

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97/3 2264

※申請日期：97.8.22

※IPC 分類：~~C12N~~

C12P19/56 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C12N 1/20 (2006.01)

用於產生蒽環黴素之生物轉形作用之基因改造株

C12R 1/465

GENETICALLY MODIFIED STRAINS FOR BIOTRANSFORMATIONS
IN ANTHRACYCLINE PRODUCTION

二、申請人：(共 2 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

1. 德商威西赫羅斯公司
W. C. HERAEUS GMBH
2. 芬蘭商伽利勒斯公司
GALILAEUS OY

代表人：(中文/英文)

1. 羅蘭德 傑諾
GERNER, ROLAND
沃夫 考克
KOCK, WULF
2. 克斯汀娜 伊利杭柯
YLIHONKO, KRISTIINA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

1. 德國哈紐市赫羅斯街12-14號
HERAEUSSTRASSE 12-14, 63450 HANAU, GERMANY
2. 芬蘭卡里娜市凱利卡門提10號
KAIRISKULMANTIE 10, 20781 KAARINA, FINLAND

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY
2. 芬蘭 FINLAND

三、發明人：(共 3 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 麥克 蘭伯特

LAMBERT, MICHAEL

2. 克斯汀娜 伊利杭柯

YLIHONKO, KRISTIINA

3. 瑪莉亞 宏貝克

HOLMBÄCK, MARIA

國 籍：(中文/英文)

1. 德國 GERMANY

2. 芬蘭 FINLAND

3. 芬蘭 FINLAND

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 歐洲專利機構；2007年08月24日；07016622.8

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

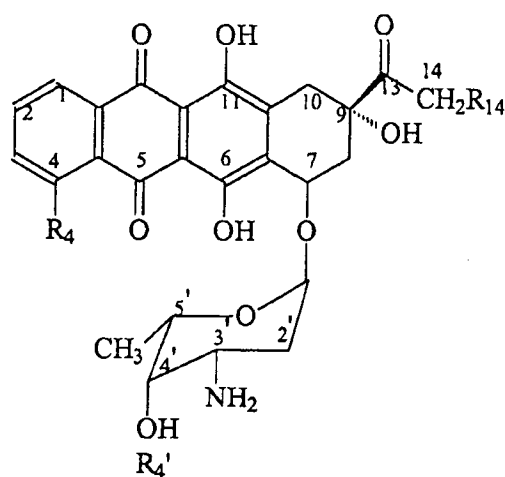
九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於經改良之微生物菌株，且係關於其在改良蒽環黴素抗腫瘤抗生素，尤其泛艾黴素(epirubicin)及艾達黴素(idarubicin)產量之生物轉形方法中之用途。

【先前技術】

道諾黴素類(Daunomycins)為由諸如波賽鏈黴菌(*S. peucetius*)、天蘭淡紅鏈黴菌(*S. coerulorubidus*)、灰色鏈黴菌(*S. griseus*)、鏈黴菌C5(*Streptomyces* sp. C5)、波賽鏈黴菌青灰變種(*S. peucetius* var. *caesius*)及二裂鏈黴菌(*S. bifurcus*)之若干鏈黴菌種(*Streptomyces* sp.)產生之一群抗腫瘤抗生素。該群之基本化合物為道諾黴素(DiMarco等人，1964)。道諾黴素可由通式I描述：



其最重要之衍生物如表1所示。

表 1

	R ₄	R ₁₄	其他	CAS No.
道諾紅菌素(Daunorubicin)	OCH ₃	H		20830-81-3
泛艾黴素	OCH ₃	OH	4'差向異構物	56420-45-2
表道諾紅菌素(Epidaunorubicin)	OCH ₃	H	4'差向異構物	56390-08-0
13-DHED	OCH ₃	H	4'差向異構物 R ₁₃ =OH	
艾達黴素	H	H		58957-92-9

道諾紅菌素、泛艾黴素及艾達黴素之半合成衍生物可歸類為非天然蒽環黴素抗生素，因為天然存在之菌株並不產生該等蒽環黴素。泛艾黴素在臨床上用於多種癌症。由於其與阿黴素(doxorubicin)競爭，故市場正在增長。新穎調配物、接合物及與其他癌症藥物之新穎組合亦擴大泛艾黴素之用途。泛艾黴素藉由以下方法製備，該方法包含藉由醱酵產生道諾紅菌素及合成改造苷元及糖部分，例如美國專利5,874,550中所揭示。

艾達黴素(4-脫甲氧基-道諾紅菌素)用於治療某些類型之癌症，包括白血病、淋巴瘤及其他骨髓疾病。據稱與阿黴素相比，其產生較小副作用。然而，可能由於其極高價格之故，艾達黴素之全球年度銷售不超過20 kg，該極高價格係歸因於極複雜之製造方法。艾達黴素酮(Idarubicinone)由藉由醱酵道諾紅菌素，隨後進行酸性水解獲得之道諾黴素酮(daunomycinone)開始製造。道諾紅菌素酮(Daunorubicinone)可進一步合成改造為艾達黴素酮。如(例如)美國專利第4,325,946號中所述，藉由複雜合成反應系列連接糖殘基(道諾胺(daunosamine))。

在發酵產生諸如道諾紅菌素及表道諾紅菌素之重要蔥環黴素過程中，中間物在發酵肉湯中積累。在兩種情況中之典型中間物均為 ϵ -羅多新酮(ϵ -rhodomycinone)(Strohl等人，1989)。然而，由於表道諾紅菌素可藉由使用基因改造菌株進行發酵產生，故13-二氫-表道諾紅菌素(稱為13-DHED)同時積累於發酵肉湯中。一般而言，認為該等代謝物為廢棄物。美國專利第5,652,125號揭示使用 ϵ -羅多新酮來產生道諾紅菌素，且Dickens等人(1997)已描述將13-二氫-蔥環黴素氧化為其13-酮形式。未曾發現描述非天然蔥環黴素方法中生物轉形作用之公開案。

