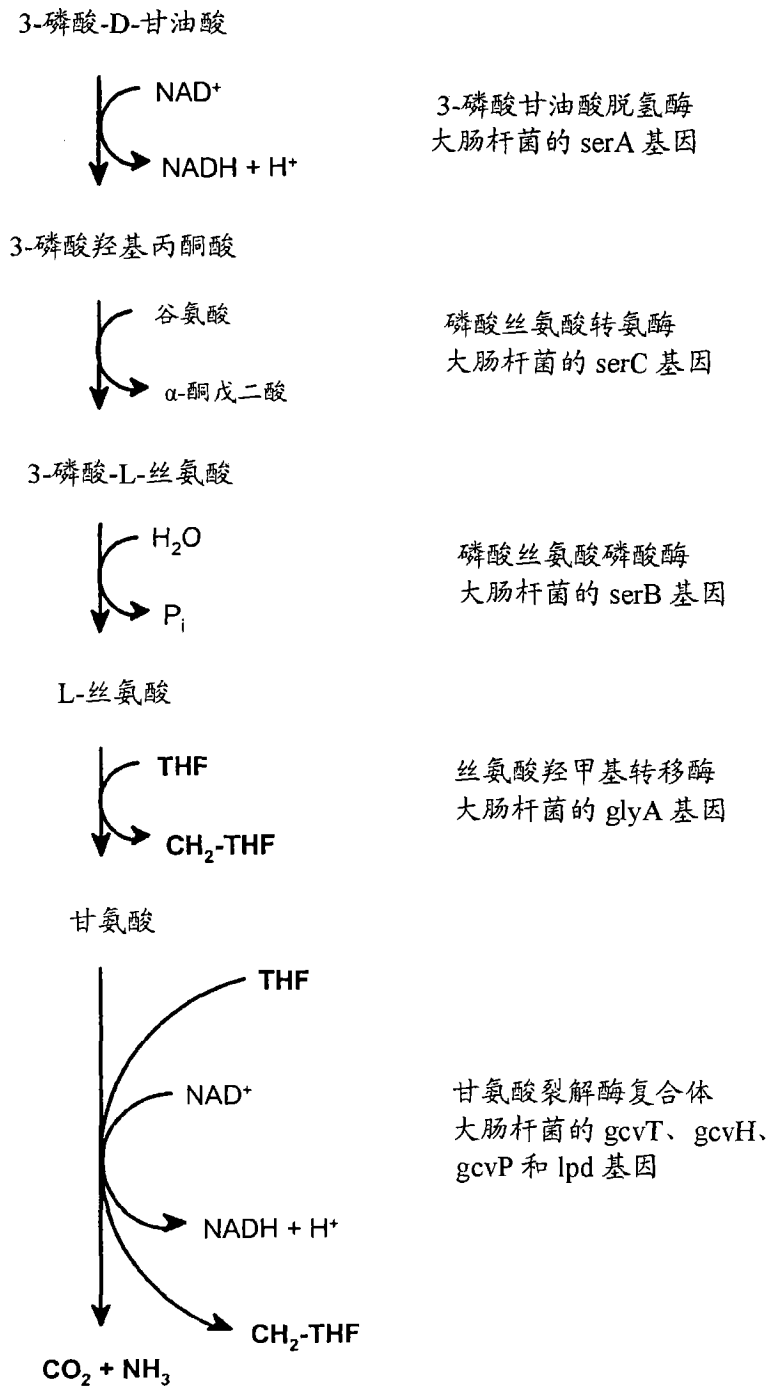


图 3 :经由丝氨酸和甘氨酸再生 CH_2-THF

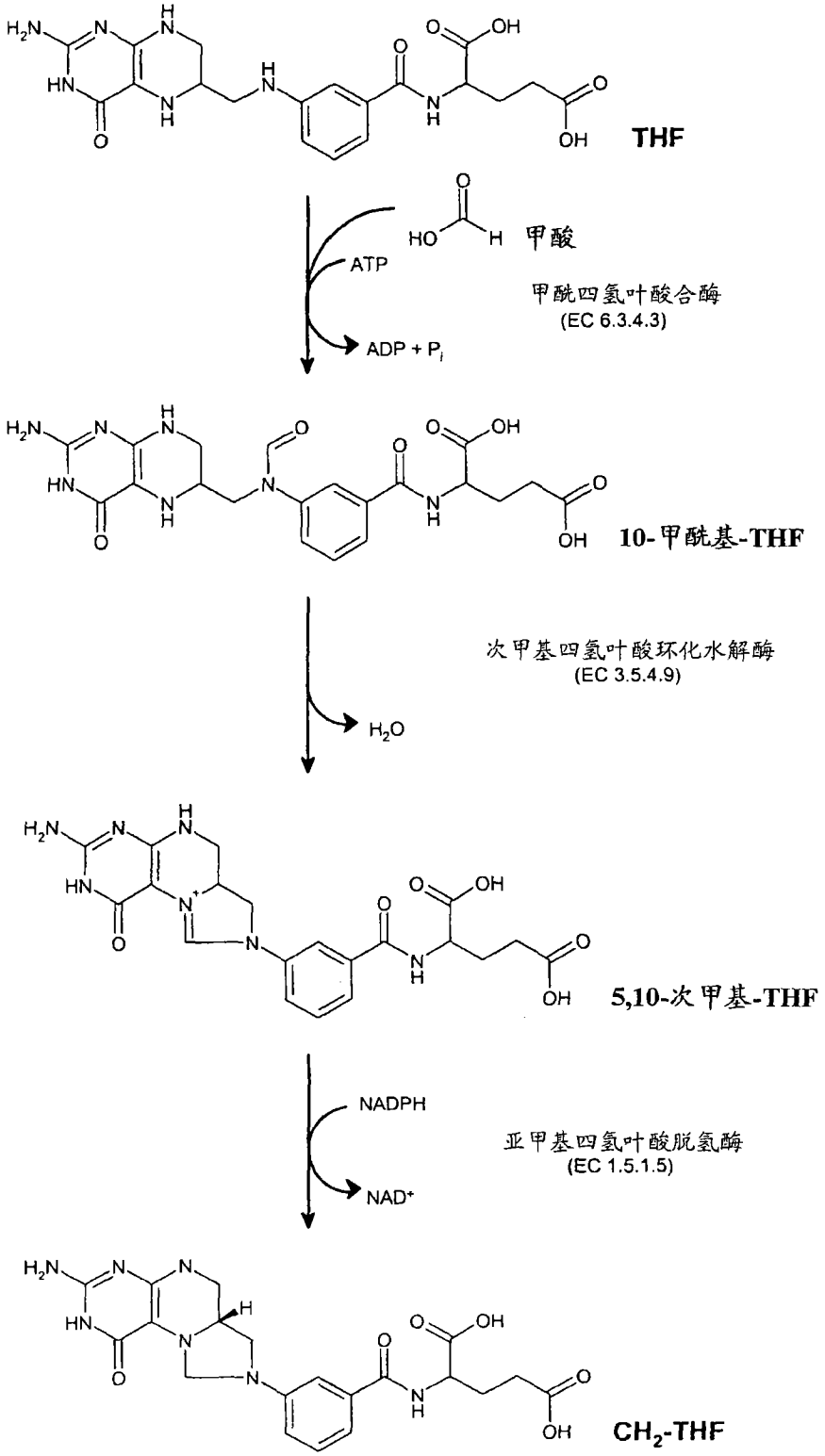


