

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/54

C12N 9/02 C12P 19/56

C12N 1/21

/(C12N1/21, C12R1: 465,
1: 19)



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96190128.4

[45] 授权公告日 2003 年 8 月 20 日

[11] 授权公告号 CN 1118574C

[22] 申请日 1996.2.20 [21] 申请号 96190128.4

[30] 优先权

[32] 1995. 2. 27 [33] US [31] 08/396,218

[86] 国际申请 PCT/EP96/00692 1996. 2. 20

[87] 国际公布 WO96/27014 英 1996. 9. 6

[85] 进入国家阶段日期 1996. 10. 25

[71] 专利权人 法玛西雅厄普约翰公司

地址 意大利米兰

[72] 发明人 A·索拉里英万逊 U·布里姆

A·L·科罗姆伯

C·R·胡奇英桑 S·奥坦

C·斯科逊

[56] 参考文献

EP, A, 0061737 1982. 10. 06

JOURNAL OF BACTERIOLOGY VOL. 172, NO. 6

1990-06-01 S. L. OTTEN ET AL

审查员 曾繁辉

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 张 闽

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 3 页

[54] 发明名称 制备阿霉素的方法

[57] 摘要

通过含有编码柔红霉素 14-羟化酶的 DNA 的一重组载体的转化作用, 赋予宿主细胞把柔红霉素转化为阿霉素的能力。该宿主细胞可用来生产阿霉素。

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

1. 一种编码柔红霉素 14-羟化酶的分离子 DNA 分子，其中所述 DNA 分子具有选自下组的序列：

- a) SEQ ID NO: 1,
- b) 编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的 DNA 序列,
- c) 图 1 中所示 3.4 kb SphI 片段, 和
- d) 图 2 中所示 NdeI-BamHI 片段。

2. 一种编码柔红霉素 14-羟化酶的载体，其中所述载体包含具有选自下组的序列的 DNA 分子：

- a) SEQ ID NO: 1,
- b) 编码 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的 DNA 序列,
- c) 图 1 中所示 3.4 kb SphI 片段, 和
- d) 图 2 中所示 NdeI-BamHI 片段。

3. 依据权利要求 2 的一种载体，其为一种质粒。

4. 依据权利要求 3 的一种质粒，其为 pIS23、pIS62 或 pIS70。

5. 由权利要求 2 中要求的载体所转化或转染的一种宿主细胞。

6. 依据权利要求 5 的一种宿主细胞，其为一种产生柔红霉素的细菌细胞。

7. 依据权利要求 6 的一种宿主细胞，其为一种链霉菌细胞。

8. 产生阿霉素的一种方法，其包括

(i) 在柔红霉素存在的条件下培养权利要求 5 中所要求的宿主细胞，培养条件为使柔红霉素转化为阿霉素，以及

(ii) 从培养物中分离出阿霉素。

9. 产生阿霉素的一种方法，其包括

(i) 培养权利要求 6 中所要求的宿主细胞，培养条件为使柔红霉素转化为阿霉素，以及

(ii) 从培养物中分离出阿霉素。

10. 柔红霉素 14-羟化酶，其具有 SEQ ID No:2 的氨基酸序列。

11. 含有柔红霉素 14-羟化酶的一种细胞抽提物，其中所述柔红霉素

14-羟化酶具有与 SEQ ID No:2 所示氨基酸序列相同的氨基酸序列。

制备阿霉素的方法

本发明涉及从柔红霉素中产生阿霉素(doxorubicin)的方法,使用的是经重组DNA转化的宿主细胞中得到的一种酶。

柔红霉素类的 anthracyclines(例如阿霉素、洋红霉素和阿克拉霉素)是抗癌治疗中最广泛应用的药剂[F. Arcamone, Doxorubicin, Academic Press, New York, 1981, pp. 12 - 25; A. Grein, Process Biochem. 16:34(1981); T. Kaneko, Chimicaoggi May:11(1988); C. E. Myers et al., "Biochemical mechanisms of tumor cell kill". 见: Anthracycline and Anthracenedione-Based Anti-Cancer Agents (Lown, J. W., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 527 - 569, 1988; J. W. Lown, pharmac. Ther. 60:185 - 214 (1993)]. 已通过化学合成方法生产出柔红霉素及阿霉素的改良性衍生物以提高其抗癌活性(特别是可通过口服途径),并可在癌症治疗中抵抗与使用这些药物有关的急性毒性及慢性心脏毒力[Penco, Process Biochem, 15:12(1980); T. Kaneko, Chimicaoggi May:11(1980)]. 这些类似物的实例有 4'-表阿霉素(Epirubicin)、4-脱甲氧柔红霉素(Idarubicin)以及甲氧基-吗啉代阿霉素。

anthracyclines 为自然发生的化合物。可由链霉菌属的多种菌株产生(如波赛链霉菌、浅兰浅红链霉菌、加利利链霉菌、灰色链霉菌、灰浅红链霉菌、*S. insignis*、绿色产色链霉菌、*S. bifurcus* 以及链霉菌属菌种 C5)和放线菌属 *A. carminata* 产生。阿霉素主要由波赛链霉菌 *caesius* 亚菌种产生,而柔红霉素则由波赛链霉菌以及上述链霉菌菌种产生。可公开使用模式菌株波赛链霉素亚菌种 *caesius* IM-RU 3920(其与 ATCC 27952 相同,因而下文中简写为波赛链霉菌 3920)、波赛链霉菌 ATCC 29050("波赛链霉菌 29050")、波赛链霉菌亚菌种 *caesius* ATCC 27952("波赛链霉菌 27952")和不生产柔红霉素的波赛链霉菌 *dnrN:aph II* 突变体["波赛链霉菌 *dnrN*"; S. L.