吾人已發現藉由利用發酵產生道諾黴素及表道諾紅菌素中所獲得之副產物以較低成本獲得較高產量的商業上重要之非天然蔥環黴素泛艾黴素及艾達黴素之新穎方法。

【發明內容】

本發明係關於一種微生物菌株，其將蔥環黴素代謝物(諸如表道諾紅菌素、13-二氫表道諾紅菌素、4'-表-領地黴素(4'-epi-feudomycin)及 ϵ -羅多新酮)轉化為非天然蔥環黴素抗生素(諸如泛艾黴素及艾達黴素)。較佳地，該等菌株係選自鏈黴菌屬(*genera Streptomyces*)，更佳選自物種波賽鏈黴菌，且最佳選自亞種波賽鏈黴菌青灰變種。在本發明之一較佳實施例中，該菌株包含自物種黑胡桃鏈黴菌(*Streptomyces nogalater*)分離之異源抗性基因 $snorO$ 。

本發明亦係關於一種使用本發明之微生物菌株將蔥環黴素代謝物(13-二氫表道諾紅菌素及 ϵ -羅多新酮)轉化為非天

然蒽環黴素抗生素(諸如泛艾黴素及艾達黴素)之方法。在本發明之一較佳實施例中，在該方法中，在任何時間使用較佳選自由離子型及非離子型吸附劑組成之群，更佳選自聚苯乙烯，且最佳選自由XAD-7及Diaion HP-20組成之群之樹脂來吸附蒽環黴素代謝物或蒽環黴素抗生素。

【實施方式】

本發明係關於改良之鏈黴菌菌株，其能夠將改造之蒽環黴素中間物轉化為重要抗腫瘤蒽環黴素藥物艾達黴素及泛艾黴素。該菌株適用於將蒽環黴素代謝物轉化為最終產物之方法。

因此，本發明之一目的在於提供一種改良之鏈黴菌菌株，其經改造以能夠將4-脫氧- ϵ -羅多新酮以高比率穩定轉化為艾達黴素。阻斷產生道諾紅菌素之該菌株係來源於實例1中所述之菌株G001(DSM 12245)(菌株G001係由野生型波賽鏈黴菌青灰變種ATCC 27952突變誘發所衍生)。該來源於菌株G001之改良突變株能夠將4-脫氧- ϵ -羅多新酮轉化為艾達黴素，但重複性差。為改良轉化，將抗性基因引入該菌株中。

基因 *snorO* 係自黑胡桃鏈黴菌(ATCC 27952)分離，且提出該基因負責針對諾加拉黴素(nogalamycin)之抗性(Torkkell 2001)。基於序列分析，基因產物 *SnorO* 為產生抗性之多功能基因產物，其具有用於切除修復蛋白UvrA及ABC轉運體ATP-結合蛋白之域。*snorO*在青紫鏈黴菌(*S. lividans*)TK24中之異源表現顯示該基因保護該菌株免受所

有測試之不同蔥環黴素、諾加拉黴素、阿柔比星及道諾紅菌素影響。將基因 *snorO* 引入來源於 G001 之改良菌株提供新穎生物轉形菌株，其展現對艾達黴素之抗性增強。令人驚訝地，當 *snorO* 於大腸桿菌 (*E. coli*) 載體中引入來源於 G001 之改良菌株中時，其改良該轉化率且使該菌株穩定地維持該轉化在 $\pm 10\%$ 內，即使在六次連續培養的情況下。

該新穎生物轉形菌株可饋以天然蔥環黴素中間物(諸如阿克拉菌酮(*aklavinone*)及 ϵ -羅多新酮)，形成天然蔥環黴素道諾黴素。

令人驚訝地，該菌株能夠進行非天然代謝物之轉化，且饋以非天然 4-脫氧- ϵ -羅多新酮得以形成艾達黴素。此外，該菌株能夠將 13-DHED 轉化為表道諾紅菌素。呈現 ϵ -羅多新酮合成轉化為 4-脫氧- ϵ -羅多新酮。根據本發明，隨後 4-脫氧- ϵ -羅多新酮由上述新穎生物轉形菌株生物轉變為艾達黴素，其並不產生道諾黴素代謝物。13-DHED 進一步使用相同突變株藉由生物轉形作用轉化為表道諾紅菌素。

適用於本發明之生物轉形菌株之重要態樣為：

- i) 接受天然及非天然受質以供轉化；
- ii) 該菌株對於天然及非天然蔥環黴素具有增強之抗性；
- iii) 該菌株實現轉化所需之必需功能，及
- iv) 該菌株不積累可偵測量之天然道諾黴素。

可使用任何合適菌株來將 4-脫氧-半合成中間物生物轉形為艾達黴素。然而，菌株具有用於以下反應之內源性或所轉移可表現基因很關鍵：改造葡萄糖以形成道諾胺，

10-酯酶活性以移除甲基以及所關聯之10-脫羧酶活性，13-加氧酶及合適糖基轉移酶活性。此外，生物轉形作用之後的後續方法具有成本效益，除非在生物轉形作用中用作宿主之菌株不積累天然蔥環黴素代謝物或積累少量天然蔥環黴素代謝物。

有利地使用在道諾黴素生物合成早期阻斷之波賽鏈黴菌青灰變種突變株；較佳地，阻斷最小PKS之突變株(最小聚酮合成酶催化第一反應，蔥環黴素中之聚酮組裝及其他II型聚酮路徑)。