图 4 :从甲酸再生 CH_2-THF

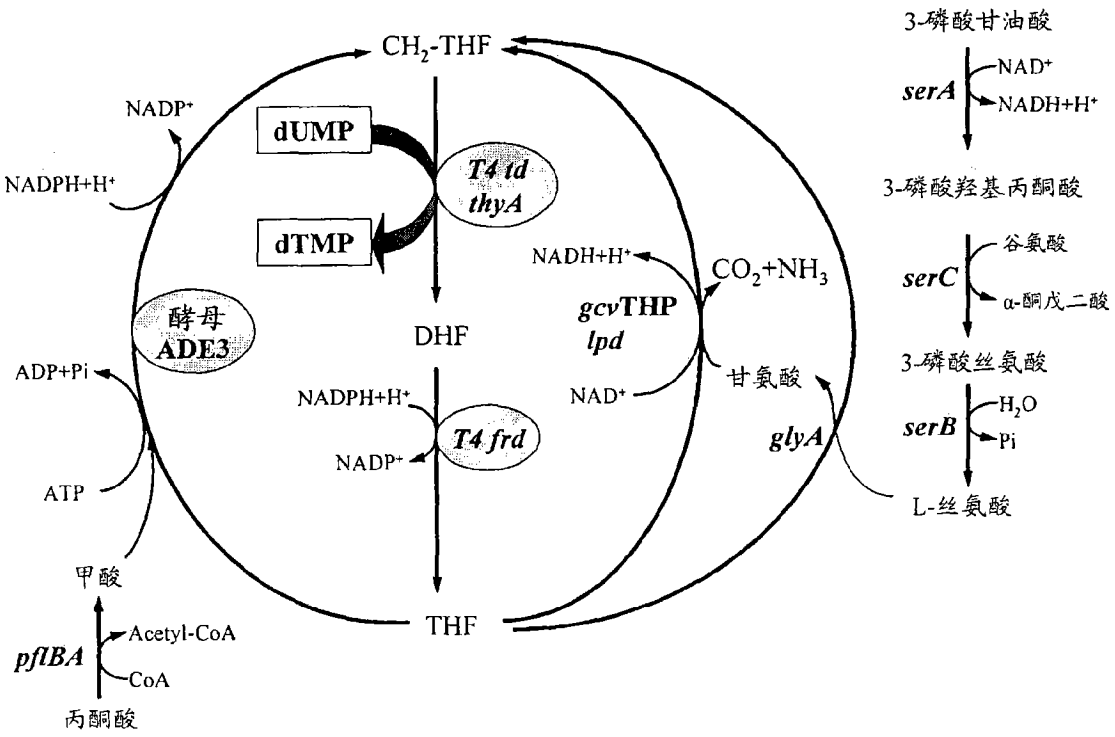


图 5 :改进 CH_2-THF 再生的遗传靶标

