

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.⁷
C12P 17/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94106430.1

[43] 授权公告日 2003 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1110565C

[22] 申请日 1994.6.10 [21] 申请号 94106430.1

[30] 优先权

[32] 1993. 6. 15 [33] US [31] 077979

[32] 1993. 6. 15 [33] US [31] 077980

[71] 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

审查员 杨 帆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 41 页

[54] 发明名称 制备带羟基或酰氧基的紫杉烷的酶方法及其应用

[57] 摘要

酶水解方法, 其中使一种或多种 C—10(或 C—13)带酰氧基的紫杉烷与一种能够水解所述酰氧基为羟基的酶或微生物接触。还提供一种酶酯化方法, 其中使一种或多种 C—10 带羟基的紫杉烷与酰化剂及一种能够酯化所述羟基成为酰氧基的酶或微生物接触。这些方法在制备可作为制备紫杉烷, 如紫杉醇的中间体的化合物时是特别有用的。

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

1. 一种选择微生物的方法，此微生物在与 C-13 直接连有酰氧基的紫杉烷接触时，能够水解所说的酰氧基以形成 C-13 上直接连接的羟基，包括步骤：

(a) 选择一种固体生长培养基(i)使被筛选的微生物在其中生长，(ii)使 C-13 带酰氧基的起始紫杉烷在其中不溶，因此，与生长培养基的混合物具有浑浊的外观及(iii)使所需的 C-13 上带羟基的紫杉烷产物及任选所需的断裂的 C-13 侧链产物在其中可溶，因此，与生长培养基形成的混合物具有透明的外观；

(b) 将微生物与上述步骤(a)中选择的生长培养基接触，在其中混合有 C-13 上带酰氧基的起始紫杉烷，并置于允许微生物生长的条件下；和

(c) 观察在微生物生长的区域周围是否有一个表明所说的微生物能够进行所说的水解的清晰的边界。

2. 一种选择微生物的方法，当此微生物与 C-13 上直接连有酰氧基的紫杉烷接触时，能够水解所说的酰氧基形成 C-13 上直接连接的羟基，该方法包括下列步骤：

(a) 选择一个固体生长培养基(i)使被筛选的微生物在其中生长，(ii)使 C-13 上带酰氧基的起始紫杉烷在其中可溶，因此，与生长培养基的混合物具有透明的外观，及(iii)使所需的 C-13 上带羟基的紫杉烷产物及任选所需的断裂的 C-13 侧链产物在其中不溶，因此与生长培养基形成的混合物具有浑浊的外观；

(b) 将微生物与上述步骤(a)中选择的生长培养基接触，在其中混合有 C-13 上带酰氧基的起始紫杉烷，并置于允许微生物生长的条件下；和

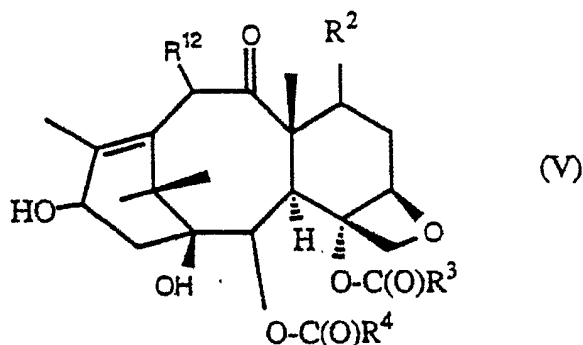
(c) 观察在微生物生长的区域周围是否有一个表明所说的微生物能够进行所说的水解的浑浊的边界。

3. 按照权利要求 1 的方法制备的微生物。

4. 按照权利要求 2 的方法制备的微生物。

5. 制备至少一种在 C-13 上直接连有羟基的紫杉烷的方法，包括使至少一种在 C-13 上直接连有酰氧基的紫杉烷与权利要求 3 或 4 的微生物接触，并实现所说的水解。