來源於上述野生型波賽鏈黴菌青灰變種ATCC 27952之新穎生物轉形菌株為高度較佳之菌株，但任何具有以下特徵之菌株適合於本發明之轉化方法。

1.阻斷道諾黴素之早期路徑。基於相應基因之補充實驗破壞最小PKS之*dpsG*基因(資料未展示)。

2.不產生可偵測量之道諾黴素，而在固體培養基上積累酸性黃色物質。該化合物之結構未知，但其並非蔥環黴素之成員。

3.在ISP4+tsr-及ISP2+tsr-平皿上，生物轉形菌株通常不形成孢子且形成無色氣生菌絲。

4.由於*snorO*之功能對若干不同蔥環黴素表現抗性。

5.將4-脫氧- ϵ -羅多新酮轉化為兩種主要產物：艾達黴素及13-二氫艾達黴素。發現少量某些其他艾達黴素代謝物。

本發明另外係關於一種藉由利用支路產物(醱酵產生道

諾黴素及表道諾黴素中所形成之 ϵ -羅多新酮及醱酵產生表道諾黴素中所形成之13-DHED)產生非天然蔥環黴素抗生素泛艾黴素及艾達黴素之方法。

因此本發明之另一目的在於提供一種使用本發明之經改良細菌宿主菌株藉助於生物轉形作用製備商業上有用之蔥環黴素抗生素之方法。較佳地，該宿主菌株為上述來源於鏈黴菌屬，較佳來源於波賽鏈黴菌青灰變種之新穎生物轉形菌株。

如(例如)美國專利第7,053,191號所述，在此項技術中已知艾達黴素酮可藉由複雜化學合成系列轉化為艾達黴素。在本發明之方法中，較佳使用將4-脫氧- ϵ -羅多新酮轉化為艾達黴素的細菌菌株之內源生物合成反應系列。已知生物合成以圖1所示之序列進行。將阿克拉菌酮(數種蔥環黴素之典型前驅體)11-羥基化以形成 ϵ -羅多新酮，將 ϵ -羅多新酮糖基化。位置10上之改造需要糖基化形式，儘管其他糖殘基，諸如羅多胺(rhodamine)為接受之受質。10-改造之後，進行13-氧合作用且道諾黴素生物合成之最終步驟為C-4處之O-甲基化。令人驚訝地，即使為4-脫氧形式，最終10-及13-改造以及糖基化仍獲得成功。使用合適生物轉形菌株使4-脫氧阿克拉菌酮與4-脫氧- ϵ -羅多新酮均轉化為艾達黴素。然而，該等改造之基因產物需要以下受質，其中C-10處之取代基為COOCH₃-基團。

將作為支路產物藉由道諾黴素代謝物之醱酵方法獲得之 ϵ -羅多新酮藉由合成化學加工為4-脫氧- ϵ -羅多新酮。各種

合成路徑可能自 ϵ -羅多新酮之位置4移除羥基。然而，吾人優選藉由經縮酮化保護C7及C9羥基開始進行四個反應系列。此後，進行C4處之OH基團之三苯甲基化，繼而還原以移除C4處之取代基。各步驟之後，藉由沈澱/結晶分離或純化產物，且獲得>20%，較佳>30%，最佳>40%之總體產率。該方法中所獲得之4-脫氧- ϵ -羅多新酮之純度為>60%，較佳>80%，最佳>90%，為用於生物轉形作用之合適受質。

ϵ -羅多新酮通常在醱酵肉湯中大量積累且藉由習知方法純化獲得成功。 ϵ -羅多新酮之合成轉化提供>20%，較佳>30%，最佳>40%之純4-脫氧- ϵ -羅多新酮，將其饋至波賽鏈黴菌青灰變種之非產生突變株。4-脫氧- ϵ -羅多新酮生物轉形為艾達黴素之效率>20%，較佳>30%，最佳>40%。可將超過100 mg之半合成中間物饋至一公升生物轉形菌株培養物中。饋入中間物之時間並不重要。可使用任何允許鏈黴菌生長及次級代謝之醱酵條件，然而使用E1培養基，且溫度範圍為25-35°C，pH值介於6至8之間為有利的。

自培養物回收艾達黴素可以任何合適方法(諸如離心、過濾)或藉由合適離子型或非離子型吸附劑進行。為嵌入艾達黴素，可使用任何水溶性有機溶劑，其中酸性醇較佳。使用酸性萃取移除苷元，之後，以高pH值將糖苷自水相反萃取至氯仿相中。視化合物在蒸發最終萃取物之後的概況而定，最終將艾達黴素藉由結晶或較佳藉由層析及結晶來純化。使用二氧化矽管柱純化為有利的。

使 13-DHED 轉化為表道諾紅菌素

眾所周知 13-二氫-蔥環黴素與 13-酮基形式一起積累於發酵肉湯中。然而，13-DHED 在商業上並不有用，且基於其細胞毒性性質，其應作為毒性廢棄物處理。出乎意外地，儘管該代謝物不為天然代謝物，但其藉由生物轉形菌株以適用比率（例如 >20%，較佳 >30%，最佳 >40%）轉化為表道諾紅菌素。

表道諾紅菌素發酵中之副產物 13-DHED 易於藉由層析繼而結晶與糖苷部分分離，同時分離表道諾紅菌素。可將 13-DHED 吸附至添加至（且尤其在後期步驟）具有道諾黴素合成能力之鏈黴菌菌株培養肉湯中的樹脂上。儘管任何菌株均合適，但使用早期生物合成路徑阻斷且不能積累道諾黴素代謝物之菌株為有利的。