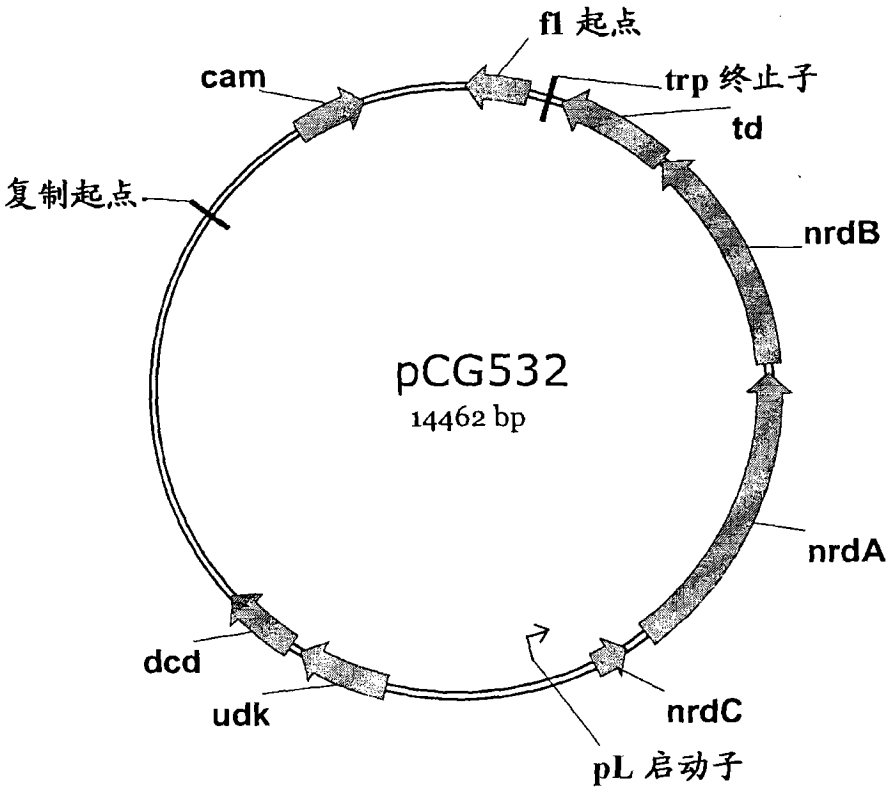

f1 起点
trp 终止子
td
nrdB
nrdA
nrdC
pL 启动子
udk
dcd
复制起点
cam