Otten, J. Ferguson 和 C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.* 177: 1216 - 1224 (1995)]. 特别是描述于 US-A-3, 590, 028 中的波赛链霉菌 ATCC 27952, US-A-4, 012, 284 中的波赛链霉菌 29050 以及保藏于美国标准培养物收藏所(美国马里兰州 Rockville)的波赛链霉菌 dnrN, 序号为 ATCC 55607。波赛链霉菌 ATCC 55607 是从波赛链霉菌 ATCC 29050 菌株中衍生得到, 方法是用突变体 dnrN 基因来置换 dnrN 基因, 使来自 Tn5 的 aph II 基因 [J. M. Ward 等., *Mol. Gen. Genet.* 203: 468 - 475 (1986)] 插入到突变体 dnrN 基因中 Sal I 位点以破坏 dnrN 的功能。如在 ISP4 培养基 (Difco 实验室, Detroit, MI, 含 50 μ g/ml 的卡那霉素) 上的生长所确定, 波赛链霉菌 ATCC 55607 菌株对新霉素或卡那霉素具抗性, 且并不产生阿霉素、柔红霉素或其生物合成中的任何中间体 (S. L. Otten 等, 待发表)。可通过波赛链霉菌 27952 从丙二酸、丙酸及葡糖中制成 anthracyclines 阿霉素, 途径如 Grein [*Advan. Appl. Microbiol.* 32: 203 (1987)] 和 Eckardt 及 Wagner [*J. Basic Microbiol.* 28: 137 (1988)] 所述。在这个过程中 ϵ -紫红霉酮、洋红霉素及柔红霉素为确定的中间体。该途径中的最后步骤涉及到柔红霉素向阿霉素的羟基化作用, 这仅在波赛链霉菌 27952 中有过报导 [F. Arcamone 等., *Biotechnol. Bioeng.* 11: 1101 (1969)]。在 EP-A-61737 中描述过柔红霉素向阿霉素生物转化的方法 (产率为 30%), 使用的是波赛链霉菌 ATCC 31847 的不产生柔红霉素的突变株, 该突变株是用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理菌株 ATCC 27952 而得到的。不过, 依据 US-A-3, 803, 124, 这种转化通常是以化学法以工业规模进行的。

柔红霉素生物合成及柔红霉素抗性的基因已得自波赛链霉菌 29050 及波赛链霉菌 27952 中, 方法是通过克隆实验 [Stutzman - Engwall and Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3135 (1988); Otten 等., *J. Bacteriol.* 172: 3427 (1990)]。这些研究表明, 当引入进变铅青链霉菌 1326 时, 克隆化基因就使宿主具有了产生紫红霉酮和对柔红霉素及阿霉素具抗性的能力。

本发明提供一种编码柔红霉素 14-羟化酶的分离性 DNA 分

子。柔红霉素 14-羟化酶可将柔红霉素转变为阿霉素。DNA 分子主要由 SEQ ID No:1 的序列构成,该序列将被称为“dxrA”序列。由 SEQ ID No:1 编码的柔红霉素 14-羟化酶的推断氨基酸序列如 SEQ ID No:2 所示。

本发明的 DNA 分子可含有图 1 中 3.4kb SphI 片断的全部或部分。编码柔红霉素 14-羟化酶的序列介于 SphI 片断的 KpnI 和 BamHI 位点之间。本发明的 DNA 分子可含有图 2 中 NdeI-BamHI 片断的全部或部分。图 2 中 NdeI-BamHI 片断衍生自图 1 中略大的 KpnI-BamHI 片断。

当本发明的 DNA 分子仅含有 3.4kb SphI 片断的一部分或 NdeI-BamHI 片断的一部分时,该部分必须具有柔红霉素 14-羟化酶的功能(即其必须能把柔红霉素转化为阿霉素)。该部分长度一般至少为 1.2kb,优选为 1.2—3.4kb,更优选为 1.2—1.4kb。该部分可以是限制性内切酶片断,如图 1 中的 KpnI-BamHI 片断。

本发明包括一种 DNA 分子,其可以编码柔红霉素 14-羟化酶,后者的序列至少有 60% 与 SEQ ID No:2 的序列相同。本发明还可包括柔红霉素 14-羟化酶,其氨基酸序列至少有 60% 与 SEQ ID No:2 的序列相同。该序列至少有 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 与 SEQ ID No:2 序列相同。

SEQ ID No:2 序列可通过取代、缺失、插入、扩展、功能化或化学修饰来加以修饰。取代、缺失、插入或扩展可涉及一个或多个氨基酸,例如一、二、三、四、五、八、十五或二十个氨基酸。一般而言,SEQ ID No:2 的物化特性可以保留在修饰后的序列之中。通常,修饰后的序列在电荷、疏水/亲水性及大小方面是相似的。候选的取代作用为:可引起下列组中之一的氨基酸被同组中不同氨基酸所取代:

H、R 和 K

I、L、V 和 M

A、G、S 和 T

D、E、P 和 N

可使用常规技术来制备编码修饰序列的 DNA 分子。例如,可

利用常规的 DNA 合成、定点诱变和重组 DNA 技术予以制备。合适的技术如 Sambrook 等所述 (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY。可以用含衍生性序列的蛋白质很容易地检验柔红霉素 14-羟化酶的活性, 例如可利用下列实施例中的方法。

为了使本发明的 DNA 分子编码的柔红霉素 14-羟化酶得到表达, DNA 可携带其自身的转录控制序列, 特别是其自身的启动子, 后者可操作性联接在编码序列上并被宿主细胞 RNA 聚合酶所识别。另外, DNA 可以正确的方式联接至异源转录控制序列上, 或在适当靠近载体的转录控制序列的限制性位点处克隆入载体。

编码柔红霉素 14-羟化酶的 DNA 分子可以是一重组 DNA 克隆或表达载体。可以使用含有可加入一或多个其它 DNA 片断的 DNA 分子的任何自复制和/或整合剂。不过, 载体通常为质粒。优选质粒为高拷贝数质粒 pWHM3 或 pIJ702 [Katz 等., *J. Gen. Microbiol.* 129:2703 (1983)]。其它适宜的质粒为 pIJ 385 [Mayeri 等., *J. Bacteriol.* 172:6061 (1990)]、pIJ 680 [Hopwood 等., *Genetic Manipulation of streptomyces. A Laboratory Manual*, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985]、pWHM 601 [Guilfoile and Hufchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8553 (1991)] 或 pSET 152 [Bierman 等., *Gene* 116:43-49 (1992)]。可使用任何适宜的技术把 DNA 插入到载体中。可通过把 DNA 在适当的限制性位点处联接至线性载体中而实现插入。为此, 可使用粘性或钝末端、均聚体加尾直接配合, 或利用接头或衔接分子。

重组载体可用来转化或转染适宜的宿主细胞。宿主细胞可以是柔红霉素或阿霉素敏感性细胞(即在有一定数量柔红霉素或阿霉素的条件下不能生长), 或者是柔红霉素或阿霉素抗性细胞。宿主可以是微生物, 如细菌。因而可使波赛链霉菌、特别是波赛链霉菌 *dnrN* 及其它链霉菌菌株(其可以或不产生 anthracyclines) 分别得到转化。链霉菌菌株的转化体一般由原生质体转化而得到。载体可表达在非链霉菌中, 如在大肠杆菌之中。