在本發明之一較佳實施例中，將來源於鏈黴菌屬，較佳來源於波賽鏈黴菌青灰變種之新穎生物轉形菌株用於生物轉形作用將 13-DHED 轉化為表道諾紅菌素。

在根據本發明產生表道諾黴素所述之條件下轉化率為 >20%，較佳 >30%，最佳 >40%。以此方式獲得之表道諾紅菌素可藉由任何用於蔥環黴素回收之習知方法由結合於樹脂之其他代謝物純化，但較佳使用層析法且尤其逆相層析法提供適當純化之表道諾紅菌素用於合成。

表道諾紅菌素轉化為泛艾黴素

使用粗表道諾紅菌素（純度 >60%，較佳 >80%，最佳 >90%）作為合成化學之起始物質，以獲得泛艾黴素，其為

常用之癌症藥物。任何合成或生物催化反應系列可用於14-羥基化。

表道諾紅菌素轉化為其14-羥基化形式泛艾黴素有幾種可能性。僅內源基因產物14-羥化酶在培養條件下並不具有足夠活性來將所有形成之表道諾紅菌素轉化為泛艾黴素，儘管在培養肉湯中發現少量泛艾黴素。根據吾等實驗(資料未展示)，即使高複本數之14-羥化酶基因，仍不能完成泛艾黴素產生之過程。然而，兩個美國專利美國5,955,319及美國6,210,930揭示藉由*doxA*之基因產物低量道諾紅菌素轉化為阿黴素。顯然，該生物轉化高度依賴於條件，吾人未能成功重複該方法。

類似於自道諾紅菌素合成阿黴素，一個羥基加入完整表道諾紅菌素之C-14有各種可能性。

在由合成混合物萃取泛艾黴素之後，泛艾黴素之純化係藉由層析及/或藉由結晶來進行。然而，為達成活性藥物成份所要求之品質，層析分離必需提供>97%純度之泛艾黴素。

以下實例給予本發明之更詳細描述。

對於熟習此項技術者顯而易見，隨著技術進步，本發明構思可以多種方式實施。本發明及其實施例並不限於下文所述之實例，而且可在申請專利範圍範疇內變化。

圖1a 揭示道諾紅菌素之生物合成路徑。巴龍黴素(Baumycin)係由道諾紅菌素形成。該生物合成路徑分化為(i)阿黴素及(ii)道諾紅菌素之後巴龍黴素。

該等步驟在圖中未展示。

圖 1b 揭示用於圖 1a 中 C-7-糖基化之 dTDP-道諾胺之生物合成路徑。

圖 2 揭示生物轉形方法之流程。

圖 3 揭示展示生物轉形菌株在饋以 4-脫氧- ϵ -羅多新酮之後之產生概況之層析圖。

實例

實例 1 生物轉形菌株之建構

將藉由突變誘發來源於野生型波賽鏈黴菌青灰變種 ATCC 27952 之突變誘發菌株 G001 在 250 ml 錐形瓶中之 50 ml TSB-培養基中培養。所有用於突變誘發之燒瓶在燒瓶底部含有線以在培養期間傳播菌絲。在 30°C 下且在震盪器中以 330 rpm 進行培養兩日。將 1 ml 培養物進一步接種於含有 50 ml TSB 之後續瓶中且繼續培養一日 (30°C, 330 rpm)。將該較年輕之培養物以 NaOH 調整為鹼性 pH 值且添加 NTG 以在 >30°C 下作用於細胞 20 分鐘。將該菌株之經突變誘發培養物分為兩管，且藉由離心 (300 rpm, 10 分鐘) 糝粒化。使用經組合糝粒接種 50 ml TSB 培養基。一日 (30°C, 330 rpm) 之後，藉由將合適稀釋液 (亦即 1:10-1:100000) 塗鋪於 ISP4-平皿上來測定細胞懸浮液之滴定度。將經突變誘發培養物菌落與野生型相比較且選擇彼等展現與野生型不同之特徵之菌落用於進一步表徵。

在 ISP4 瓊脂平皿上基於深紅色著色野生型中之淺色選擇出突變體。

將基因 *snorO* (Torkkell, 2001) 以大腸桿菌載體 pCNB3033 引入突變體中。提出利用 attP 位點進行整合。如實例 5 中所詳述，所獲得之經改良生物轉形菌株提供將 >20%，較佳 >30%，最佳 >40% 之所饋入 4-脫氧- ϵ -羅多新酮轉化為艾達黴素代謝物之重複轉化率。

實例 2 培養生物轉形菌株以用於產生蔥環黴素代謝物及用於生物轉形作用

將如實例 1 中所述選擇之合適突變體在 50 ml 補充有吸附樹脂 (15 g/l) 之 E1 培養基中培養。(E1：每公升自來水：葡萄糖 20 g；可溶性澱粉 20 g；肽 5 g；酵母萃取物 2.5 g； $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.3 g； $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g；NaCl 3 g； $CaCO_3$ 3 g；pH 值 7-7.5)。

為測定蔥環黴素代謝物，在培育第十日萃取化合物。為進行分析，將吸附樹脂以水自一培養燒瓶傾析且將經洗滌樹脂以 40 ml 酸性乙醇萃取，震盪至少 30 min。使用 HPLC 分析樣品。已知在 E1 培養基中使用吸附樹脂在該等條件下增加蔥環黴素代謝物產生。

在吸附樹脂存在的情況下，在培養結束時未發現菌落形態變化。

在突變株培養肉湯中未偵測到蔥環黴素代謝物產生。

然而，突變株具有根據圖 1 之生物合成路徑用於糖基化及苷元改造之功能性生物合成基因且其由進料實驗示範。將天然苷元 ϵ -羅多新酮及阿克拉菌酮饋給突變株 (每 1 公升培養肉湯至少 100 mg 苷元) 且所饋入苷元在 2 日內轉化為道