6. 按照权利要求 5 的方法，其中制备至少一种具有下列式 V 的 C-13 上带羟基的紫杉烷或其盐：



其中

R^{12} 是氢、羟基、 R^5-O- 、 $R^6-C(O)-O-$ 或 $R^6-O-C(O)-O-$ ；

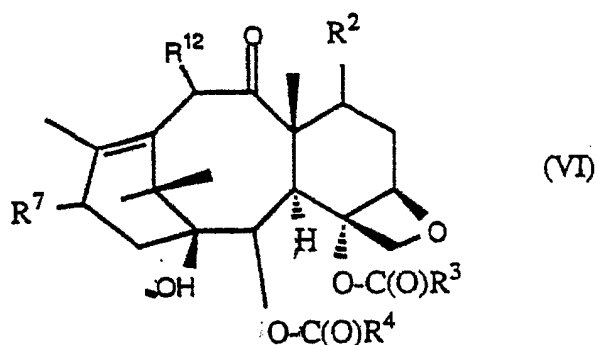
R^2 是氢、羟基、氟、 R^5-O- 、木糖基、 $R^6-C(O)-O-$ 或 $R^6-O-C(O)-O-$ ；

R^3 和 R^4 各自是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环；

R^5 是羟基保护基；及

R^6 是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环；

包括使具有下列结构式 VI 的至少一种 C-13 上带酰氧基的紫杉烷或其盐与所述酶或微生物接触，



其中, R^{12} 、 R^2 、 R^3 和 R^4 定义如前, 且 R^7 为酰氧基。

7. 按照权利要求 6 的方法, 其中所述具有式 VI 结构的紫杉烷是三尖杉宁碱、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰基紫杉醇、7-木糖基紫杉醇、紫杉醇-C 和/或紫杉醇, 所述具有式 V 结构的紫杉烷是浆果赤霉素 III、10-脱乙酰浆果赤霉素 III、7-木糖基-10-脱乙酰浆果赤霉素 III 和/或 7-木糖基浆果赤霉素 III。

8. 按照权利要求 6 的方法, 其中用于所述水解方法的带酰氧基的紫杉烷起始物包括在 C-13 上有不同侧链的带酰氧基的紫杉烷混合物。

9. 按照权利要求 8 的方法, 其中紫杉烷混合物得自植物组织的植物细胞培养物和/或植物组织提取物, 其中所说的植物是紫杉属植物。

10. 按照权利要求 5 的方法, 其中所用微生物是下列菌属之一: 类诺卡氏菌属、诺卡氏菌属、红球菌属、小多孢菌属、糖多孢菌属、假诺卡氏菌属、厄氏菌属、原小单孢菌属或间孢囊菌属。

11. 按照权利要求 10 的方法, 其中所用微生物属于类诺卡氏菌属。

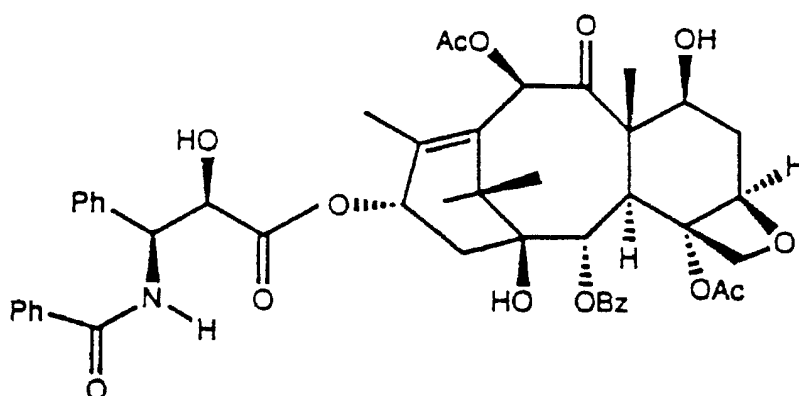
12. 按照权利要求 11 的方法, 其中所述微生物选自白色类诺卡氏菌、黄色类诺卡氏菌、暗黄色类诺卡氏菌、橙黄色类诺卡氏菌、单纯类诺卡氏菌及嗜热丁香色类诺卡氏菌。

