

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 17/02

C12N 1/00

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95101242.8

[45] 授权公告日 2001 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1061097C

[22] 申请日 1995.1.13 [24] 颁证日 2000.10.21

[21] 申请号 95101242.8

[30] 优先权

[32] 1994.1.13 [33] US [31] 181,633

[73] 专利权人 布里斯托尔 - 迈尔斯斯奎布公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 R·L·汉森 R·N·帕特尔

L·J·施扎卡

[56] 参考文献

WO9318018A 1993. 9. 16 C07D305/14

审查员 侯 曜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜 王景朝

权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 将 C-7 糖转化为 C-7 羟基紫杉烷类的
酶催化水解方法

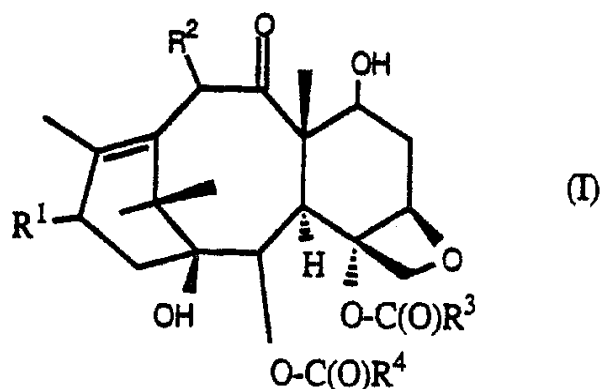
[57] 摘要

一种酶催化水解方法,其中将一种或多种带有 C-7
糖,优选带有 C-7 木糖基的紫杉烷类化合物(taxanes)
与一种能够将所述糖基水解为羟基的酶或微生物接触。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 用于制备至少一种含有直接键合在 C-7 位的羟基的紫杉烷的方法，该方法包含下列步骤：使至少一种含有直接键合在 C-7 位的糖基的紫杉烷与能够催化所述糖基水解为羟基的水解反应的酶或微生物接触，并进行所述水解反应。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述糖基为木糖基。
3. 权利要求 1 的方法，其中制备了至少一种带有 C-7 羟基的下列式 I 的紫杉烷：



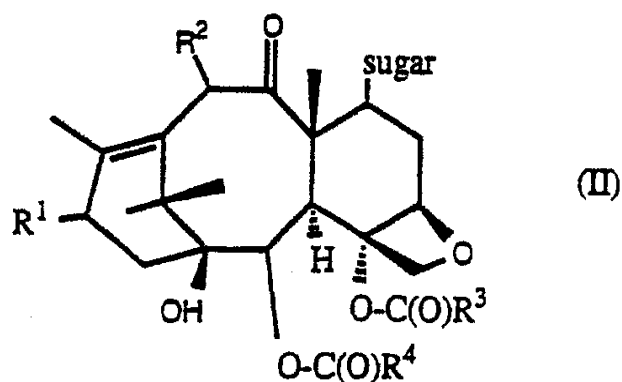
其中

R^1 为羟基或酰氧基；

R^2 为酰氧基或羟基；和

R^3 和 R^4 独立地为氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环基；

其制备是通过将至少一种下列式 II 的带有 C-7 糖的紫杉烷与能够催化将所述 C-7 糖基水解为羟基的水解反应的酶或微生物接触，



其中

R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 如上所定义，并且“糖基”为直接键合在C-7位的糖基。

4. 权利要求3的方法，其中所述糖基为木糖基。
5. 权利要求4的方法，其中所述式II的紫杉烷为7-木糖基紫杉醇、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、7-木糖基浆果赤霉素III、7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素III、7-木糖基cephalomannine、7-木糖基-10-脱乙酰基cephalomannine、7-木糖基紫杉醇C、和/或7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇C、并且所述式I的紫杉烷为paclitaxel、10-脱乙酰基紫杉醇、浆果赤霉素III、10-脱乙酰基浆果赤霉素III、cephalomannine、10-脱乙酰基cephalomannine、紫杉醇C和/或10-脱乙酰基紫杉醇C。
6. 权利要求2的方法，其中在所述水解方法中使用的带有木糖基的紫杉烷起始原料包括带有木糖基的紫杉烷类化合物的混合物。
7. 权利要求6的方法，其中所述紫杉烷类化合物的混合物是通过植物组织的植物细胞培养物，和/或由植物组织萃取得到的，其中所述植物为紫杉属之一。
8. 权利要求1的方法，其中使用了在下列各属之一范围内的微生物：黄杆菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属、梭菌属、脱硫肠状菌属、芽孢八叠球菌属、颤螺菌属、动性

球菌属、乳杆菌属、库特氏菌属、微球菌属、口腔球菌属 (Stomatococcus)、葡萄球菌属、节杆菌属、奈瑟氏球菌属或 Kingella。

9. 权利要求 8 的方法，其中所用的微生物在下列各属范围内：黄杆菌属、莫拉氏菌属、微球菌属或芽孢杆菌属。
10. 权利要求 1 的方法，其中所述酶衍生自在下列各属之一范围内的微生物：黄杆菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属、梭菌属、脱硫肠状菌属、芽孢八叠球菌属、颤螺菌属、动性球菌属、乳杆菌属、库特氏菌属、微球菌属、口腔球菌属 (Stomatococcus)、葡萄球菌属、节杆菌属、奈瑟氏球菌属或 Kingella。
11. 权利要求 10 的方法，其中所述酶衍生自在下列各属范围内的微生物：黄杆菌属、莫拉氏菌属、微球菌属或芽孢杆菌属。
12. 权利要求 1 的方法，其中所得紫杉烷产物为 paclitaxel，或为随后转化为 paclitaxel 的紫杉烷。
13. 用于选择能够酶催化水解起始的带有 C-7 糖的紫杉烷以形成相应的带有 C-7 羟基的紫杉烷的微生物的方法，该方法包含下列步骤：
 - (i) 选择能够支持待筛选的微生物的生长的菌种生长培养基；
 - (ii) 选择一种指示剂糖苷；
 - (iii) 使微生物与步骤(i)的菌种生长培养基接触，以便使微生物进行生长，并使上述物质与步骤(ii)的指示剂糖苷接触；
 - (iv) 在指示剂糖苷的存在下，观察微生物，以确定是否存在水解反应；和
 - (v) 检验微生物以确定所述带有 C-7 糖的紫杉烷的水解反应。