諾黴素代謝物。然而，對突變株饋以4-脫氧- ϵ -羅多新酮未能提供艾達黴素代謝物之重複轉化。提出失敗原因係由對所饋入或所形成之產物的不良抗性所致。

如所預期，經改良生物轉形菌株能夠轉化天然苷元 ϵ -羅多新酮及阿克拉菌酮。如下文實例4中所述，其亦將非天然類似生物合成中間物4-脫氧- ϵ -羅多新酮及13-DHED轉化為艾達黴素及表道諾紅菌素。

實例3 使 ϵ -羅多新酮合成轉化為4-脫氧- ϵ -羅多新酮

對於合成4-脫氧- ϵ -羅多新酮使用具有>60%，較佳>80%，最佳>90%層析純度之經純化 ϵ -羅多新酮。4-脫氧- ϵ -羅多新酮之合成由四個步驟組成：A)保護，B)三苯甲基化，C)還原及D)去保護。

在各步驟之後，將產物藉由沈澱/自氯仿-甲醇混合物中結晶分離。以TLC監測合成反應。

A)保護

將 ϵ -羅多新酮在室溫下溶解於氯仿中。將2當量2-甲氧基丙烯添加至混合物中繼而添加1當量TMSCI。反應之後繼而進行TLC。當如TCL板上所偵測反應完成時，使混合物冷卻且將沈澱物收集及乾燥用於下一步驟。

B)三苯甲基化

將來自保護步驟之起始物質溶解於氯仿中。添加NMP(N-甲基吡咯啉酮)及二-異丙基乙基胺(DIPEA)且最後添加PhNTf₂。以TLC監測反應。藉由向混合物中添加水及檸檬酸使化合物沈澱。將沈澱物過濾且以KHSO₄洗滌。將

晶體過濾且在真空下乾燥。

C) 還原

將來自三苯甲基化之物質在氫氣下懸浮於ACN中。添加(Ph₃P)₄Ph繼而添加(乙基)₃N及HCOOH。將反應混合物加熱且反應之後繼而進行TLC。1 h之後反應完成。將反應混合物冷卻且濾出產物。

D) 去保護

將來自還原之產物溶解於氯仿中且在室溫下添加1當量TsOH×H₂O。反應在0.5 h內進行。將溶液以1 M NaHCO₃洗滌，以MgSO₄乾燥且蒸發至乾燥。

4-脫氧-ε-羅多新酮純化

將去保護反應混合物(CHCl₃/TsOH × H₂O)以氯仿稀釋且以1 M NaHCO₃洗滌。將氯仿部分以無水MgSO₄乾燥，過濾且蒸發至乾燥。自氯仿-甲醇進行結晶。將晶體過濾且在真空下乾燥。

實例4 自來源於波賽鏈黴菌青灰變種之產生表道諾紅菌素之突變株的培養肉湯中回收13-DHED

用於產生表道諾紅菌素之醱酵肉湯以以下次序含有三種主要代謝物：表道諾紅菌素、13-DHED及表-領地黴素(參考epi專利申請案)。將吸附於樹脂上之取代物自獲自醱酵之20公升培養肉湯傾析。將樹脂藉由水洗滌以移除細胞碎片。將糰粒以乙醇萃取一至五次。藉由向經組合乙醇萃取物中添加氯仿以氯仿萃取苷元。分離溶劑及水層。以微鹼性pH值將水相中之糖苷萃取至氯仿中且以飽和NaHCO₃穩

定pH值。藉由以水洗滌移除鹽。最終，將氯仿相經由筒式過濾器過濾。

進行矽膠層析法以分離代謝物。將經過濾之氯仿泵入二氧化矽管柱且使用氯仿-甲醇溶液作為移動相藉由層析法純化。收集三種代謝物各自之純溶離份，且彙集各產物之溶離份以供結晶。將13-DHED之溶離份藉由乙醇-水溶液結晶。將晶體過濾且吸附於吸附樹脂。

實例5 使4-脫氧- ϵ -羅多新酮及相關代謝物生物合成轉化為艾達黴素

藉由將生物轉形菌株在兩個具有400 ml E1培養基之燒瓶中培養三日來製備菌種培養物。將培養物組合且使用800 ml培養肉湯接種20公升補充有XAD-7之E1培養基。以20公升體積，在30°C之溫度，350 rpm下且以10 l/min通氣進行發酵8日。pH值須保持微酸性，此確保所饋入4-脫氧- ϵ -羅多新酮更穩定轉化為艾達黴素。自接種之後24小時開始，以於EtOH中之至少5 mg/ml 4-脫氧- ϵ -羅多新酮將4-脫氧- ϵ -羅多新酮連續饋入4日。所饋入4-脫氧- ϵ -羅多新酮之量為至少100 mg/l。

在以突變株生物轉形期間，自所饋入4-脫氧- ϵ -羅多新酮產生兩種主要次級代謝物：亦即艾達黴素及13-二氫-艾達黴素。其他次要代謝物為艾達黴素酮、13-二氫艾達黴素酮、巴龍黴素及13-脫氧-艾達黴素及其苷元。艾達黴素之穩定滴定度為>20 mg/L，此外產生>20 mg/L之先前中間物13-DHI；因此總量>40 mg/L。巴龍黴素可藉由在酸性條件