制备带羟基或酰氧基的 紫杉烷的酶方法及其应用

本发明涉及一种制备 C-10 带羟基的紫杉烷的酶水解法，和一种制备 C-10 带酰氧基的紫杉烷的酶酯化法，这些化合物可用做制备有药理活性的紫杉烷类（如紫杉醇及紫杉醇类似物）的中间体。

本发明还涉及一种制备 C-13 带羟基的紫杉烷的酶水解法，紫杉烷可作为制备 C-13 带酰氧基的紫杉烷的中间体，特别是用于制备紫杉醇及紫杉醇类似物。

紫杉烷是在药学领域中有实用价值的二萜烯化合物。例如，已发现具有如下结构的紫杉烷-紫杉醇是一种有效的抗癌剂。



其中 P h 是苯基，A c 是乙酰基，B z 是苯甲酰基。

天然存在的紫杉烷类，如紫杉醇，可在植物材料中找到并已从中分离出来。但这种紫杉烷类在植物中只以相对小量存在，以至于需要大量缓慢生长的紫杉树作为所需化合物如紫杉醇的来源。因此本领域仍在继续寻找制备天然存在的紫杉烷类如紫杉醇及其类似物的合成和半合成路线。

由于紫杉烷环结构的复杂性，在环系统中含所需取代基的紫杉烷可使用已具有紫杉烷基本环结构的起始材料较容易地制备。因此，可将含紫杉烷环结构并在C-13含羟基的化合物，特别是在C-10含所需取代基的化合物，与一个中间体化合物相偶联以形成C-13含所需侧链的紫杉烷，例如以紫杉醇及其类似物为代表的C-13带酰氧基侧链的有药理活性的紫杉烷。

本发明提供获得C-10带所需取代基的紫杉烷的方法。本发明特别提供制备C-10带羟基和C-10带酰氧基的紫杉烷的方法。这些化合物在制备紫杉烷如紫杉醇及其类似物时是有用的起始物。

在一实施方案中，本发明提供一种制备至少一种在C-10直接连接有羟基的紫杉烷的方法，包括使C-10直接连接酰氧基的紫杉烷与一种能够催化酰氧基水解为羟基的酶或微生物接触，并实现水解。

在另一实施方案中，本发明提供一种制备至少一种在C-10直接连接酰氧基的紫杉烷的方法，包括使C-10直接连接羟基的紫杉烷与酰化剂和能够催化羟基酯化为酰氧基的酶或微生物接触，并实现所说的酯化。

本发明还提供一种制备C-13带羟基的紫杉烷化合物的方法，这些化合物在制备C-13含所需侧链的紫杉烷时是有用的起始物。

本发明特别提供一种制备至少一种在C-13直接连接羟基的紫

杉烷的方法，包括使 C-13 直接连接酰氧基的紫杉烷与能够催化酰氧基水解为羟基的酶或微生物接触，并实现所说的水解。

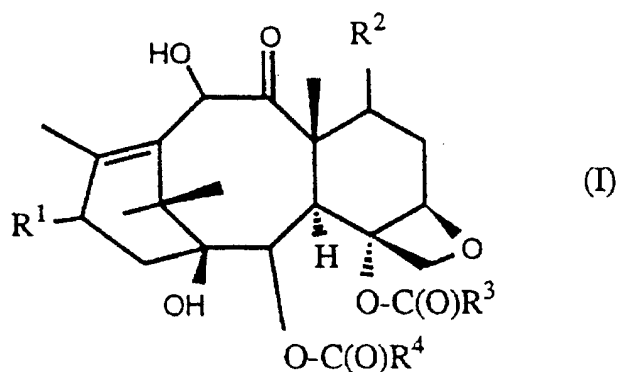
本发明提供从 C-10 带酰氧基的紫杉烷制备 C-10 带羟基之紫杉烷，从 C-10 带羟基的紫杉烷制备 C-10 带酰氧基之紫杉烷的有效方法。按照本发明，单体紫杉烷可被水解，不同紫杉烷的混合物可相继或同时被水解；同样，按照本发明单体紫杉烷可被酯化，不同紫杉烷的混合物也可相继或同时被酯化。