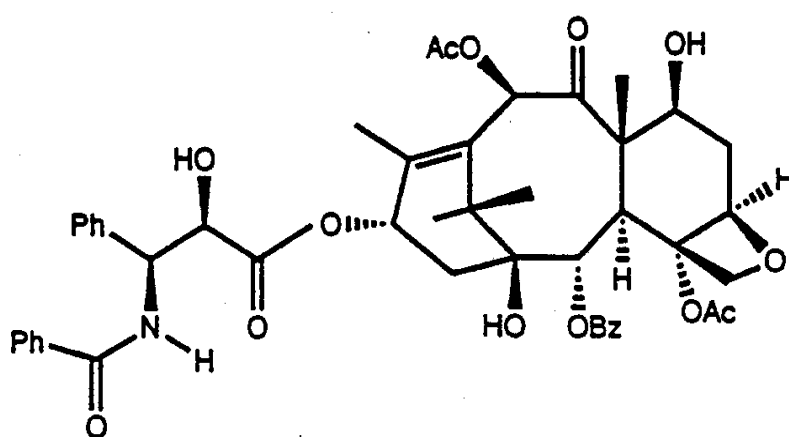
14. 权利要求 1 的方法, 其中(i)按照所述方法制得的紫杉烷产品是带有 C-13 酰氧基侧链的紫杉烷, 或(ii)按照所述方法制得的紫杉烷产品是用于合成带有 C-13 酰氧基侧链的紫杉烷的中间体, 并且所述方法包含将所述中间体转化为带有 C-13 酰氧基侧链的紫杉烷的进一步的步骤。
15. 权利要求 5 的方法, 其中所述式 (I) 的紫杉烷是至少一种选自 paclitaxel、浆果赤霉素 III、10-脱乙酰基浆果赤霉素 III 和 cephalomannine 的紫杉烷。

说明书

将 C-7 糖转化为 C-7 羟基 紫杉烷类的酶催化水解方法

本发明涉及用于将带 C-7 糖的，尤其是带 C-7 木糖基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 转化为带 C-7 羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的酶催化水解方法。所述产品化合物可以是具有药理活性的紫杉烷类化合物 (taxanes)，例如 paclitaxel 和 paclitaxel 的类似物，或者可以是用作为在这些具有药理活性的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的制备中的中间体的化合物。

紫杉烷类化合物 (taxanes) 是在药学领域中具有效用的双萜化合物。例如 paclitaxel (Taxol®)，即下式结构的紫杉烷 (taxane)，已被发现是一种有效的抗癌药剂：



其中 Ph 为苯基，Ac 为乙酰基且 Bz 为苯甲酰基。

天然存在的紫杉烷类化合物 (taxanes) 例如 paclitaxel 可在植物材料中发现, 并已由其中分离出来。然而, 这类紫杉烷类化合物 (taxanes) 可能以相对少的量存在于植物材料中, 所以, 对于 paclitaxel 来讲, 可能需要例如大量的构成该化合物来源的生长缓慢的紫杉属树木。因此, 本领域技术人员继续寻找用于制备天然存在的紫杉烷类化合物 (taxanes) 例如 paclitaxel, 以及用于制备其人工合成的类似物的合成途径, 包括半合成途径。

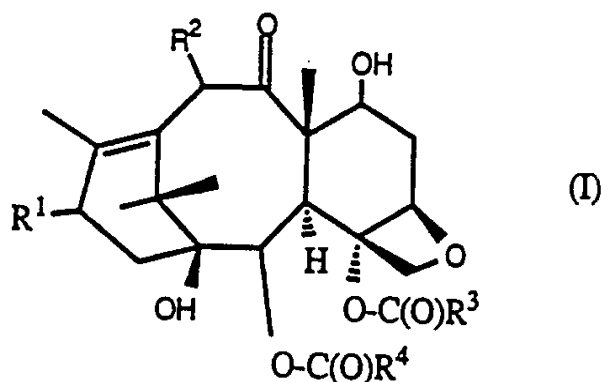
具有在 C-7 位的羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes), 不论作为药理活性最终产品 (例如 paclitaxel) 还是作为用于半合成制备这类药理活性最终产品的中间体 (例如浆果赤霉素 III 和 10-脱乙酰基浆果赤霉素 III) 均特别令人感兴趣。但是, 紫杉烷类化合物 (taxanes) 可以例如通过萃取植物材料而获得, 这些植物材料含有例如通过配糖键键合在 C-7 位的木糖基, 而不含有在该位置的羟基。因此, 用于将带糖的, 尤其是带有木糖基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 转化为含有 C-7 位羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的方法可用于提高上述优选的羟基化合物的产量。

本发明提供了从相应的带有 C-7 糖, 尤其是带有 C-7 木糖基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 制备带有 C-7 羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的方法。具体地讲, 本发明提供了用于制备至少一种含有直接键合在 C-7 位的羟基的紫杉烷 (taxane) 的方法, 该方法包含下列步骤: 使含有直接键合在 C-7 位的糖基的至少一种紫杉烷 (taxane) 与能够催化所述糖基水解成羟基的水解反应的酶或微生物接触, 并进行所述水解反应。

本发明提供了从带有 C-7 糖的紫杉烷类化合物 (taxanes) 制

备带有 C - 7 位羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的有效方法。按照本发明方法, 可以水解单一的紫杉烷 (taxane), 或者可以按顺序或同时水解不同的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的混合物。在一种优选的实施方案中, 按照本发明方法, 水解例如可通过萃取植物材料获得的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的一种混合物。欲用作起始原料的上述混合物, 除包含欲水解的一种或多种带有 C - 7 糖的紫杉烷类化合物 (taxanes) 外, 还可包含在 C - 7 位含有非糖基的基团, 例如羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes)。进一步对本发明描述如下。

在一种优选的实施方案中, 本发明提供了一种用于制备至少一种带有 C - 7 羟基的下列式 I 的紫杉烷 (taxane) 或其盐的方法:



其中

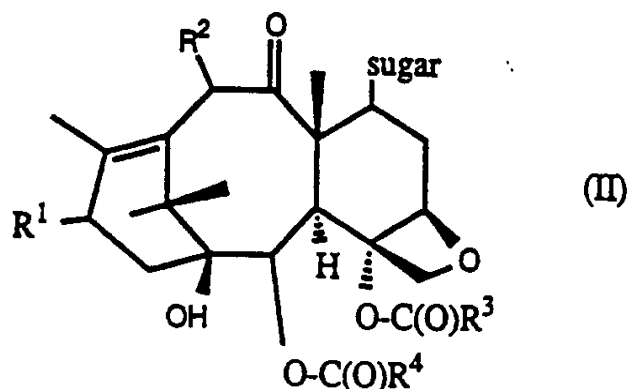
R^1 为羟基或酰氧基, 尤其是 R^1 具有下述式 III 结构;

R^2 为酰氧基 (尤其是烷基羰基氧基) 或羟基; 和

R^3 和 R^4 独立地为氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环基;

该方法包含下列步骤: 使至少一种带有 C - 7 糖的下列式 II 的紫杉烷 (taxane) 或其盐与能够催化将所述 C - 7 糖基水解为羟基的水解反

应的酶或微生物接触，并进行所述水解反应：



其中：

R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 如上所定义，并且“sugar”是直接键合在 C-7 位的糖基。

式 I 和式 II 化合物中未特别指出的手性中心的所有立体构型，或者单独地（即，基本上没有其它立体异构体）或者以与其它立体异构体形式的混合物形式存在的，均包含在本发明水解方法中。