可使用由转化宿主得到的柔红霉素 14-羟化酶蛋白质来把柔红霉素生物转化为阿霉素。该方法使得制备高纯度阿霉素成为可能,其起始于由发酵方法产生并含有柔红霉素的一种细胞提取物。

可直接使用游离式固定化转化细胞或通过分离柔红霉素 14-羟化酶蛋白质来实施生物转化过程,蛋白质可以游离态使用或按已有技术利用离子键或共价键固定在于树脂、玻璃、纤维素上,或相似物质上,或嫁接在可渗透至底物的纤维或通过交联而使其不溶。柔红霉素 14-羟化酶蛋白质可用于粗细胞提取物中。本发明中的重组载体也可用于转化能产生柔红霉素的适当的宿主细胞,以便能加强柔红霉素向阿霉素的生物转化。宿主细胞可以是柔红霉素或阿霉素抗性细胞,即在任意量的柔红霉素或阿霉素条件下其可以生长。因而波赛链霉菌菌株、特别是波赛链霉菌 29050 及其它可产生 anthracyclines 的链霉菌菌株可得到转化。通常可通过原生质体转化作用而得到链霉菌菌株的转化体。

本发明包括产生阿霉素的方法,该方法包括:

- (i) 在柔红霉素存在的条件下,对用本发明载体所转化或转染的宿主细胞进行培养,培养条件为能使柔红霉素转化为阿霉素,以及
- (ii) 从培养物中分离出阿霉素。

在该方法中,在 20—40℃ 下(如 30—37℃)对宿主细胞进行培养。在柔红霉素存在的条件下培养持续时间为 6—96 小时,如 12—72 小时。最好在搅拌条件下进行培养。培养物中柔红霉素的浓度为 2—200 $\mu\text{g}/\text{ml}$,如 10—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。可在培养开始时向培养基中加入柔红霉素或在培养期间由宿主细胞生产出柔红霉素。

本发明的 DNA 分子可得自波赛链霉菌 29050 的基因组 DNA。该菌株已保藏在 the American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, 保藏号为 ATCC 29050。还可以使用得自波赛链霉菌 29050 的菌株(如波赛链霉菌 27952),其通常也可把柔红霉素转化为阿霉素。DNA 分子因而可通过下述方法得到:

- (a) 制备出波赛链霉菌 29050 或其衍生菌株的基因组 DNA 文库;

- (b) 从文库中选择出有能力把柔红霉素转化为阿霉素的克隆;
- (c) 从选择出的克隆中分离出本发明的 DNA 分子。

在步骤(a)中可通过部分消化波赛链霉菌 29050 或其衍生菌株的基因组 DNA 来制备出文库;或者通过筛选已富集化或专门含有柔红霉素生物合成基因族的波赛链霉菌基因组 DNA 文库来制备文库。限制性内切酶 MboI 优选用于基因组 DNA,而对于含柔红霉素生物合成基因族的文库来说,优选使用限制性内切酶 BamHI 或 SphI。如此得到的 DNA 片断可进行大小分级;大小在 3—5kb 的片断最好用于基因组 DNA,而 13.5kb 的 BamHI 或 3.4—4.9kb 的 SphI 则用于得自含柔红霉素生物合成基因族的文库的 DNA 片断。把这些片断联接至线性化载体中,例如 pWHM3、pIJ702 或 pKC505 [M. A. Richardson 等, Gene 61:231 (1987)]。用联接混合物来转化宿主细胞。通常,宿主细胞不能产生柔红霉素,并可以是柔红霉素及阿霉素敏感性的;例如,对每 ml 中的 10 微克或以下的柔红霉素或阿霉素为敏感性的。比如,可转化变铅青链霉菌 JI 1326 原生质体 (Hopwood 等, Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985)。

在步骤(b)中,对所得转化体进行吸收柔红霉素、将其转化成阿霉素和分泌阿霉素能力的筛选。通过对含柔红霉素的培养基提取物中阿霉素存在的色谱分析,来检验能将柔红霉素转化为阿霉素的克隆。对这种克隆进行分离,对其中含有的重组载体进行提取。步骤(c)中,在用适宜的限制性内切酶消化重组载体时,可对插入每一载体的波赛链霉菌 29050 DNA 进行鉴定、测量大小及图谱测定。这样,就可核对出该载体含有本发明的 DNA 分子。

另外,还可分离出两种或多种重叠插入子,其全部或部分地属于本发明的 DNA。它们可通过在一共同限制性位点的裂解及随后的联接而相互融合,以得到本发明的 DNA,如果需要的话则使用适宜的限制性内切酶进行长度配对。也可以用适宜的限制性内切酶来裂解插入 DNA,在步骤 c 中得到一插入 DNA 的限制性片断,所述插入 DNA 含有编码柔红霉素 14-羟化酶蛋白质的基因。

下列实施例可阐述本发明。

在附图中：

图1表示本发明的DNA的限制性图谱。这是重组质粒 pIS70 中的一个插入子，其构建方法是通过将一个含柔红霉素 14-羟化酶 (dxrA) 基因的 3.4kb SphI DNA 片断(通过用 SphI 对其部分消化而从重组质粒 pIS62 中得到)插入到 pWHM3 质粒(一个大肠杆菌—链霉菌穿梭载体的 SphI 位点而构造的 [Vara 等, J. Bacteriol, 171: 5872 (1989)]。图1中的图谱并不必提供 DNA 片断中所有限制性位点的详细目录。不过，所报导的位点已足以清晰识别这些片断。

图2也显示出本发明的DNA的限制性图谱。这是一个重组质粒 pWHM 969 中的插入子，其构建方法是将一个 1.33kb 的 NdeI/BamHI DNA 片断(经定点诱变而得自 pIS 70 的 1.36kb KpnI/BamHI DNA 片断)插入 pET14B 大肠杆菌表达质粒载体的 NdeI 及 BamHI 位点 [Novagen, Madison, WI]。特别是，通过对柔红霉素-14-羟化酶基因的 GTG 启动密码子以及紧靠在该起始密码子之前的两个核苷酸进行诱变，把 NdeI 限制性位点(5'-CAT ATG-3') 插入到 1.36kb KpnI/BamHI DNA 片断之中，以便能再生出 NdeI 限制性内切酶所识别的靶序列。为了能使柔红霉素-14-羟化酶基因在大肠杆菌中有效表达，根据大肠杆菌的密码子使用对 SEQ ID No: 1 中所示野生型序列适宜地进行诱变。图2所示的图谱不必提供 DNA 片断中所有限制性位点的详细目录。不过，所报导的位点已足以清晰识别这些片断。