本发明还提供一种从 C-13 带酰氧基的紫杉烷制备 C-13 带羟基之紫杉烷的有效方法。按照本发明，单体紫杉烷可被水解，或不同紫杉烷的混合物也可相继或同时被水解。

对本发明进一步说明如下。

C-10 的水解

在优选实施方案中，本发明提供一种制备有下列结构式 I 的至少一种 C-10 带羟基的紫杉烷或其盐的方法：



其中

R¹ 是羟基或酰氧基，尤其是其中 R¹ 具有如下所述式 III 的结构；

R^2 是氢、羟基、氟、 R^5 -O-、木糖基(Xylosyl)、 R^6 -C(O)-O-或
 R^6 -O-C(O)-O-;

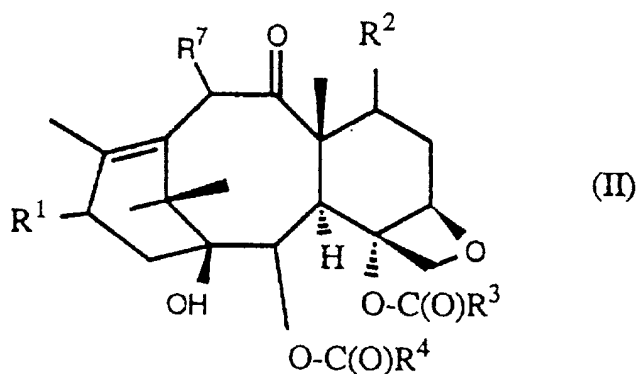
R^3 和 R^4 各自是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基
 或杂环基;

R^5 是羟基保护基; 以及

R^6 是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环;

包括使至少一种 C-10 带酰基的下列式 II 的紫杉烷或其盐与能催化

R^7 酰氧基水解为羟基的酶或微生物接触, 并实现所说的水解。



其中

R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 定义同前; R^7 是酰氧基。

本发明的水解方法中仔细考虑到了式 I 和 II 化合物非特定的手性中心的所有立体构型, 无论是单独(即, 实际上没有其它立体异构体)还是与其它立体异构体的混合物。

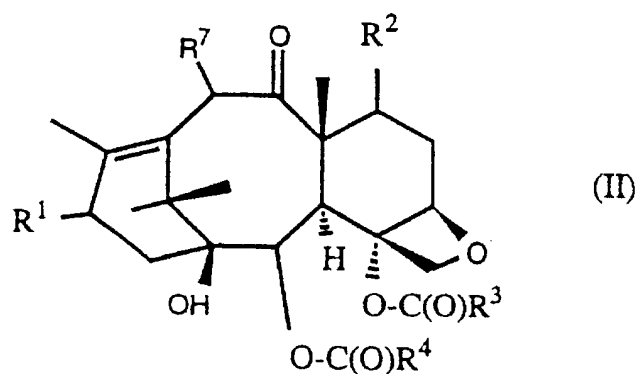
在另一优选实施方案中, 本发明提供一种制备至少一种 C-10 含所需酰氧基的紫杉烷的方法, 该方法从至少一种 C-10 含非所需酰氧基的紫杉烷出发, 通过酶水解得到 C-10 含羟基的类似物, 然后偶连上所需酰基得到前者。在该实施方案中, 本发明提供一种例如

制备 C-10 含特定酰氧基的所需紫杉烷的方法，用 C-10 带不同酰氧基的紫杉烷起始混合物（起始混合物可包括或不包括所需紫杉烷），经同时或依次水解不同的 C-10 基团得到一种或多种 C-10 含羟基的紫杉烷，然后偶联上所需的酰基。当得到 C-10 含不同酰氧基的紫杉烷混合物，如通过萃取植物材料得到紫杉醇与其它紫杉烷天然产物的混合物，并且最终所需要的是特定紫杉烷如紫杉醇时，这种优选方法是特别有用的。可经形成酰基的非酶促方法偶联酰基。例如，C-7 被保护的 10-脱乙酰浆果赤霉素 III（例如通过使 10-脱乙酰浆果赤霉素 III 与三乙基氯硅烷和咪唑在二甲基甲酰胺中反应形成三乙基甲硅烷基以保护 C-7）经与六甲基二硅基叠氮化锂的四氢呋喃溶液和氯化锂/乙酰氯在低温（如，-60 到 -70 °C）下接触使 C-10 乙酰化。另外，乙酰基的偶联可通过本文所述的酶促酯化方法来完成。