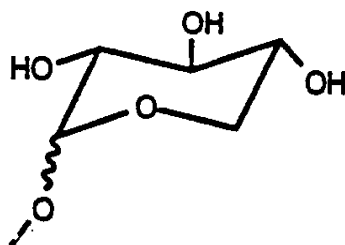
如上所述，本发明方法在下述情况下特别有用：当得到的是紫杉烷类化合物（taxanes）的混合物时，例如通过萃取植物材料得到 paclitaxel 与其他紫杉烷类化合物（taxanes）（其中之一种或多种含有 C-7 位的糖基）的混合物，以及当最终需要 C-7 羟基紫杉烷（taxane）例如 paclitaxel 时。

在本发明方法中，起始的紫杉烷（taxane）中的 C-7 基团的立体构型优选保留在产物中。C-7 取代基优选具有与 paclitaxel 中的 C-7 羟基相同的绝对立体构型。

本文所用术语“酶催化过程”或“酶催化方法”是指使用酶或微生物的本发明的过程或方法。本文所用术语“水解反应”是指将糖基向羟基的转化，并且可通过例如本发明方法使之与水和/或适宜的有

机醇接触来实现。在本发明方法中使用“一种酶或微生物”包括使用两种或多种甚至一种酶或微生物。

本文所用术语“糖”是指单糖、双糖、低聚糖或多糖类，尤其是五元及六元环糖类例如半乳糖、葡萄糖、甘露糖、阿拉伯糖、核糖或优选木糖，或其双糖类例如木糖基-木糖。术语“直接键合在C-7位的糖基”是指直接通过配糖键键合到紫杉烷(taxane)部分的C-7位的糖。优选的糖基为具有如下结构的木糖基团：



其中波状线代表 α ，或优选 β 构型。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“烷基”或“alk”是指任选取代的直链和支链的饱和烃基，优选在正链上具有1~12个碳原子的上述烃基。未取代的这类基团的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、戊基、己基、异己基、庚基、4,4-二甲基戊基、辛基、2,2,4-三甲基戊基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。取代基的实例可包括一种或多种下列基团：卤素、烷氧基、烷硫基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、羧基或被保护的羧基、羧基($-\text{COOH}$)、烷氧羰基、烷基羰基氧基、氨基甲酰基($\text{NH}_2-\text{CO}-$)、氨基($-\text{NH}_2$)、一烷基氨基或二烷基氨基、或巯基($-\text{SH}$)。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“低级alk”或

“低级烷基”是指诸如如上对在正链中具有 1 ~ 4 个碳原子的烷基所述的优先取代的基团。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“烷氧基”或“烷硫基”是指如上所述的分别通过氧键 (—O—) 或硫键 (—S—) 键合的烷基。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“烷氧羰基”是指通过羰基键合的烷氧基。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“烷基羰基氧基”是指通过羰基键合的烷基，而该羰基本身又通过氧键键合。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“一烷基氨基”或“二烷基氨基”是指分别被如上所述的一个或两个烷基所取代的氨基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“链烯基”是指如上对进一步含有至少一个碳—碳双键的烷基所述的任选取代的基团。取代基的实例包括一个或多个如上所述的烷基，和 / 或一个或多个如上作为烷基取代基所述的基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“链烯基氧基”是指通过氧键 (—O—) 键合的如上所述的链烯基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“炔基”是指如上对进一步含有至少一个碳—碳叁键的烷基所述的任选取代的基团。取代基的实例包括一种或多种如上所述的烷基，和 / 或一种或多种如上作为烷基取代基所述的基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“炔基氧基”是指通过氧键 (—O—) 键合的如上所述的炔基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“环烷基”是指任选取代的饱和的碳环系统，优选含有 1 ~ 3 个环和每环含有 3 ~ 7

个碳原子的上述碳环系统。未取代的这类基团的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基和金刚烷基。取代基的实例包括一种或多种如上所述的烷基，和/或一种或多种如上作为烷基取代基所述的基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“环烷基氧基”是指通过氧键($-O-$)键合的如上所述的环烷基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“环烯基”是指诸如如上对进一步含有至少一个形成部分不饱和环的碳-碳双键的环烷基所述的任选取代的基团。取代基的实例包括一个或多个如上所述的烷基，和/或一个或多个如上作为烷基取代基所述的基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“环烯基氧基”是指通过氧键($-O-$)键合的如上所述的环烯基。

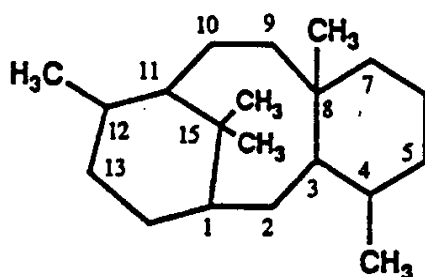
本文中单独或作为其他基团的一部分所述的术语“ar”或“芳基”是指任选取代的碳环芳基，优选含有1或2个环及6~12个环碳原子的上述碳环芳基。未取代的这类基团的实例包括苯基、联苯基和萘基。取代基的实例包括一个或多个，优选三个或更少的硝基、如上所述的烷基和/或如上作为烷基取代基所述的基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“芳氧基”是指通过氧键($-O-$)键合的上述芳基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“杂环基”是指在至少一个环中具有至少一个杂原子的任选取代的全饱和或不饱和的芳环基或非芳环基，优选在每个环中具有5或6个原子的单环基或双环基。杂环基可以例如在所述环中具有1或2个氧原子、1或2个硫原子，和/或1~4个氮原子。各杂环基可以通过环系统的任何碳原

子或杂原子键合。杂环基的实例包括如下：噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、哌啶基、氮杂葑基、吲哚基、异吲哚基、喹啉基、异喹啉基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、苯并噁二唑基、和苯并呋咱基。取代基的实例包括一个或多个如上所述的烷基，和/或如上作为烷基取代基所述的一个或多个基团。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“杂环基氧基”是指通过氧键（-O-）键合的上述杂环基。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“卤素”或“卤”是指氟、溴、氯和碘。

本文所用术语“taxane”是指如下所述含有 taxane 部分的化合物。本文所用术语“taxane部分”是指含有核心结构的部分（本文所用环系统的位置的编号如下所示）：



该核心结构可以是取代的，并且它可在其环系统中含有烯的不饱和结构。优选的这种部分具有在4-和5-位耦合的环氧丙烷(oxetane)环，及在C-11和C-12间的烯双键，例如在paclitaxel中所发现的那样。

本文中所用术语“羟基保护基团”是指任何能够保护游离的羟基的基团，这些基团在使用它的反应之后，可以被除去而不破坏分子的剩余部分。这类基团及其合成的实例可参见T. W. Greene, John

Wiley & Sons, "Protective Groups in Organic Synthesis", 1981, 或 Fieser & Fieser。

本文所用术语“盐”包括与无机和/或有机酸和碱形成的酸式和/或碱式盐。

本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“酰基”是指通过从有机羧酸的 $-COOH$ 基中除去羟基所形成的部分。本文中单独或作为其他基团的一部分所用的术语“酰氧基”是指通过氧键($-O-$)键合的上述的酰基。