图3是经 dxr A 表达载体的转化并由 IPTG 诱发 4 小时的大肠杆菌中得到的细胞提取物的 Comassie 色 SDS—聚丙烯酰胺凝胶。卷 1, 经表达载体 pWHM 969 转化的大肠杆菌(DxrA 分子量: 42, 280); 卷 2, 经 pET-14b 转化的大肠杆菌(阴性对照); 卷 3, 分子量标准。

材料与方法

细菌菌种及质粒: 把对氯苄青霉素及阿泊拉霉素敏感的大肠杆菌菌株 DH5 α 用于 DNA 片断的亚克隆化。把变铅青链霉素 ZX1

[Zhou 等, *Nucleic Acids Res.*, 16:4341 (1988)]及波赛链霉菌 *dnrN* [S. L. Otten, J. Ferguson and C. R. Hutchinson, *J. Bacteriol.*, 177:1216-1224 (1995)]用于 *dxrA* 基因的表达。质粒克隆载体为 pUC 18/19 [Yansch-Perron 等, *Gene* 33:103 (1985)]及 pWHM3 [Vara 等, *J. Bacteriol.* 171:5872 (1989)]。

培养基及缓冲液:把大肠杆菌 DH5 α 保持在 LB 琼脂上 (Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。当选择转化体时,将氨基青霉素或阿泊拉霉素加入,浓度分别为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。把变铅青链霉菌保持在 R2YE 琼脂上 (Hopwood 等, *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual*, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985),用于孢子的制备以及原生质体的再生。

亚克隆化 DNA 片断:用适宜的限制性内切酶消化 DNA 样品,并以标准法在琼脂糖凝胶上分离 (Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor NY, 1989)。从凝胶上把含欲研究物的 DNA 片断的琼脂糖切片剪下,利用 GENE CLEAN 设备 (Bio101, La Jolla, CA) 或相当设备从这些切片中分离出 DNA。运用标准技术 (Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)把所分离的 DNA 片断分别亚克隆入大肠杆菌中和用于表达及生物转化试验的大肠杆菌/链霉菌穿梭载体中。

链霉菌菌种及大肠杆菌的转化作用:利用 CaCl_2 方法制备大肠杆菌的感受态细胞 (Sambrook 等, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989),并用标准技术进行转化 (Sambrook 等, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。变铅青链霉菌 ZX1 菌丝体在 YEME 培养基上生长 (Hopwood 等, *Genetic Manipulation of Streptomyces. A Labora-*

tory Manual, John, Innes Foundation, Norwich, UK, 1985), 48 小时后进行收获。用 10.3% 的蔗糖溶液将菌丝体粒状沉淀物冲洗两次, 并根据 Hopwood 手册中描述的方法来制备原生质体 (Hopwood 等, Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985)。把原生质体粒状沉淀物悬浮在约 300 μ l 的 P 缓冲液中 (Hopwood 等, Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985), 将 50 μ l 该悬浮液的等分试样用于每一次转化作用。根据 Hopwood 等人的小规模转化方法, 用质粒 DNA 对原生质体进行转化 (Hopwood 等, Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, UK, 1985)。在 R2YE 培养上再生培养 (温度 30 $^{\circ}$ C) 17 小时之后, 用 50 μ g/ml 的硫链丝菌肽覆盖平板, 任其在 30 $^{\circ}$ C 下生长直至孢子形成。

柔红霉素向阿霉素的生物转化

将含有本发明质粒的变铅青链霉菌 ZX1 及波赛链霉菌 dnrN 转化体接种至含 10 μ g/ml 硫链丝菌肽的液体 R2YE 培养基中。在 30 $^{\circ}$ C 下生长两天之后, 将 2.5ml 该培养物转移至含 25 μ g/ml 硫链丝菌肽的 25ml 生产培养基中 [MC Gurire 等, Process Biochem. 14:2-5 (1979)]。30 $^{\circ}$ C 下将培养物在置于旋转振荡器 (280rpm) 上的锥形瓶中生长 72 小时, 其后, 把柔红霉素 (5mg/ml 水溶液) 加入 10ml 该培养物中以达到终浓度为 20 μ g/ml。在振荡器上进一步培养 24 小时之后, 加入 25mg/ml 草酸以水解 anthracyclines 代谢物的糖苷形式, 之后, 把培养物在水浴中培养 60 分钟, 温度条件为 55 $^{\circ}$ C。把培养物置于旋转振荡器上 (280rpm), 在 30 $^{\circ}$ C 条件下用 10ml 乙腈: 甲醇 (1:1) 从其中提取代谢物 30 分钟。将提取物过滤, 用反相高压液相色谱法 (RP-HPLC) 来分析过滤物。使用 Vydac C18 柱 (4.6 \times 250mm; 5 μ M 颗粒大小) 来实施反相高压液相色谱法, 流速为 0.385ml/分钟。流动相 A 为在水中的 0.1% 三氟乙酸 (TFA, 来自 Pierce Chemical Co.), 流动相 B 为乙腈中的 0.078% TFA (来自 J. T. Baker Chemical Co.)。用相 A 中 20—60% 相 B 的线性梯度进行洗脱, 时间为 33 分

钟,用 488nm 二极管阵列检测装置进行监测(带宽 12 μ m)。用柔红霉素及阿霉素(10 μ g/ml 甲醇液)做为外标来定量测定分离自培养物的这些代谢物的量。