下加熱(+45℃，1小時)水解為艾達黴素。

自生物轉形菌株獲得之產物的層析圖展示於圖3中。

實例6 使13-DHED生物合成轉化為表道諾紅菌素

如實例5中所詳述，進行生物轉形菌株之預培養。

一日之後將吸附於樹脂之相當於至少50 mg/l培養肉湯之13-DHED添加至培養物中且繼續培養四日。在含有50 ml E1培養基之燒瓶中，在34℃下，以300 rpm進行發酵。

根據層析分析，50%之13-DHED轉化為表道諾紅菌素。偵測到少量(介於<10%之範圍內)泛艾黴素。

實例7 苷元及蔥環黴素之分析量測

TLC

1. 0.5 MQ-水
2. 0.1 HCOOH
3. 25 MeOH
4. 75 CHCl₃，與溶液1、2及3小心混合

HPLC

設備：屬於1100系列之具有二極體陣列偵測器之Hewlett-Packard層析設備。

管柱：Zorbax，SB-C8，Agilent，4.6×150 mm×3.5 μm

所用溶劑：0.05 % TFA及1:1 MeCN-四氫呋喃

管柱溫度：30℃

流速：1 ml/min

偵測：254±8 nm，參考波長600 nm±50 nm

注射體積：5 μl

壓力：最小20巴，最大300巴

所用參數：

時間(min)	0.05% TFA之量的百分比	MeCN-THF之量的百分比
0	76.0	24.0
0.1	76.0	24.0
13.0	32.0	68.0
16.0	1.0	99.0
19.0	1.0	99.0
20.0	76.0	24.0
24.0	76.0	24.0

參考文獻清單

Dickens M, Priestley N及 Strohl W: *In vivo and in vitro bioconversion of ϵ -rhodomycinone glycoside to doxorubicin: Function of DauP, DauK, and DoxA*. (1997) J. Bacteriol. 179: 2641-2650。

Di Marco A, Silvestrini R, Gaetani M, Soldati M, Orezzi P, Dasdia T, Scarpinato BM, Valentini L: '*daunomycin*', a new antibiotic of the rhodomycin group. (1964) Nature 15: 706-707。

Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM及 Schrempf H: *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*. (1985) John Innes Foundation, Norwich。

Sambrook J, Fritsch EF及 Maniatis T: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY。

Strohl W.R, Bartel P, Connors NC, Zhu C, Dosch D, Beale JM, Floss HG, Stuzman-Engwall K, Otten SL 及 Hutchinson CR: *Biosynthesis of natural and hybrid polyketides by anthracycline-producing streptomycetes* .

(1989) 第 68-84 頁 , C.L. Hershberger, SW Queener 及 G Hegeman(編) Genetics and molecular biology of industrial micro-organisms. American Society for Microbiology, Washington, D.C .

Torkkell S, Kunnari T, Palmu K, Mäntsälä P, Hakala J 及 Ylihonko K: *The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of Streptomyces nogalater: characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures* .

(2001) Molecular Genetics and Genomics 266:276-288 .

Torkkell S: *Anthracycline antibiotics: Biosynthetic pathway and molecular genetics of nogalamycin, a product of Streptomyces nogalater* .

(2001) Publications in Annales Universitatis Turkuensis-series nr: 275 .

【圖式簡單說明】

圖 1 為 蔥 環 黴 素 之 道 諾 黴 素 類 別 之 生 物 合 成 路 徑 的 示 意 圖 。

圖 2 為 根 據 本 發 明 產 生 泛 艾 黴 素 及 艾 達 黴 素 之 方 法 的 示 意 圖 。

圖 3 為 展 示 本 發 明 之 生 物 轉 形 菌 株 在 饋 以 4-脫 氧 - ϵ -羅 多

新酮之後的產生概況之層析圖。Rt=6.0：13-二氫-艾達黴素，Rt=6.9：艾達黴素，Rt=8.1：13-脫氧-艾達黴素，Rt=11.0：4-脫氧- ϵ -羅多新酮。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種微生物菌株，其將蒽環黴素 (anthracycline) 代謝物轉化為非天然蒽環黴素抗生素。

本發明提供一種使用微生物菌株將蒽環黴素代謝物轉化為蒽環黴素抗生素之方法。

六、英文發明摘要：

A microbial strain which converts anthracycline metabolites into non-natural anthracycline antibiotics.

A process for converting anthracycline metabolites into anthracycline antibiotics using a microbial strain.

十、申請專利範圍：

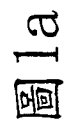
1. 一種微生物菌株，其將蒽環黴素(anthracycline)代謝物轉化為非天然蒽環黴素抗生素。
2. 如請求項1之菌株，其中該等蒽環黴素代謝物係選自由表道諾紅菌素(epidaunorubicin)、13-二氫表道諾紅菌素、4'-表-領地黴素(4'-epi-feudomycin)及 ϵ -羅多新酮(ϵ -rhodomycinone)組成之群。
3. 如請求項1至2中任一項之菌株，其中該等非天然蒽環黴素抗生素係選自由泛艾黴素(epirubicin)及艾達黴素(idarubicin)組成之群。
4. 如請求項1之菌株，其中該菌株係選自鏈黴菌屬(genera *Streptomyces*)。
5. 如請求項4之菌株，其中該菌株較佳選自菌種波賽鏈黴菌(*Streptomyces peucetius*)。
6. 如請求項5之菌株，其中該菌株更佳選自亞種波賽鏈黴菌青灰變種(*Streptomyces peucetius* var. *caesius*)。
7. 如請求項1之菌株，其包含異源抗性基因 *snrO*。
8. 如請求項7之菌株，其中該基因係自鏈黴菌屬分離。
9. 如請求項8之菌株，其中該基因較佳自菌種黑胡桃鏈黴菌(*Streptomyces nogalater*)分離。
10. 如請求項1之菌株，其中該菌株提供>20%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化率。
11. 如請求項10之菌株，其中該菌株提供較佳>30%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化