用作本发明起始原料的带有C-7糖的紫杉烷类化合物(taxanes)可以是能够进行本文所述的酶催化水解方法的任何这类化合物。所述起始原料优选为可天然形成的带有木糖基的紫杉烷类化合物(taxanes), 例如7-木糖基紫杉醇(taxol)、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)、7-木糖基浆果赤霉素III、7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素III、7-木糖基cephalomannine、7-木糖基-10-脱乙酰基cephalomannine、7-木糖基紫杉醇(taxol)C或7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)C, 这些化合物可以单独存在或者以其相互间的混合物或与其他紫杉烷类化合物

(taxanes)的混合物形式存在。“天然形成”的紫杉烷(taxane)起始原料优选通过产生紫杉烷(taxane)的植物组织的植物细胞培养物, 和/或萃取产生紫杉烷(taxane)的植物组织而得到, 所述的产生紫杉烷(taxane)的植物组织特别是取自或衍自于下列紫杉属植物的组织, 例如浆果紫杉、东北红豆杉、短叶红豆杉、喜马拉雅红豆杉、*Taxus media*、*Taxus hicksii*、尤其是*Taxus X. media hicksii*。植物组织的实例包括根、针叶、茎皮和整个籽苗。为描述本发明方法

获得带有 C - 7 木糖基的紫杉烷 (taxane) 起始原料的优选方法, 参见例如 D. G. I. Kingston, *Pharmac. Ther.*, Vol. 52, pp 1 - 34 (1991); K. V. Rao, *Pharmaceutical Research*, Vol. 10, No. 4, pp. 521 - 524 (1993); 及 V. Senilh 等人, *J. Nat. Prod.*, 47, pp 131 - 137 (1984)。

用于本发明水解方法的带有 C - 7 糖的紫杉烷 (taxane) 起始原料也可以通过在紫杉烷 (taxane) 的 C - 7 位加上糖基而获得。提供这种原料的一种方法是通过将带有 C - 7 羟基的紫杉烷 (taxane) 进行酶催化转化为相应的在 C - 7 位带有糖基的紫杉烷 (taxane), 该方法是新的。因此, 本发明进一步提供了制备至少一种含有直接键合在 C - 7 位的糖基的紫杉烷 (taxane) (优选上述式 II 的紫杉烷 (taxane)) 的方法, 该方法包含下列步骤: 在有糖的存在下, 使至少一种含有直接键合在 C - 7 位的羟基的紫杉烷 (taxane) (优选上述式 I 的紫杉烷 (taxane)) 与能够将所述羟基催化转化为在 C - 7 位的糖基的酶或微生物接触, 并进行所述转化。所用的酶或微生物可以是任何能够催化上述转化为糖基的酶或微生物, 并优选为下述用于本发明水解方法中的酶或微生物, 但在有利于逆反应的条件上使用。反应条件例如反应介质、温度、pH 等也可以选自用于本发明的酶催化水解方法的下述反应条件, 尽管这些条件可以改良, 例如通过将所存在的水减至最少, 以有利于糖基的加入。

在一种实施方案中, 带有 C - 7 糖的紫杉烷 (taxane) 可以从相应的带有 C - 7 羟基的紫杉烷 (taxane) 通过上述酶催化方法制备, 并且所制备的紫杉烷 (taxane) 可以在非 C - 7 的位置按需要例如在下面应用部分进一步所述进行改良, 其中糖基用作羟基保护基, 接着

按本发明方法进行酶催化水解反应，得到带有直接键合在C-7位的羟基的最终紫杉烷（taxane）。

在本发明水解方法中所用的酶或微生物可以是能够催化本文所述的酶催化水解方法的任何酶或微生物。所述酶催化物质或微生物物质，不论其来源或纯度如何，均可以以游离状态使用，或例如通过物理吸附或截留固定于载体上。

微生物的实例包括下列各属的微生物：黄杆菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、芽孢杆菌属、芽孢乳杆菌属、梭菌属、脱硫肠状菌属、芽孢八叠球菌属、颤螺菌属、动性球菌属、乳杆菌属、库特氏菌属、微球菌属、口腔球菌属（*Stomatococcus*）、葡萄球菌属、节杆菌属、奈瑟氏球菌属或*Kingella*。优选的微生物为微球菌属的各种，例如藤黄微球菌、*Micrococcus lylae*、变易微球菌、玫瑰色微球菌、活泼微球菌、*Micrococcus kristinae*、*Micrococcus nishinomiyaensis*、*Micrococcus sedentarius*、或 *Micrococcus halobius*；芽孢杆菌属的各种，例如炭疽芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、苛求芽孢杆菌、环状芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、异常芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、泛酸芽孢杆菌、嗜碱芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、*Bacillus marinus*、缓病芽孢杆菌、巴氏芽孢杆菌、*Bacillus azotoformans*、马阔里芽孢杆菌、圆孢芽孢杆菌、侧孢芽孢杆菌、日本甲虫芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、栗褐芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌、蜂房芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌、短芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、浸麻芽孢杆菌、酸热芽孢杆菌、*Bacillus schlegelii*、或幼虫芽孢杆菌；黄杆菌属的各种，例如*Flavobacterium aquatile*、短黄杆菌、大比目鱼黄杆菌、脑

膜脓毒性黄杆菌、*Flavobacterium odoratum*、*Flavobacterium multivorum*、或 *Flavobacterium spiritivorum*；和特别是莫拉氏菌属，例如莫拉氏菌属亚属的各种，例如腔隙莫拉氏菌 (*Moraxella (Moraxella) lacunata*)、牛莫拉氏菌 (*Moraxella (Moraxella) bovis*)、不液化莫拉氏菌 (*Moraxella (Moraxella) nonliquefaciens*)、*Moraxella (Moraxella) atlantae*、苯丙酮酸莫拉氏菌 (*Moraxella (Moraxella) phenylpyruvica*)、或奥斯陆莫拉氏菌 (*Moraxella (Moraxella) osloensis*)、或布兰汉氏球菌属亚属的各种，例如粘膜炎布兰汉氏球菌 (*Moraxella (Branhamella) catarrhalis*)、*Moraxella (Branhamella) caviae*、*Moraxella (Branhamella) ovis*、或 *Moraxella (Branhamella) cuniculi*。

尤其优选的微生物为莫拉氏菌属 ATCC 55475、浸麻芽孢杆菌 ATCC 55476、环状芽孢杆菌 ATCC 55477 和微球菌属 ATCC 55478。本文所用术语“ATCC”是指 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, 所涉及的生物体的保藏处的登记号。上述微生物于1993年9月30日保藏。

生物学纯的微生物莫拉氏菌属 ATCC 55475、浸麻芽孢杆菌 ATCC 55476、环状芽孢杆菌 ATCC 55477 和微球菌属 ATCC 55478 是新的微生物。不言而喻，这些微生物的突变体也在本发明中被考虑用于本文所述的水解方法中，例如通过使用化学手段、物理手段（例如紫外线照射）或生物学手段（例如，通过分子生物学技术）进行的改良方法中。