pCG532
14462 bp

图 6 :pCG532

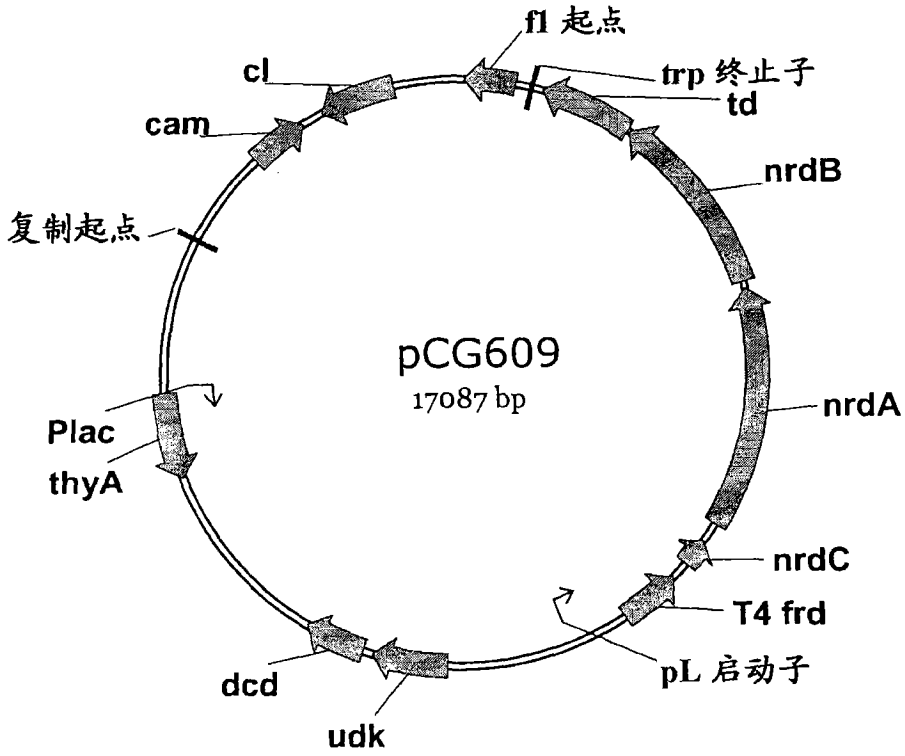


图 7 :pCG609