率。

12. 如請求項11之菌株，其中該菌株提供最佳>40%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化率。
13. 一種使用微生物菌株將蒽環黴素代謝物轉化為蒽環黴素抗生素之方法。
14. 如請求項13之方法，其中該等蒽環黴素代謝物係選自由表道諾紅菌素、13-二氫表道諾紅菌素、4'-表-領地黴素及 ϵ -羅多新酮組成之群。
15. 如請求項13至14中任一項之方法，其中該等蒽環黴素抗生素係選自由泛艾黴素及艾達黴素組成之群。
16. 如請求項13之方法，其中該菌株係選自鏈黴菌屬。
17. 如請求項16之方法，其中該菌株較佳選自波賽鏈黴菌種。
18. 如請求項17之方法，其中該菌株更佳選自亞種波賽鏈黴菌青灰變種。
19. 如請求項13之方法，其中該菌株係經基因改造。
20. 如請求項13之方法，其中該菌株提供>20%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化率。
21. 如請求項20之方法，其中該方法提供較佳>30%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化率。
22. 如請求項21之方法，其中該菌株提供最佳>40%之該等蒽環黴素代謝物轉化為該等非天然蒽環黴素抗生素之轉化

率。

23. 如請求項13之方法，其中用於生物轉形作用之粗蒽環黴素代謝物之純度為>60%。
24. 如請求項23之方法，其中用於生物轉形作用之粗蒽環黴素代謝物之純度較佳為>80%。
25. 如請求項24之方法，其中用於生物轉形作用之粗蒽環黴素代謝物之純度最佳為>90%。
26. 如請求項13之方法，其中在任何時間使用樹脂來吸附該等蒽環黴素代謝物或蒽環黴素抗生素。
27. 如請求項26之方法，其中該樹脂係選自由離子型及非離子型吸附劑組成之群。
28. 如請求項27之方法，其中該樹脂係選自聚苯乙烯之群。
29. 如請求項28之方法，其中該樹脂係選自由XAD-7及Diaion HP-20組成之群。
30. 如請求項26之方法，其中該樹脂係以1-100 g/l之量添加。
31. 如請求項30之方法，其中該樹脂較佳以10-50 g/l之量添加。
32. 如請求項31之方法，其中該樹脂最佳以15-30 g/l之量添加。
33. 一種表道諾紅菌素、13-二氫表道諾紅菌素、4'-表-領地黴素或 ϵ -羅多新酮之用途，其係使用微生物菌株轉化為蒽環黴素抗生素。