实施例 1

编码柔红霉素 14-羟化酶的 dxrA 基因的克隆化

对 Stutzman - Engwall 及 Hutchison 所述的多种粘粒克隆 [(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3135 (1989))] 例如 pWHM337 及 pWHM338, 或者类似菌种中得到的相似克隆(分别代表波赛链霉菌 29050 基因组 DNA 的约 20—90kb), 用 BamHI 部分消化, 结合 DNAs 并再联接, 把所生成的质粒混合物(含 pKC505 载体或等同载体, 其在大肠杆菌及链霉菌菌种中都具复制能力)用于转化大肠杆菌 DH5 达到阿泊拉霉素抗性(或达到适于选择所用载体的抗性)。把来自 16 种阿泊拉霉素抗性大肠杆菌克隆的质粒 DNAs 引入变铅青链霉菌 ZX1 中, 依据材料及方法部分中所述的方法来转化体的柔红霉素向阿霉素的生物转化。从将所加入的柔红霉素的 3% 转变为阿霉素的转化体中分离出质粒 pIS23, 发现其含有包括图 1 所示的限制性图谱区域的一段 13.5kb 插入子。将 pIS23 中的插入子用于亚克隆一段 4.9kb Bgl II / Cla I DNA 片断至 BamHI 及 AccI 消化过的 pUC18 中。从所生成的质粒中得到 4.9kb EcoRI/Hind III 片断, 并亚克隆入 EcoRI 及 Hind III 消化过的 pWHM3 中以得到质粒 pIS62。如材料与方法部分所述来制备变铅青链霉菌 ZX1(pIS62)转化体, 并检测其柔红霉素向阿霉素的生物转化能力。其可以把所加入柔红霉素的高达 16% 转化为阿霉素。把 pIS62 中 3.4kb SphI DNA 片断克隆至 pWHM3 的 SphI 位点以得到质粒 pIS70(图 1)。依据材料与方法部分所述来制备变铅青链霉菌 ZX1(pIS70)转化体, 并检测其柔红霉素向阿霉素的生物转化能力。其可以把所加入的柔红霉素的高达 22% 转化为阿霉素。

实施例 2

利用含柔红霉素 14-羟化酶但缺少其它柔红霉素基因产物的细胞来把柔红霉素转化为阿霉素

依据材料与方法部分所述的方法,利用硫链丝菌肽抗性的选择,以转化作用把 pIS62 及 pIS70 质粒导入波赛链霉素 dnrN 菌种中。检测所生成的波赛链霉素 dnrN(pIS62)转化体把柔红霉素生物转化为阿霉素的能力。其可以把所加入的柔红霉素的高达 58% 转变为阿霉素。检测所生成的波赛链霉素 dnrN(pIS70)转化体把柔红霉素生物转化为阿霉素的活力。其可以把所加入的柔红霉素的 100% 转化为阿霉素。

实施例 3

大肠杆菌中 DxrA 的表达

表达载体 pET-14b(商业来源 Novagen - Madison, WI)依据的是 T7 启动子驱动系统。当使用限制性位点 NaeI 时, pET-14b 使在 N 末端与 His-Tag 相融合的克隆蛋白质得以表达。

来自含有整体 dxrA 基因的载体 pIS70(图 1)的 1373bp KpnI - Bam HI 片断克隆入 pUC19 中[Yanish - Perron C 等, (1985) Gene: 33, 103—119]。从所生成的质粒中去除 Sal I - BamHI 片断并连接到利用两个合成的寡核苷酸(51-mer Seq. ID NO. 3 及 59-mer seq. ID.No.4)制备的 KpnI - Sal I 接头上,以使 dxrA 的第一个密码子转变为 ATG(其产生 Nde I 位点),而使第 4、第 6 及第 7 密码子的第 3 部位转变为能在高度表达的大肠杆菌基因中反映最常用的密码子,做为一种提高 dxrA 表达之手段。把所生成的 Nde I - BamHI 片断克隆入 pET-14b 中。

用于 dxrA 基因表达的大肠杆菌宿主是菌种 BL21 的 λ DE3 溶源菌(商用来源 Novagen - Madison WI)。依据下列程序,通过加入 IPTG 来诱导 dxrA 的表达。从新近划线的平板 pWHM 969 (图 2)中简单菌落性地接种 100ml 2xYT 及氨苄青霉素(50 μ g/ml)。细胞在 30 $^{\circ}$ C 条件下生长直至 OD₆₀₀ = 0.4 - 1.0。加入 4mM IPTG 来诱导 dxrA 的表达,连续培养 3-4 小时。

在微离心机中以 14,000rpm 离心 0.5ml 培养物,时间 1 分钟,弃置上清液,将粒状沉淀物再悬浮于 50 μ l 的 Laemmli 缓冲液中 [Laemmli, Nature (London), 227:680 (1970)], 并煮沸 5 分钟。在

10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上对煮沸样品中含有的蛋白质进行分析(图 3), 方法为标准法 [Laemmli, Nature (London), 227: 680 (1970)], 是通过与不含 dxrA 基因的 pET14b 载体相比较而进行的。

柔红霉素 14-羟化酶蛋白质在 Mr42,280 处发生移动。

_ 序列一览表

(1) 一般资料

(i) 申请人：

- (A) 姓名：PHARMACIA S.P.A.
 (B) 街道：VIA KOCH 1.2
 (C) 城市：米兰
 (E) 国家：意大利
 (F) 邮编 (ZIP)：20152
 (G) 电话 (NE)：*39-2-48385045
 (H) 电传：*39-2-48300578

(ii) 发明标题：制备阿霉素的方法

(iii) 序列数目：4

(iv) 计算机可读形式

- (A) 媒介类型：软盘
 (B) 计算机：IBM 兼容机
 (C) 操作系统：PC-DOS/MS-DOS
 (D) 软件：PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) SEQ ID NO: 1 资料

(i) 序列特性

- (A) 长度：1269 个碱基对
 (B) 类型：核酸
 (C) 链况：双链
 (D) 拓扑：线性

(ix) 特点：

- (A) 名称/检索：CDS
 (B) 位置：1..1269

(xi) 序列描述：SEQ ID NO: 1:

GTG AGC GGC GAG GCG CCC CGG GTG GCC GTC GAC CCG TTC GCG TGT CCC 48
 Val Ser Gly Glu Ala Pro Arg Val Ala Val Asp Pro Phe Ala Cys Pro
 1 5 10 15