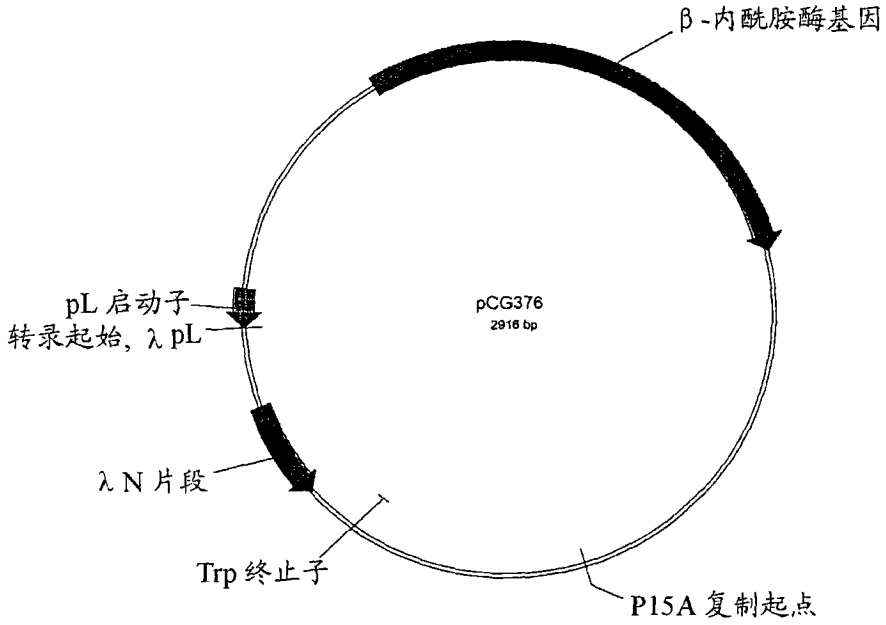


图 8 :pCG376

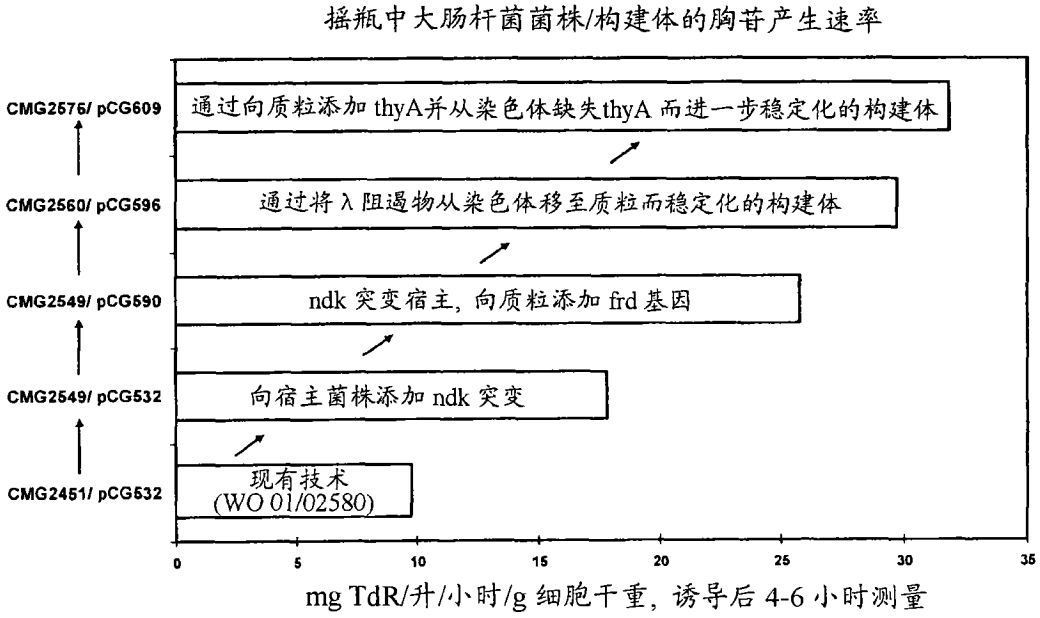


图 9 :各种菌株 / 构建体中的胸苷生产