本发明的方法中，C-10 含酰氧基的起始紫杉烷的立体构型优选被保留在 C-10 含羟基的产物中。

C-10 酯化

在另一优选实施方案中，本发明提供一种制备有下列结构式 II 的至少一种 C-10 带酰氧基的紫杉烷或其盐的方法：



其中

R^1 是羟基或酰氧基, 尤其其中 R^1 具有下述式 III 的结构;

R^2 是氢、羟基、氟、 $R^5 - O -$ 、木糖基, $R^6 - C(O) - O -$
或 $R^6 - O - C(O) - O -$;

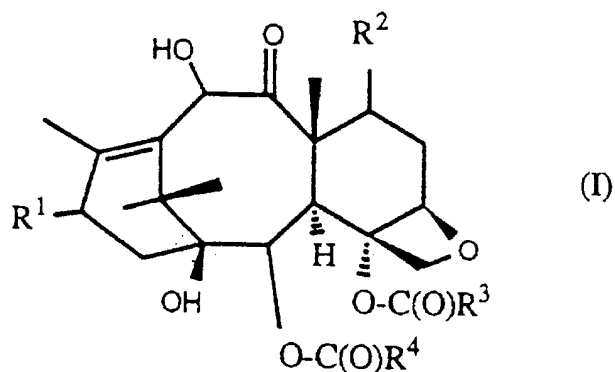
R^3 和 R^4 各自是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基
或杂环;

R^5 是羟基保护基;

R^6 是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环; 和

R^7 是酰氧基。

包括使至少一种 C-10 带羟基的下列式 I 紫杉烷或其盐与酰化剂和
能够催化 C-10 羟基酯化形成所述 R^7 酰氧基的酶或微生物接触,
并实现所说的酯化。



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 定义同前。

本发明的酯化方法中仔细考虑到了式 I 和 II 化合物中非特定手性
中心所有立体的构型, 无论是单独 (即: 实际上没有其它立体异构体)
或与其它立体异构体的混合物。

可实现本发明酯化反应的任何酰化剂均可应用。优选的酰化剂是

具有下列式IV的酰化剂：



其中

R^{11} 是烷基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基或杂环；且

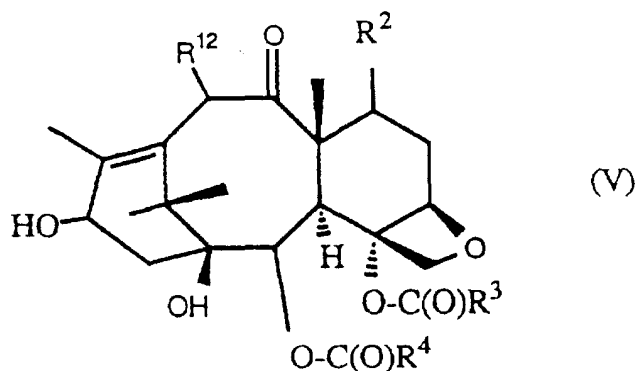
L 是可被取代形成酯基的离去基团。

式IV中优选的 R^{11} 基团是烷基，如 C_{1-8} 烷基，特别是甲基。L 基团的例子包括卤原子、羟基、烷氧基或链烯氧基。优选的 L 基团是链烯氧基，最优选的是 C_{1-8} 链烯氧基，如 $CH_2 = CH - O -$ 和 $CH_2 = C(CH_3) - O -$ 。乙酸异丙烯酯和乙酸乙烯酯是特别优选的酰化剂。