莫拉氏菌属 ATCC 55475 可以在含有牛肉膏 (3.0g)、蛋白胨 (10.0g)、氯化钠 (5.0g) 的调至 pH 7.0 并在 121°C 灭菌 20 分钟

的营养肉汤培养基中进行培养。该微生物的特征如下：革兰氏阴性杆状（ $1 \sim 2 \mu m$ ）；不动的；无芽孢形成；在各种培养基上需氧生长；只有在使用四甲基 - p - 亚苯基二胺时才显示过氧化氢酶阳性和氧化酶阳性（由从Delaware Gap National Recreational Area, New Jersey获得的土壤试样中分离出）。

浸麻芽孢杆菌ATCC 55476 可以在含有牛肉膏（3.0g）、蛋白胨（10.0g）、氯化钠（5.0g）的调至pH7.0并在121℃灭菌20分钟的营养肉汤培养基中进行培养。该微生物的特征如下：革兰氏阳性杆状；可运动的；形成孢子；在各种培养基上需氧生长；过氧化氢酶阳性和氧化酶阳性；弱的葡糖利用性；明胶液化（由从Arlington, Texas 得到的土壤试样中分离出）。

环状芽孢杆菌ATCC 55477可以在含有牛肉膏（3.0g）、蛋白胨（10.0g）、氯化钠（5.0g）的调至pH7.0并在121℃灭菌20分钟的营养肉汤培养基中培养。该微生物的特征如下：革兰氏阳性杆状；可运动的；形成孢子；在各种培养基上需氧生长；过氧化氢酶阳性和氧化酶阳性；弱的葡糖利用性；不液化明胶（由从Hamilton Square, New Jersey获得的木材试样中分离出来）。

微球菌属ATCC 55478可以在含有牛肉膏（3.0g）、蛋白胨（10.0g）、氯化钠（5.0g）的调至pH7.0并在121℃灭菌20分钟的营养肉汤培养基中培养。该微生物的特征如下：革兰氏阳性球菌（直径 $0.5 \sim 1.5 \mu m$ ）；细胞成对存在，或成簇存在，不动的；无芽孢形成；在各种培养基上需氧生长；过氧化物酶阳性和氧化酶阳性；发酵葡糖（由从Harriman Park, Tuxedo, New York获得的土壤试样中分离得到）。

本发明还提供了筛选用于选择能够进行本发明酶催化水解反应的微生物的方法。用于选择能够按本发明方法酶催化水解起始的带 C - 7 糖的紫杉烷 (taxane) 的微生物的优选方法是使用下列新的筛选方法, 该方法包含下列步骤:

- (i) 选择能够支持待筛选的微生物的生长的菌种生长培养基;
- (ii) 选择一种指示剂糖苷;
- (iii) 使微生物与步骤 (i) 的菌种生长培养基接触, 以便使微生物进行生长, 并使上述物质与步骤 (ii) 的指示剂糖苷接触;
- (iv) 在指示剂糖苷的存在下, 观察微生物, 以确定是否存在水解反应; 和
- (v) 检验微生物以确定所述带有 C - 7 糖的紫杉烷 (taxane) 的水解反应。

本文所用术语“糖苷”是指这样的化合物, 该化合物可通过使糖的醛或酮基团与醇 (该醇也可为糖) 羟基反应来产生配糖键 ($-O-$) 来形成, 该化合物在水解裂解时形成作为产物的糖和糖苷配基 (即, 裂解的醇)。本文所用术语“指示剂糖苷”是指这样的糖苷, 其中的糖苷配基在紫外光下呈现荧光 (例如 4 - 甲基umbelliferyl - β - D - 吡喃木糖苷 (xylopyranoside)) 或在水解反应中变色 (例如 p - 硝基苯基 - β - D - 木糖苷), 因此可以通过观察与指示剂糖苷相接触的微生物来确定所给的微生物是否能够酶催化水解反应。优选, 指示剂糖苷为指示剂木糖苷。带有庞大的糖苷配基的指示剂木糖苷类化合物对于选择能够水解 C - 7 木糖基紫杉烷类化合物 (taxanes) 的微生物来说是优选的。

在上面步骤 (i) 中, 菌种生长培养基优选含有作为碳源的糖苷,

例如木聚糖或能够在配糖键被水解的其他木糖苷，所以该培养基富含能够水解配木糖键 (xylosidic bonds) 的微生物，因而促进其选择。在步骤 (iii) 中，微生物可以与菌种生长培养基接触，例如通过将稀释的含有微生物的溶于水中的土壤悬浮液置于琼脂菌种生长培养基上平板培养。微生物可以与指示剂糖苷接触，例如通过将含有指示剂糖苷的软琼脂覆盖在菌种生长培养基的平板上，在此平板上已生长微生物的菌落，或通过将指示剂糖苷加至菌种生长培养基中，之后使微生物与之接触。

在应用本发明的筛选方法中的迅速而有效的步骤 (i) 至 (iv) 后，可以在步骤 (v) 中，将正在生长或已经生长的微生物的菌落与带有 C-7 糖的紫杉烷 (taxane) 接触一段适宜的培养期，以验证糖基的水解反应。例如，个别的菌落可以从琼脂平板中取出，并在含 7-木糖基紫杉烷 (taxane) 的小振动烧瓶中生长，然后取出细胞，分析产品 (例如通过 HPLC)，以检定糖基的水解。

用于本发明水解方法中的酶的实例为水解酶，特别是糖苷酶或聚糖酶。优选的酶包括由微生物衍生的酶，特别是由上述的那些微生物衍生的酶。这些酶可以例如通过萃取和纯化方法而分离出。

当使用微生物时，可以使用以完整的湿细胞或干细胞例如冻干的、喷雾干燥的或加热干燥的细胞形式存在的细胞，或者以处理过的细胞材料例如破裂的细胞或细胞萃取物形式存在的细胞。也考虑了使用遗传工程改进的生物体。宿主细胞可以是任何细胞，例如经改良的以含有一种或多种用于表达能够进行本文所述催化反应的一种或多种酶的基因的大肠埃希氏菌。

当使用一种或多种微生物时，本发明的酶催化水解方法可以在微

生物发酵后进行（两步骤的发酵与水解），或与之同时进行，即在后一种情况中，通过就地发酵和水解进行（单一步骤的发酵和水解）。

微生物的生长可以通过使用适宜的培养基由本领域普通技术人员之一来实现。用于生长微生物的适宜培养基包括提供微生物细胞生长所必需的营养素的培养基。典型的生长培养基包括必需的碳源、氮源和（例如以痕量存在的）元素。也可以加入诱导物。本文所用的术语“诱导物”包括促进在微生物细胞中形成所需的酶催化活性的任何化合物。