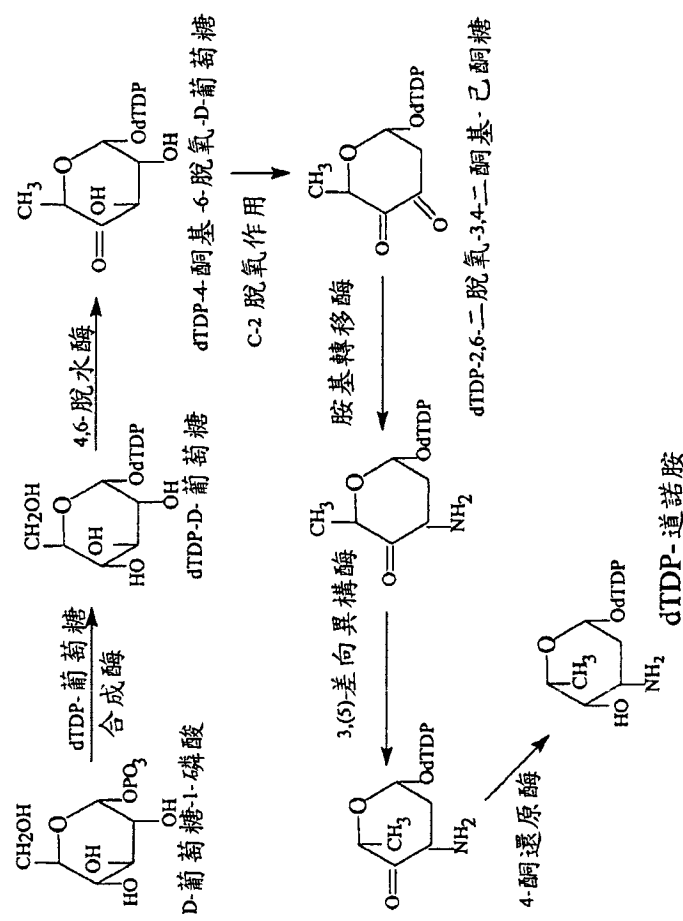


圖1b

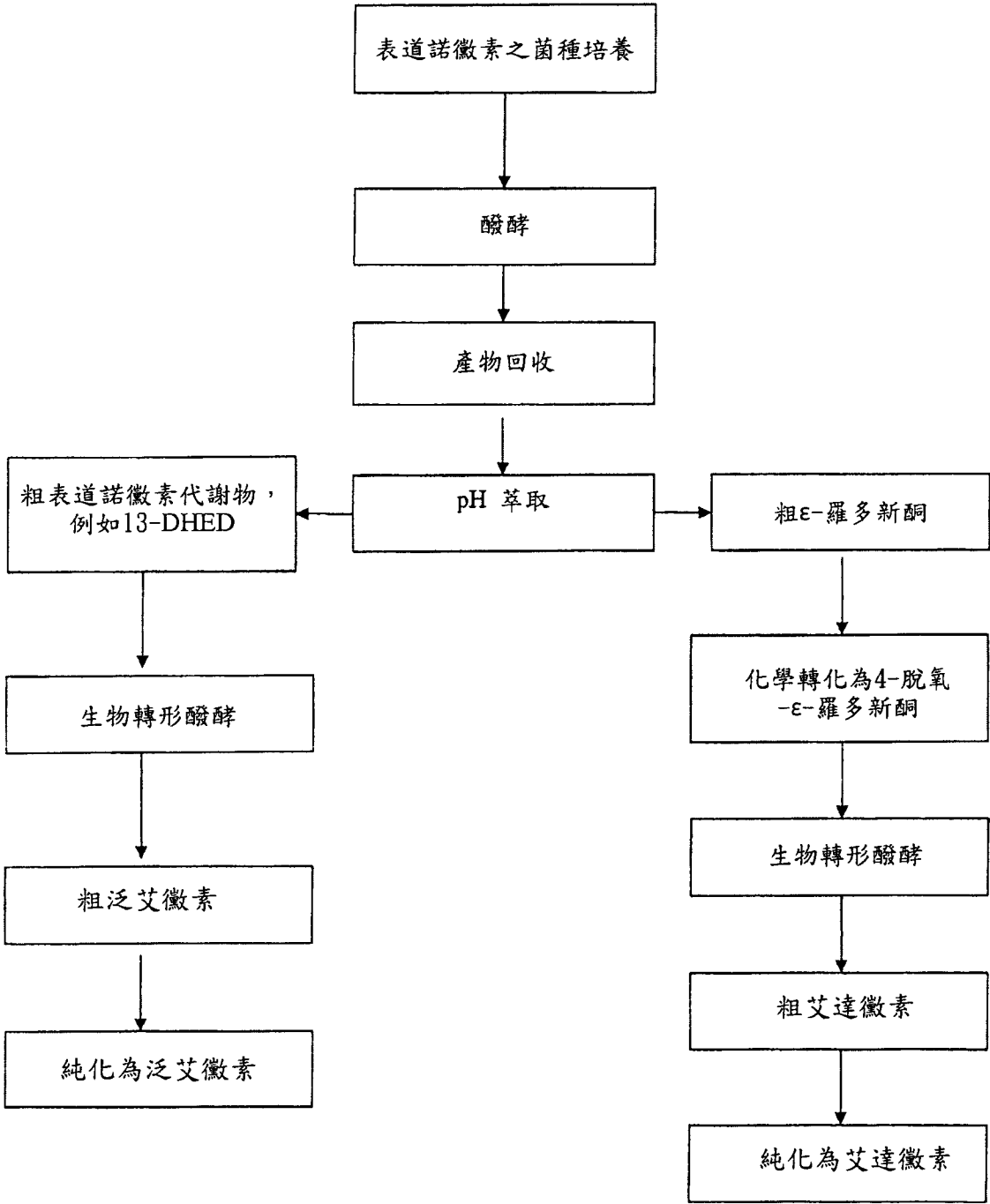
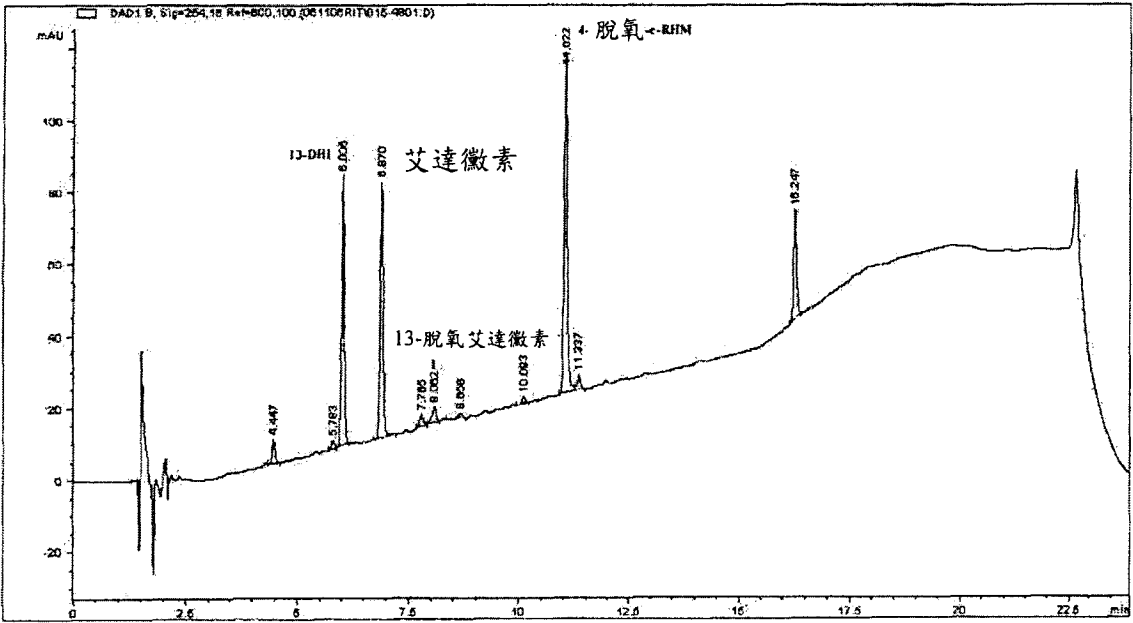


圖2



生物轉形菌株之產生概況:

Rt = 6.0: 13-DHI, Rt = 6.9: IDA, Rt = 8.1: 13-脫氧 -IDA, Rt = 11.0: 4- 脫氧 -ε-RHM.

圖3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(2)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