本发明的方法中，C-10 含羟基的起始紫杉烷的立体构型优选被保留在 C-10 含酰氧基的产物中。

C-13 水解

在一优选实施方案中，本发明提供一种制备至少一种 C-13 带羟基的下列式V之紫杉烷或其盐的方法：



其中

R^{12} 是氢、羟基、 $R^5 - O -$ 、 $R^6 - C(O) - O -$ 或 $R^6 - O - C(O) - O -$ ；

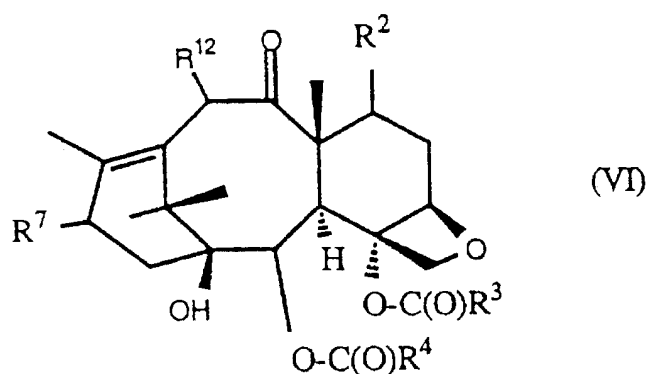
R^2 是氢、羟基、氟、 $R^5 - O -$ 、木糖基、 $R^6 - C(O) - O -$ 或
 $R^6 - O - C(O) - O -$;

R^3 和 R^4 各自是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基
 或杂环;

R^5 是羟基保护基; 且

R^6 是氢、烷基、链烯基、炔基、环烷基、环烯基、芳基或杂环;

包括使至少一种 C-13 带酰氧基的式 VI 紫杉烷或其盐与能催化 R^7
 酰氧基水解为羟基的酶或微生物接触, 并实现所说的水解。



其中 R^{12} 、 R^2 、 R^3 和 R^4 定义同前; R^7 是酰氧基。

本发明的方法中仔细考虑到了式 V 和 VI 化合物中非特定手性中心的所有立体构型, 无论是单独 (即, 实际上没有其它立体异构体) 或与其它立体异构体的混合物。

在另一优选实施方案中, 本发明提供一种制备至少一种 C-13 含所需酰氧基侧链之紫杉烷的方法, 该方法从至少一种 C-13 含非所需酰氧基侧链的紫杉烷开始, 经酶水解得到至少一种 C-13 含羟基的类似物, 然后偶联上所需侧链以得到前者。在该实施方案中, 本发明提供一种制备 C-13 含特定酰氧基侧链之目的紫杉烷的方法。

该方法的紫杉烷起始混合物用C-13带不同酰氧基侧链(起始混合物可包括或不包括目的紫杉烷),经同时或相继水解不同的C-13基团得到一种或多种C-13含羟基的紫杉烷,然后偶联上所需的侧链。当得到C-13含不同酰氧基侧链的紫杉混合物,如通过萃取植物材料得到紫杉醇与三尖杉宁碱和其它紫杉烷天然产物的混合物,及最终所需要的是特定紫杉烷如紫杉醇时,这种优选方法是特别有用的。

本发明的方法中,C-13含酰氧基的起始紫杉烷的立体构型优选被保留在C-13含羟基的产物中。

定义

本文所用术语“酶促工艺”或“酶促方法”是指本发明的应用酶或微生物的工艺或方法。本文所用术语“水解”是指按照本发明方法经与水和/或适宜的有机醇接触,由酰氧基基团形成羟基基团。本文所用术语“酯化”是指由羟基生成酰氧基。本文所用术语“酯化剂”是指可通过提供一个酰基基团而实现上述酯化作用的化合物。本方法中所用“酶或微生物”包括应用两种或更多,也可以是单一的酶或微生物。

本文所用术语“烷基”,当单独使用或作为另一基团的一部分时,是指任选被取代的直链及支链饱和烃基,优选在主链上含1-12个碳。未被取代的基团的例子有甲基、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。取代基的例子可包括一个或多个下述基团:卤素、烷氧基、烷硫基、链烯基、炔基、芳基、环烷基、环烯基、羟基或保护的羟基、羧基(-COOH)、烷氧羰基、烷基碳酰氧基、氨基甲酰基(NH₂-CO-),