碳源可以包括：糖类，例如麦芽糖、乳糖、葡萄糖、果糖、甘油、山梨糖醇、蔗糖、淀粉、甘露糖醇、丙二醇、木聚糖等；有机酸的盐类，例如乙酸钠、柠檬酸钠等；以及醇类，例如乙醇、丙醇等。

氮源可以包括：N-乙酰A、玉米浆、大豆粉、牛肉膏、酵母提取物、糖蜜、面包酵母、胰（蛋白）胨、nutrisoy、蛋白胨、yeastamin、氨基酸类例如谷氨酸钠等、硝酸钠、硫酸铵等。

痕量元素可以包括镁盐、锰盐、钙盐、钴盐、钼盐、铜盐、镍盐、铁盐、钠盐和钾盐。也可加入痕量，或优选大于痕量的磷酸盐。

所用培养基可以包括多于一个碳或氮源或其他营养素。

优选的用于生长的培养基包括含水的培养基，例如在本文实施例中所所述的培养基。

对反应混合物的搅拌和通气影响生长过程中可获得的氧的量。优选搅拌范围为100~250RPM；优选每体积培养基每分钟通气约1~10体积空气。

为了微生物的生长和/或按本发明方法进行水解反应，培养基的pH优选为约4至约8.5，温度优选为约24℃至约37℃。水解反

应例如可以在体外进行例如 1 ~ 72 小时的时间，或优选进行至所需产物的产率达到最大为止。优选在水解反应期间，将 pH 保持在 7 或低于 7，例如此时理想地是可使在 C - 7 位的差向异构作用减至最小（例如，在 10 - 脱乙酰基紫杉醇（taxol）或 10 - 脱乙酰基紫杉素 III 存在的情况下）。优选在 pH 为 4 ~ 7，特别是在非碱性条件下进行本发明的水解反应。

还优选使用含水液体作为水解反应介质，尽管也可使用有机液体、或可混溶的或不可混溶的（两相）有机/含水液体混合物。优选使用 0.0025 ~ 2.5%（重量）带有 C - 7 糖的紫杉烷（taxane）起始原料，按起始原料与水解反应介质的合并重量计。

对于相对于起始原料所用的酶或微生物的量进行选择以使之能催化本发明的酶催化水解反应。在使用本发明的水解方法时优选得到超过 90% 的产率（按起始的带有 C - 7 糖的紫杉烷（taxane）计，所得到的 C - 7 位被水解的产物的%）。水解反应可以选择性地在起始的紫杉烷（taxane）的 C - 7 位进行。即可得到产物中较大部分（例如全部）只在 C - 7 位水解而不在其他位置水解的产物。

本发明方法中的带有 C - 7 羟基的产物和其他紫杉烷（taxane）产物例如下述的那些紫杉烷（taxane）产物，可以例如通过下述方法分离和纯化：例如萃取、蒸馏、结晶及柱色谱法。

紫杉烷类化合物（taxanes）是如上所述含有紫杉烷（taxane）部分的双萜化合物。特别令人感兴趣的是含有其中 13 位含有侧链的紫杉烷（taxane）部分的紫杉烷类化合物（taxanes），该类化合物的实例为 paclitaxel。具有药理活性的紫杉烷类化合物（taxanes）例如 paclitaxel 可以用作抗肿瘤药剂，以治疗患有癌症例如乳腺癌、

卵巢癌、结肠癌或肺癌、黑瘤及白血病的患者。

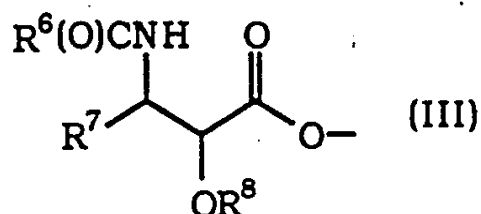
通过本发明水解方法获得的化合物作为具药理活性的紫杉烷类化合物 (taxanes) 本身 (例如 paclitaxel)、或作为制备上述具药理活性的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的中间体均特别有用。因此, 例如在通过本发明方法制备的化合物也带有 C-13 位的羟基时 (例如浆果赤霉素 III 或 10-脱乙酰基浆果赤霉素 III), 这些化合物可以与产生 C-13 酰氧基侧链的中间体化合物例如 β -内酰胺类偶合, 以得到带有 C-13 位酰氧基侧链的紫杉烷类化合物 (taxanes), 例如 paclitaxel 或其类似物。根据本发明方法制备的带有 C-7 羟基的化合物可以在用于上述 C-13 酰氧基侧链偶合之前被任选修饰。例如, 在非 C-13 位的一个或多个羟基可以在偶合之前被保护, 之后再去保护。此外, 在使用本发明方法之前、期间或之后可以进行在 C-13 位的修饰 (按照美国专利申请序列号 08/077, 979, Hanson 等人, 1993 年 6 月 15 日提交 (Attorney Docket No. LD58)) (将 C-13 位的酰氧基酶催化水解为 C-13 位的羟基), 和/或在 C-10 位的修饰 (按照美国专利申请序列号 08/077, 980, Hanson 等人, 1993 年 6 月 15 日提交 (Attorney Docket No. LD59)) (在 C-10 位, 将酰氧基酶催化水解为羟基, 或将羟基酶催化酯化为酰氧基), 上述两个文献并入本文作为参考。

通过本发明水解方法制得的、任选进行如上修饰的带有 C-7 羟基的紫杉烷类化合物 (taxanes) 可以例如用于制备带有 C-13 酰氧基侧链的紫杉烷类化合物 (taxanes), 例如上述那些紫杉烷类化合物 (taxanes), 并可按下列文献中所述的方法制备: 欧洲专利公开 No. 400, 971、美国专利第 4, 876, 399 号、美国专利第 4, 857, 653

号、美国专利第4, 814, 470号、美国专利第4, 924, 012号、美国专利第4, 924, 011号、和Kingston, Pharm. Ther., Vol. 52, 1 - 34 (1991), 尤其是美国专利申请序列号 07/995, 443 (该申请由Poss等人于1992年12月23日提交) (Attorney Docket No. LD60)、美国专利申请序列号08/033, 598 (由 Thottathil等人于1993年3月19日提交) (Attorney Docket No. LD57) 及美国专利申请序列号08/154, 840 (1993年11月24日提交), 所有上述文献并入本文作为参考。

优选将式II的紫杉烷类化合物 (taxanes) 或其盐应用于本发明水解方法中, 由此酶催化水解反应提供了相应的式I化合物或其盐。

在式I和II中, R^2 优选为羟基或 $R^5 - C(O) - O -$, 尤其是其中 R^5 为烷基例如甲基; R^3 优选为烷基例如甲基; R^4 优选为芳基例如苯基; 和 R^1 优选为羟基或下列式III的基团:



其中

R^6 和 R^7 独立地为烷基、烷氧基、链烯基、链烯基氧基、炔基、炔氧基、环烷基、环烷基氧基、环烯基、环烯基氧基、芳基、芳氧基、杂环基或杂环基氧基; 和

R^8 为氢、烷氧羰基或羟基保护基。

式II的紫杉烷类化合物 (taxanes) 的实例为7-木糖基紫杉醇 (taxol)、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇 (taxol)、7-木