ATG ATG ACC ATG CAG CGC AAG CCC GAG GTG CAC GAC GCC TTC CGG GAG Met Met Thr Met Gln Arg Lys Pro Glu Val His Asp Ala Phe Arg Glu 20 25 30	96
GCG GGC CCG GTC GTC GAG GTG AAC GCC CCC GCG GGC GGA CCC GCC TGG Ala Gly Pro Val Val Glu Val Asn Ala Pro Ala Gly Gly Pro Ala Trp 35 40 45	144
GTC ATC ACC GAT GAC GCC CTC GCC CGC GAG GTG CTG GCC GAT CCC CGG Val Ile Thr Asp Asp Ala Leu Ala Arg Glu Val Leu Ala Asp Pro Arg 50 55 60	192
TTC GTG AAG GAC CCC GAC CTC GCC CCC GCC GCC TGG CGG GGG GTG GAC Phe Val Lys Asp Pro Asp Leu Ala Pro Ala Ala Trp Arg Gly Val Asp 65 70 75 80	240
GAC GGT CTC GAC ATC CCC GTT CCG GAG CTG CGT CCG TTC ACG CTC ATC Asp Gly Leu Asp Ile Pro Val Pro Glu Leu Arg Pro Phe Thr Leu Ile 85 90 95	288
GCC GTG GAC GGC GAG GCC CAC CGG CGC CTG CGC CGC ATC CAC GCA CCT Ala Val Asp Gly Glu Ala His Arg Arg Leu Arg Arg Ile His Ala Pro 100 105 110	336
GCG TTC AAC CCG CGC CGG CTG GCC GAG CGG ACG GAT CGC ATC GCC GCG Ala Phe Asn Pro Arg Arg Leu Ala Glu Arg Thr Asp Arg Ile Ala Ala 115 120 125	384
ATC GCC GGC CGG CTG CTC ACC GAA CTC GCC GAC GCC TCC GGC CGG TCG Ile Ala Gly Arg Leu Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Ser Gly Arg Ser 130 135 140	432
GGC AAA CCG GCC GAG CTG ATC GGC GGC TTC GCG TAC CAC TTC CCG CTG Gly Lys Pro Ala Glu Leu Ile Gly Gly Phe Ala Tyr His Phe Pro Leu 145 150 155 160	480
TTG GTC ATC TGC GAG CTG CTC GGT GTG CCG GTC ACC GAT CCG GCG ATG Leu Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Val Thr Asp Pro Ala Met 165 170 175	528
GCC CGC GAG GCC GTC AGC GTT CTC AAG GCA CTC GGC CTC GGC GGC CCG Ala Arg Glu Ala Val Ser Val Leu Lys Ala Leu Gly Leu Gly Gly Pro 180 185 190	576

1.

CAG AGC GGC GGG GGT GAC GGC ACG GAC CCT GCC GGG GGC GTG CCG GAC	624
Gln Ser Gly Gly Gly Asp Gly Thr Asp Pro Ala Gly Gly Val Pro Asp	
195 200 205	
ACC TCG GCC CTG GAG AGC CTG CTC CTC GAA GCC GTG CAC TCA GCC CGG	672
Thr Ser Ala Leu Glu Ser Leu Leu Leu Glu Ala Val His Ser Ala Arg	
210 215 220	
CGG AAC GAC ACC CCG ACC ATG ACC CGC GTG CTG TAC GAG CGC GCG CAG	720
Arg Asn Asp Thr Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Tyr Glu Arg Ala Gln	
225 230 235 240	
GCC GAG TTC GGC TCG GTC TCC GAC GAC CAG CTC GTC TAC ATG ATC ACC	768
Ala Glu Phe Gly Ser Val Ser Asp Asp Gln Leu Val Tyr Met Ile Thr	
245 250 255	
GGG CTC ATC TTC GCC GGC CAC GAC ACC ACC GGC TCC TTC CTG GGC TTC	816
Gly Leu Ile Phe Ala Gly His Asp Thr Thr Gly Ser Phe Leu Gly Phe	
260 265 270	
CTG CTC GCG GAG GTC CTG GCG GGC CGC CTC GCG GCG GAT GCC GAC GAG	864
Leu Leu Ala Glu Val Leu Ala Gly Arg Leu Ala Ala Asp Ala Asp Glu	
275 280 285	
GAC GCC GTC TCC CGG TTC GTG GAG GAG GCG CTG CGC TAC CAC CCG CCG	912
Asp Ala Val Ser Arg Phe Val Glu Glu Ala Leu Arg Tyr His Pro Pro	
290 295 300	
GTG CCC TAC ACG TTG TGG AGG TTC GCT GCC ACG GAG GTG ACC ATC GGC	960
Val Pro Tyr Thr Leu Trp Arg Phe Ala Ala Thr Glu Val Thr Ile Gly	
305 310 315 320	
GGC GTC CGG CTG CCC CGC GGA GCG CCG GTG CTG GTG GAC ATC GAG GGC	1008
Gly Val Arg Leu Pro Arg Gly Ala Pro Val Leu Val Asp Ile Glu Gly	
325 330 335	
ACC AAC ACC GAC GGC CGC CAT CAC GAC GCC CCG CAC GCC TTC CAC CCG	1056
Thr Asn Thr Asp Gly Arg His His Asp Ala Pro His Ala Phe His Pro	
340 345 350	
GAC CGT CCC TCG TGG CGG CGG CTC ACC TTC GGC GAC GGG CCG CAC TAC	1104
Asp Arg Pro Ser Trp Arg Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Pro His Tyr	
355 360 365	

TGC ATC GGG GAG CAG CTC GCC CAG CTG GAG TCG CGC ACG ATG ATC GGC 1152
 Cys Ile Gly Glu Gln Leu Ala Gln Leu Glu Ser Arg Thr Met Ile Gly
 370 375 380

GTA CTG CGC AGC AGG TTC CCC GAG GCC CGA CTG GCC GTG CCG TAC GAC 1200
 Val Leu Arg Ser Arg Phe Pro Glu Ala Arg Leu Ala Val Pro Tyr Asp
 385 390 395 400

GAG TTG CGG TGG TGC CGG AAG GGG GCC CAG ACG GCG CGG CTC ACC GAA 1248
 Glu Leu Arg Trp Cys Arg Lys Gly Ala Gln Thr Ala Arg Leu Thr Glu
 405 410 415

CTG CCC GTC TGG CTG CGC TGA 1269
 Leu Pro Val Trp Leu Arg *
 420

(2) SEQ ID NO: 2 资料

(i) 序列特性

- (A) 长度: 423 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: : SEQ ID NO: 2:

Val Ser Gly Glu Ala Pro Arg Val Ala Val Asp Pro Phe Ala Cys Pro
 1 5 10 15

Met Met Thr Met Gln Arg Lys Pro Glu Val His Asp Ala Phe Arg Glu
 20 25 30

Ala Gly Pro Val Val Glu Val Asn Ala Pro Ala Gly Gly Pro Ala Trp
 35 40 45

Val Ile Thr Asp Asp Ala Leu Ala Arg Glu Val Leu Ala Asp Pro Arg
 50 55 60

Phe Val Lys Asp Pro Asp Leu Ala Pro Ala Ala Trp Arg Gly Val Asp
 65 70 75 80

Asp Gly Leu Asp Ile Pro Val Pro Glu Leu Arg Pro Phe Thr Leu Ile
 85 90 95

Ala Val Asp Gly Glu Ala His Arg Arg Leu Arg Arg Ile His Ala Pro
 100 105 110

Ala Phe Asn Pro Arg Arg Leu Ala Glu Arg Thr Asp Arg Ile Ala Ala
 115 120 125

Ile Ala Gly Arg Leu Leu Thr Glu Leu Ala Asp Ala Ser Gly Arg Ser
 130 135 140

Gly Lys Pro Ala Glu Leu Ile Gly Gly Phe Ala Tyr His Phe Pro Leu
 145 150 155 160

Leu Val Ile Cys Glu Leu Leu Gly Val Pro Val Thr Asp Pro Ala Met
 165 170 175

Ala Arg Glu Ala Val Ser Val Leu Lys Ala Leu Gly Leu Gly Gly Pro
 180 185 190

Gln Ser Gly Gly Gly Asp Gly Thr Asp Pro Ala Gly Gly Val Pro Asp
 195 200 205

Thr Ser Ala Leu Glu Ser Leu Leu Leu Glu Ala Val His Ser Ala Arg
 210 215 220

Arg Asn Asp Thr Pro Thr Met Thr Arg Val Leu Tyr Glu Arg Ala Gln
 225 230 235 240

Ala Glu Phe Gly Ser Val Ser Asp Asp Gln Leu Val Tyr Met Ile Thr
 245 250 255

Gly Leu Ile Phe Ala Gly His Asp Thr Thr Gly Ser Phe Leu Gly Phe
 260 265 270

Leu Leu Ala Glu Val Leu Ala Gly Arg Leu Ala Ala Asp Ala Asp Glu
 275 280 285

Asp Ala Val Ser Arg Phe Val Glu Glu Ala Leu Arg Tyr His Pro Pro
 290 295 300

Val Pro Tyr Thr Leu Trp Arg Phe Ala Ala Thr Glu Val Thr Ile Gly
 305 310 315 320

Gly Val Arg Leu Pro Arg Gly Ala Pro Val Leu Val Asp Ile Glu Gly
 325 330 335

Thr Asn Thr Asp Gly Arg His His Asp Ala Pro His Ala Phe His Pro
 340 345 350

Asp Arg Pro Ser Trp Arg Arg Leu Thr Phe Gly Asp Gly Pro His Tyr
 355 360 365

Cys Ile Gly Glu Gln Leu Ala Gln Leu Glu Ser Arg Thr Met Ile Gly
 370 375 380

Val Leu Arg Ser Arg Phe Pro Glu Ala Arg Leu Ala Val Pro Tyr Asp
 385 390 395 400

Glu Leu Arg Trp Cys Arg Lys Gly Ala Gln Thr Ala Arg Leu Thr Glu
 405 410 415

Leu Pro Val Trp Leu Arg *
 420

(2) **SEQ ID NO: 3** 资料

(i) 序列特性

- (A) 长度: 51个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链况: 单链
- (D) 拓扑: 线性

(xi) 序列描述 : SEQ ID NO: 3:

CCCGCGGCGG CGGGCGGTGC CATATGAGCG GCGAAGCGCC GCGTGTGGCC G 51

(2) **SEQ ID NO: 4** 资料

(i) 序列特性

- (A) 长度: 59个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (C) 链况: 单链
- (D) 拓扑: 线性

(xi) 序列描述 SEQ ID NO: 4:

TCGACGGCCA CACGCGGCGC TTCGCCGCTC ATATGGCACC GCCCGCCGCC GCGGGGTAC 59

图.1

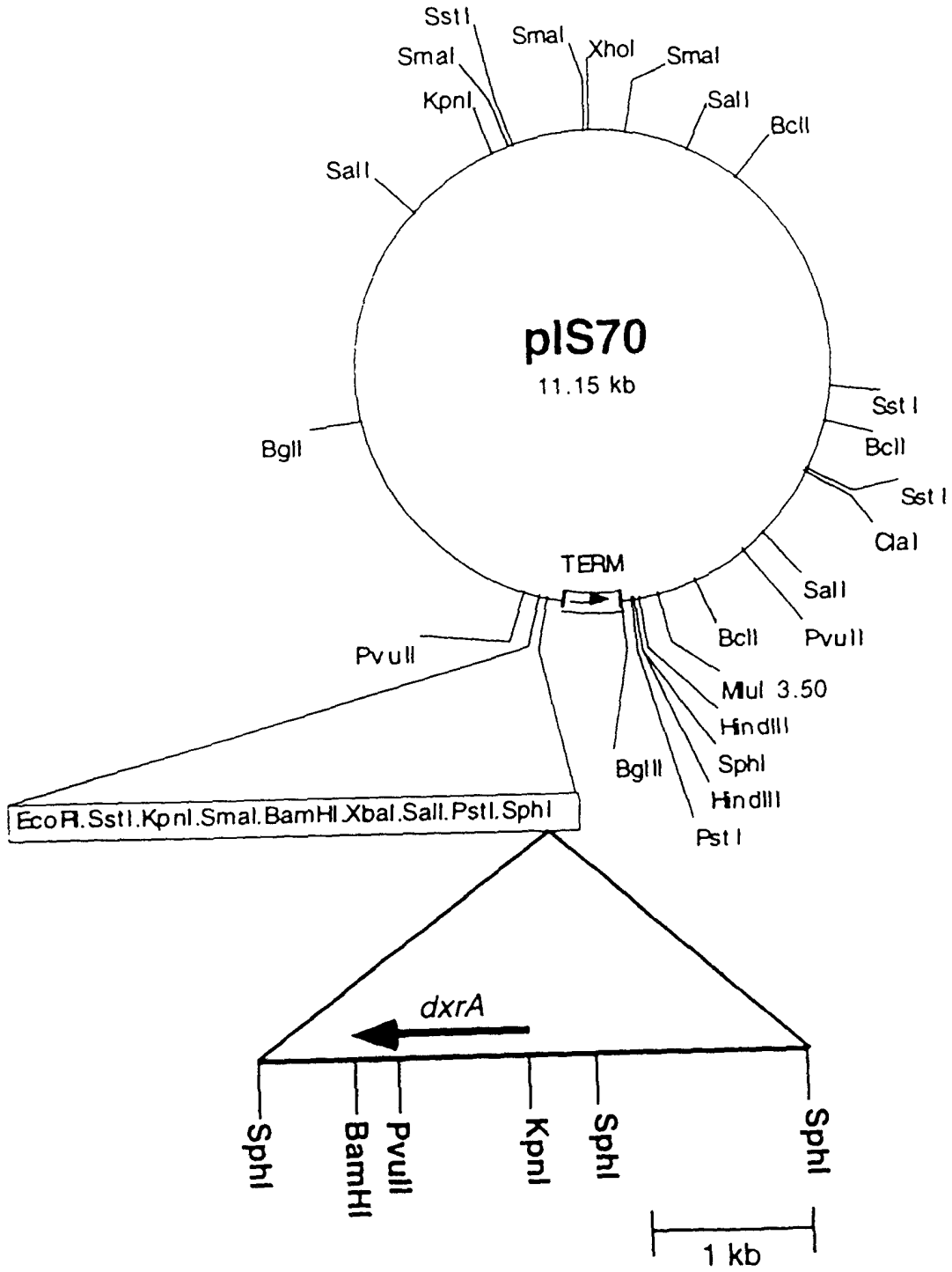
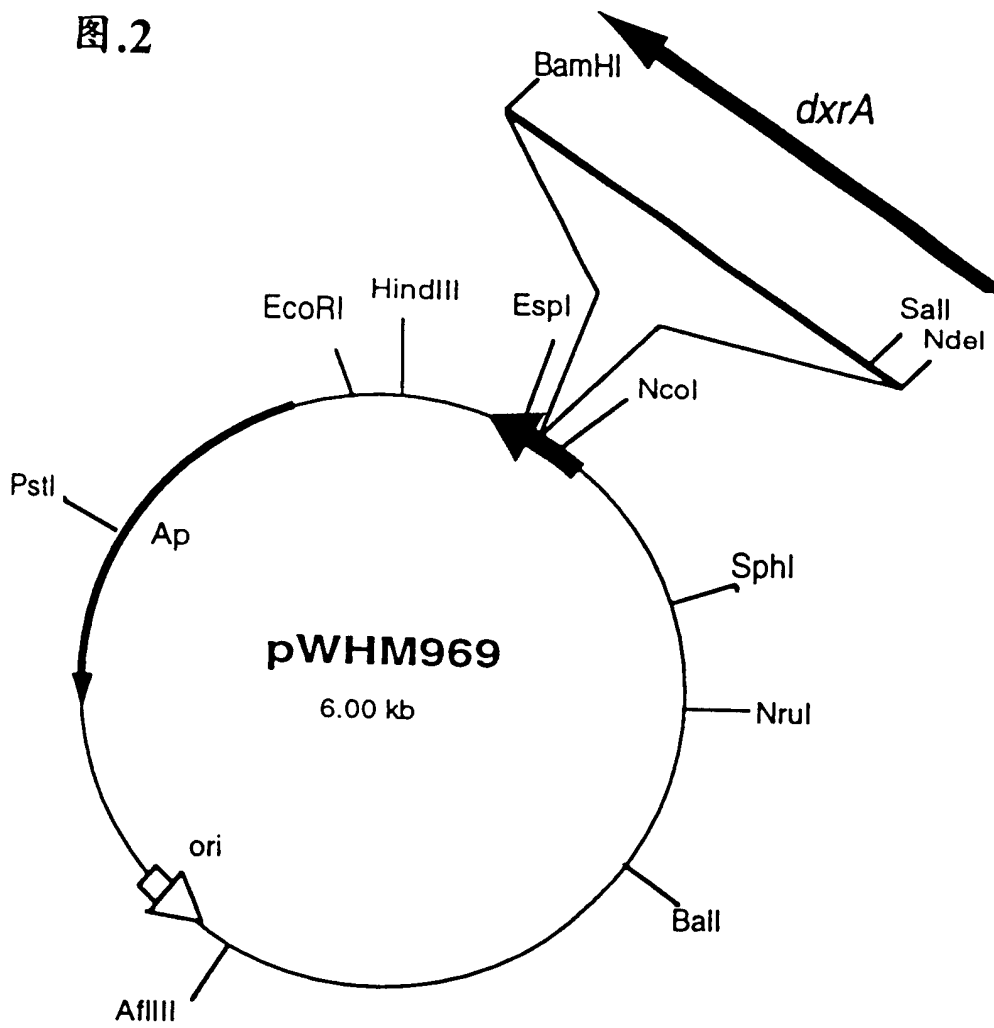


图.2



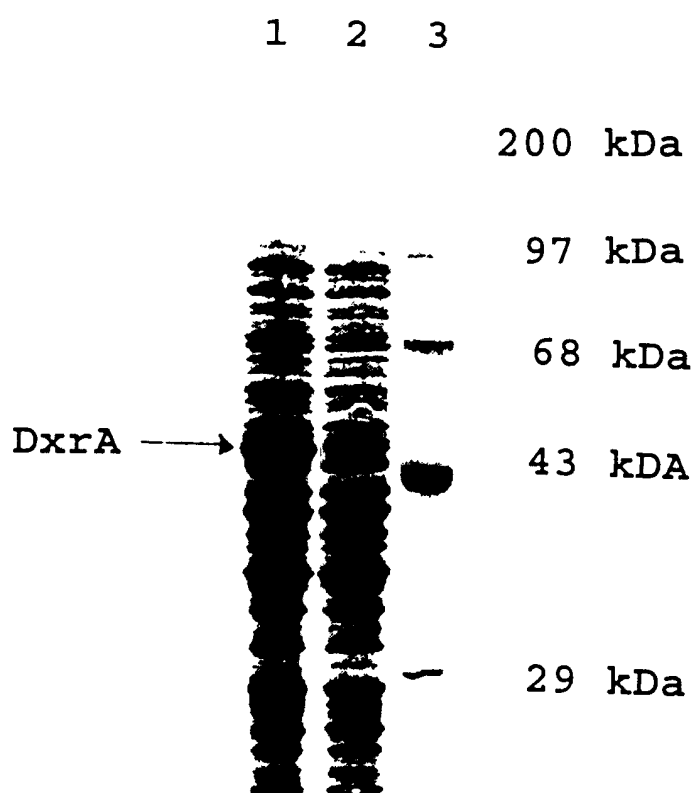


图.3