氨基 ($-\text{NH}_2$)、单或二烷基氨基或硫羟基 ($-\text{SH}$)。

本文所用术语“低级烷基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指如上述的在主链上含有 1 至 4 个碳原子的被取代或未取代的烷基。

本文所用术语“烷氧基”或“烷硫基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指分别通过一个氧键 ($-\text{O}-$) 或一个硫键 ($-\text{S}-$) 连接的如上述的烷基。本文所用术语“烷氧羰基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指通过一个羰基连接的烷氧基。本文所用术语“烷基碳酸氧基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指通过一个与氧键连接的羰基连接的烷基。本文所用术语“单烷基氨基”或“二烷基氨基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指分别一或二个上述烷基取代的氨基。

本文所用术语“链烯基”，当单独使用或作为另一基团的一部分时，是指至少含有一个碳碳双键的上述被取代或未取代的烷基基团。取代基的例子包括一个或多个上述烷基，和/或一个或多个上述烷基取代基。本文所用术语“链烯氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键 ($-\text{O}-$) 连接的上述链烯基。

本文所用术语“炔基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指至少含有一个碳碳三键的上述被取代或未取代的烷基基团。取代基的例子包括一个或多个上述烷基，和/或一个或多个上述烷基取代基。本文所用术语“炔氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键连接的上述炔基基团。

本文所用术语“环烷基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指被取代或未取代的饱和碳环系，优选含 1 至 3 个环且每个环

含 3 至 7 个碳。未被取代的基团的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基、环癸基、环十二烷基、金刚烷基。取代基的例子包括一个或多个上述烷基，和 / 或一个或多个上述烷基取代基。本文所用术语“环烷氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键连接的上述环烷基。

本文所用术语“环烯基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指含有至少一个形成部分不饱和的碳碳双键的上述被取代或未取代的环烷基基团。取代基的例子包括一个或多个上述烷基，和 / 或一个或多个上述烷基取代基。本文所用术语“环烯氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键（ $-O-$ ）连接的环烯基。

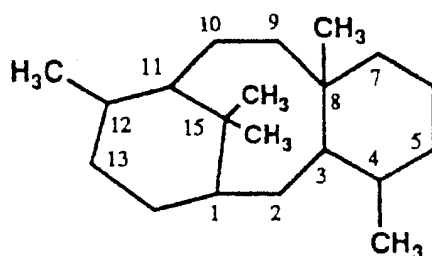
本文所用术语“芳基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指可被取代或未取代的碳环芳族基团，优选含 1 至 2 个环且环上含 6 至 12 个碳。未被取代的基团包括苯基、联苯基和萘基。取代基的例子包括一或二个，优选三个或更少个硝基，上述烷基和 / 或烷基取代基。本文所用术语“芳氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键（ $-O-$ ）连接的上述芳基基团。

本文所用术语“杂环”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指被取代或未取代的全饱和或不饱和的至少每环含一个杂原子的芳香或非芳香环基团，优选为每环含 5 或 6 个原子的单环或双环。杂环基环中可含有例如 1 或 2 个氧原子，1 或 2 个硫原子和 / 或 1 至 4 个氮原子。每个杂环基可通过环系统中的任何碳或杂原子被结合。杂环基的例子包括：噻吩基、呋喃基、吡咯基、吡啶基、咪唑基、吡咯烷基、哌啶基、氮杂萘基、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、苯并噁二唑基及苯并呋喃基。
取代基的例子包括一个或多个上述烷基和/或一个或多个上述烷基取代基。本文所用术语“杂环氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过一个氧键（ $-O-$ ）连接的上述杂环基团。

本文所用术语“卤素”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指氟、溴、氯和碘。

本文所用术语“紫杉烷”，是指含有下述紫杉烷部分的化合物。
术语“紫杉烷部分”指含有下述核心结构的部分，（使用本文所用环系位置的编号）：



核心结构可被取代并可在其环系中含不饱和烯键。优选的部分含有一个在4和5位耦合的Oxetane环。如发现于紫杉醇中的部分。

本文所用术语“羟基保护基”是指能够保护自由羟基的任何基团，在它起作用的反应之后它可被除去而不影响分子的其余部分。这种基团及其合成可参见T. W. Greene, “Protective Groups in Organic Synthesis” (John Wiley and Sons 1981 或 Fieser Fieser)。