糖基浆果赤霉素Ⅲ、7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素Ⅲ、7-木糖基cephalomannine、7-木糖基-10-脱乙酰基-
cephalomannine、7-木糖基紫杉醇(taxol) C或7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol) C。式I的紫杉烷类化合物(taxanes)的实例为paclitaxel、10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)、浆果赤霉素Ⅲ、10-脱乙酰基浆果赤霉素Ⅲ、cephalomannine、10-脱乙酰基cephalomannine、紫杉醇(taxol) C、或10-脱乙酰基紫杉醇(taxol) C。

paclitaxel优选通过本文所述方法最终制备。

反应物或产物的盐类或溶剂化物例如水合物可以被使用或如果需要以本发明的任何方法制备。

本发明通过下列实施例进一步阐述，这些实施例是仅用于说明性的，而不是以任何方式限制本发明未决权利要求书的范围。

实施例1

木糖酶(xylosidases)的选择

制备含有取自桦树木的1%木聚糖、0.1%酵母抽提物、0.1%胰(蛋白)胨和1.5%琼脂的琼脂平面。将2g土壤试样或腐木试样悬浮于40ml水中，并向每个平面涂布0.1ml按1:200稀释的该稀释液。在室温(约22℃)下将各平面保温1周，然后将其在4℃贮存2周。各平面上涂以含有1mM 4-甲基umbelliferyl- β -D-吡喃木糖苷(xylopyranoside)的4ml 0.8%琼脂糖(约40℃)。挑出在远(long)紫外光下呈荧光的125个菌落并在28℃在琼脂平面上保温3天。

摇动含有取自桦树木的1%木聚糖、0.2%胰(蛋白)胨、0.2%

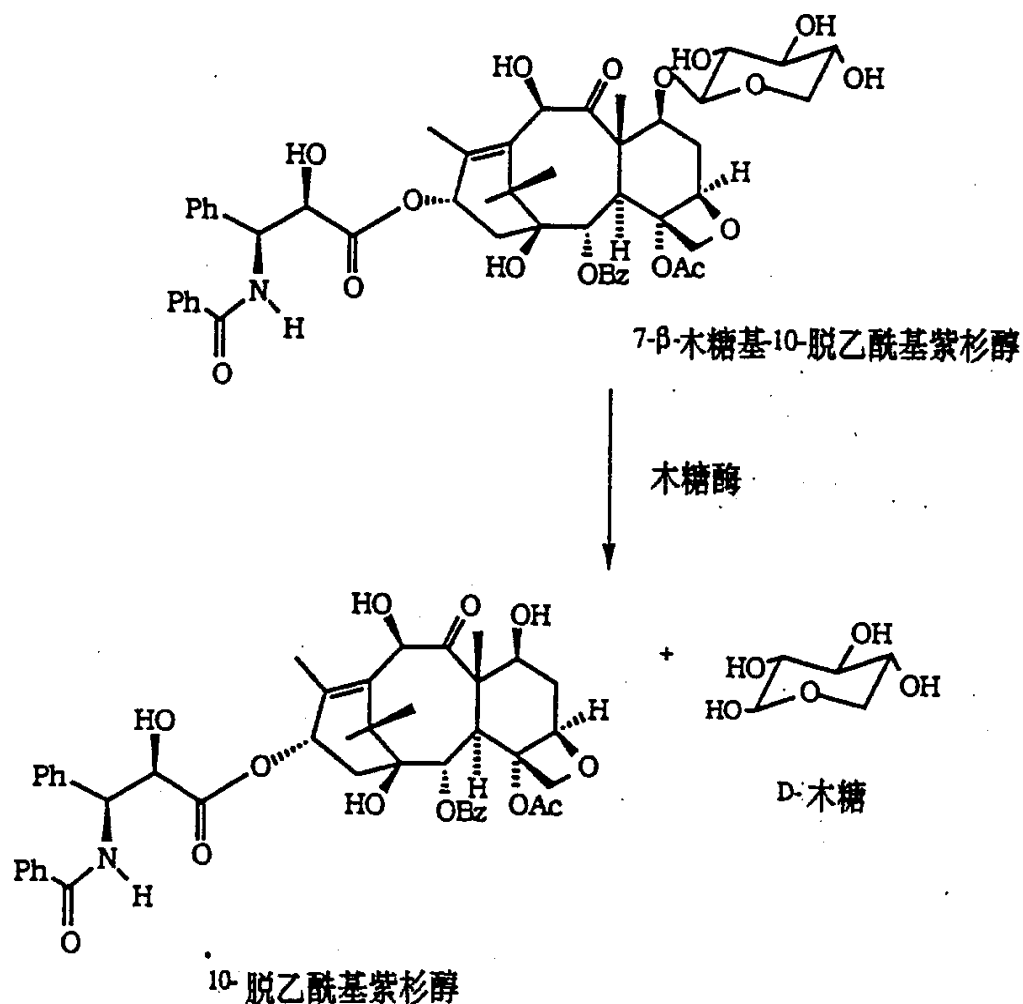
酵母抽提物和足够的磷酸钾以将pH调至7的烧瓶。将烧瓶接种以菌环量的取自平面上的培养物，并在28℃和175rpm条件下保温。2天后，加入1mg 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)在0.2ml甲醇中的溶液，并继续保温2天。另一组分离菌在加入7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)之前保温1天，而在加入之后保温3天。向每个烧瓶中加入10ml甲醇，并用HPLC方法1(下面所述)测定样品中的7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)和10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)。在所筛选的86个分离菌中，有9个产生可检测量的10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)。用莫拉氏菌属ATCC 55475可得到最高浓度的10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)，将该菌通过反复划线法(restreaking)纯化，并用于下面的实施例中。

实施例2

7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)的水解反应

在4升锥形瓶中，将含有1%桦树木木聚糖、0.2%胰(蛋白)酶、0.2%酵母抽提物、0.1%KH₂PO₄和0.1%K₂HPO₄的pH7的1升培养基用10ml莫拉氏菌属ATCC 55475培养物接种，并在28℃摇动3天。离心收集细胞，用50ml50mM磷酸钾缓冲液(pH7)洗涤，离心并再悬浮于30ml该缓冲液(0.122g湿细胞/ml)中。向1.5ml细胞悬浮液中加入溶于0.2ml甲醇和0.3ml水中的0.5mg 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)。将该悬浮液在28℃在12rpm条件下极向混合21小时；然后用2ml甲醇停止反应，并用HPLC方法1测定样品。没有7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)剩余，并发现有0.230mg/ml 10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)(产率107%)。

该实施例的反应说明如下。



实施例 3

7-木糖基紫杉醇 (taxol) 的水解反应

向按实施例 2 所述方法制备的 1.5ml 细胞悬浮液中加入溶于 0.2ml 甲醇和 0.3ml 水中的 0.5mg 7-木糖基紫杉醇 (taxol)。将悬浮液在 28℃ 在 120 rpm 的条件下极向混合 21 小时，然后用 2ml 甲醇停止反应，并用 HPLC 方法 1 测定样品。剩下 0.011mg/ml 7-木糖基紫杉醇 (taxol) 并发现有 0.167mg/ml 紫杉醇 (taxol) (77% 产率)。

HPLC方法 1¹

柱: Hewlett Packard hypersil 5 micron ODS C18, 200 × 4.6mm

流动相: 60% 甲醇, 40% 水

流速: 1 毫升/分钟

柱温: 环境温度

检测波长: 235nm

¹ B. Monsarrat, E. Mariel, S. Cros, M. Gares, D. Guenard, F. Gueritte - Voegelein 和 M. Wright, Drug Metabolism and Disposition, 18, 895-901 (1990)。

实施例 4

7-木糖基浆果赤霉素-III的水解反应

将莫拉氏菌属 ATCC 55475 在摇动烧瓶中在 28 °C 在含有下列成分的 pH 7 的培养基中生长: 2% 甘油、0.2% 胰(蛋白)酶、0.2% 酵母抽提物、0.1% K_2HPO_4 、0.1% KH_2PO_4 、0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.001% NaCl、0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 0.001% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 。用 1 ml 的小瓶接种 100 ml 培养基。4 天后, 在 4 升锥形瓶中用 15 ml 的部分该培养物接种 1 升培养基。3 天后, 通过离心收集细胞, 用 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 洗涤, 再次离心, 并冷冻贮存。

将 1 mg 7-木糖基紫杉醇 (taxol)、200 mg (108 毫单位) 取自 *Nocardioides albus* ATCC 55425 (描述于上述美国专利序列号 08/077, 979 中) 的 C-13 脱酰酶、0.2 ml 甲醇、0.2 ml 1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 和 3.6 ml 水在 24 °C 在 48 rpm 条件下极向混合 17 小时。15 小时后, 用方法 1 (如上所述) 进行 HPLC 分析表明从底物中

完全除去了C-13侧链。现将含有7-木糖基浆果赤霉素-III的2ml该溶液加入到1ml在50mM磷酸钾缓冲液(pH7)中的上述莫拉氏菌属细胞(0.24g湿细胞重量)中,并在48rpm条件下极向混合24小时。反应混合物用6ml CH₂Cl₂萃取。干燥萃取物,并将其再溶于甲醇中以进行用方法1的HPLC分析。发现有0.101mg/ml浆果赤霉素-III(产率102%,按起始的7-木糖基紫杉醇(taxol)浓度计)。

实施例5

7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素-III的水解反应

按实施例4所述方法制备细胞。将1mg 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)、200mg(108毫单位)C-13脱酰酶(如实施例4中所述)、0.2ml甲醇、0.2ml 1M磷酸钾缓冲液(pH7)和3.6ml水在24℃在48rpm条件下极向混合17小时。15小时后,用方法1进行HPLC分析表明从底物中完全除去了C-13侧链。现将2ml含有7-木糖基-10-脱乙酰基浆果赤霉素-III的溶液加入到1ml在50mM磷酸钾缓冲液(pH7)中的上述莫拉氏菌属细胞(0.24g湿细胞重量)中,并在48rpm条件下极向混合24小时。反应混合物用6ml CH₂Cl₂萃取。干燥萃取物并再溶于甲醇中用于进行经方法1的HPLC分析。发现有0.099mg/ml 10-脱乙酰基浆果赤霉素-III(产率103%,按起始的7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)浓度计)。

实施例6

通过亚细胞部分对7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)的水解反应

将莫拉氏菌ATCC 55475在28℃在6个每个含有1升实施例2

所述的培养基的4升锥形瓶中振荡培养3天。将上述培养基在28℃用2 ml/L Novo SP431木聚糖酶处理2天，以在接种前部分水解木聚糖。通过离心收集细胞，用50 mM磷酸钾缓冲液(pH 7)洗涤，再次离心，然后用该缓冲液使体积达到210ml。细胞通过用声处理破裂，在27504×g离心20分钟，然后在47807×g将上清液离心20分钟。将1.7 ml 47807×g上清液在100, 100×g离心1小时，并将100, 100×g球状沉淀物(pellet)再悬浮于1.7 ml 50 mM磷酸钾缓冲液(pH 7)中。在100, 100×g上清液中的蛋白质浓度为4.72mg/ml，而在再悬浮的球状沉淀物(pellet)中的蛋白质浓度为1.65mg/ml。将在0.1ml甲醇中的0.5mg 7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)加入到1.9ml球状沉淀物(pellet)或上清液部分中，并将试管在25℃保温1.5小时。通过加入2 ml甲醇使反应停止，并通过HPLC方法1分析。

所得结果如下：

样品	产物	底物	10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)的产率
	10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)	7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇(taxol)	
	mg/ml	mg/ml	%
没有酶	0.000	0.256	
上清液	0.038	0.237	18
球状沉淀物(pellet)	0.206	0.038	96

实施例 7

紫杉 (Yew) 萃取物的水解反应

按实施例 4 中所述方法在摇动烧瓶中培养生长莫拉氏菌 ATCC 55475。按实施例 6 所述方法收集细胞并洗涤, 然后以 12,000psi 在显微流体仪 (microfluidizer) 通过 2 次而将细胞破裂。未破裂的细胞通过在 $27504 \times g$ 离心 20 分钟而除去。上清液在 $100,100 \times g$ 离心 1 小时, 而将 $100,100 \times g$ 球状沉淀物 (pellet) 再悬浮于 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 中, 蛋白质浓度为 1.7 mg/ml。将 0.05 ml 1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7)、0.2 ml *Taxus Hicksii* 籽苗的乙醇萃取物、20 mg 聚乙烯吡咯烷酮 (用以除去抑制植物的酚醛塑料) 和 0.75 ml 水在 25 °C 在 12 rpm 条件下混合 1 小时。加入 1 ml 球状沉淀物 (pellet) 悬浮液或 1 ml 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7), 并在 12 rpm 和 25 °C 继续保温 3 天。

样品通过 HPLC 方法 2 (如下所述) 分析, 并得到下列结果:

样品	产物	底物
	10-脱乙酰基紫杉醇 (taxol)	7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇 (taxol)
	mg/ml	mg/ml
没有酶	0.020	0.020
$100,100 \times g$ 球状沉淀物 (pellet)	0.028	0.009

HPLC方法 2

柱: phase Separations Inc. (Norwalk, CT) microbore
spherisorb phenyl 150×2.0mm, 3 微米

流动相: 溶剂 A: 用三氟乙酸调至 pH 4 的 1.5 mM KH_2PO_4 。

溶剂 B: 乙腈

时间 / 分钟	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
0	7.5	2.5
2.0	5.5	4.5
2.3	4.0	6.0
2.4	2.5	7.5
2.8	7.5	2.5

柱 温: 35℃

检测波长: 230nm。