本文所用术语“盐”，包括与无机和/或有机酸及碱形成的酸和/或碱盐。

本文所用术语“酰基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指从有机羧酸的 $-COOH$ 基团中除去羟基后形成的部分。本文所

用术语“酰氧基”，当单独使用或作为其它基团的一部分时，是指通过氧键（ $-O-$ ）连接的上述酰基基团。

进行 C-10 修饰的起始物

作为本发明的起始物，C-10 带酰基和 C-10 带羟基的紫杉烷是能够进行本发明的酶水解或酯化的任何紫杉烷化合物。起始物可以是合成的紫杉烷，或优选为天然紫杉烷，如三尖杉宁碱、7-木糖基紫杉醇、紫杉醇、浆果赤霉素Ⅲ、10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ或紫杉醇C（紫杉醇类似物，其中C-13苯甲酰基侧链被正戊酰基取代），它们的单体或彼此的混合物。“天然”紫杉烷起始物优选通过产生紫杉烷的植物组织的植物细胞培养和/或从产生紫杉烷的植物组织中提取得到，特别是紫杉属植物，如浆果紫杉，东北红豆杉，短叶紫杉，喜马拉雅红豆杉，*Taxus media*，*Taxus hicksii*，特别是*Taxus X. media hicksii* 的组织。植物组织包括针叶，树皮和整个树苗。

获得本发明中 C-10 带羟基和酰氧基的紫杉烷起始物的优选方法可参见 Rao, *Pharmaceutical Research*, 10, 521-524 (1993); Kingston. *Pharmac. Ther.*, 52, 1-34 (1991);或参见本发明实施例。

进行 C-13 修饰的起始物

用作本发明起始物的 C-13 带酰氧基的紫杉烷是能够进行本发明的酶水解的任何紫杉烷化合物。起始物可以是合成的紫杉烷，或优选为天然紫杉烷，如三尖杉宁碱、7-木糖基紫杉醇、紫杉醇、7-木糖基-10-脱乙酰基紫杉醇、10-脱乙酰基紫杉醇或紫杉醇C，它们的单体或彼此的混合物。“天然”紫杉烷起始物优选通过产生紫杉烷的植物组织植物细胞培养和/或从含紫杉烷的植物组织中提取得到，特别是紫杉属植物，如浆果紫杉、东北红豆杉、短叶紫杉、喜马

拉雅红豆杉、*Taxus media*、*Taxus hicksii*、特别是*Taxus X. media hicksii* 的组织。

获得本发明中 C - 1 3 带酰氧基的紫杉烷起始物的优选方法参见 Rao, *Pharmaceutical Research*, 10, 521-524 (1993); kingston, *Pharmac. Ther.*, 52, 1-34 (1991); 或参见本发明实施例。

进行 C - 1 0 修饰的酶和微生物

本发明所用的酶或微生物是能够催化本文所述的酶水解或酯化的任何酶或微生物。酶或微生物不考虑其来源或纯度，可以其游离状态或固定于载体上（如通过物理吸附或载留）应用。

微生物的例子包括以下种属：类诺卡氏菌属、诺卡氏菌属、红球菌属、小多孢菌属、糖多孢菌属、假诺卡氏菌属、厄氏菌属、原小单孢菌属及间孢囊菌属。特别优选的微生物是类诺卡氏菌属，例如：白色类诺卡氏菌、黄色类诺卡氏菌、暗黄色类诺卡氏菌、赭黄色类诺卡氏菌、单纯类诺卡氏菌及嗜热丁香色类诺卡氏菌。特别是白色类诺卡氏菌 ATCC 55424 (SC 13910) 和 ATCC 55425 (SC 13911) 以及赭黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912)。这里所说“ATCC”是指美国典型培养物保藏中心即 American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, maryland 20852 的保藏登记号（参照生物的保存机构）。上述微生物 ATCC 55425 和 55426 在 1993 年 5 月 12 日寄存。术语“SC”指作为 Squibb 培养物保藏中心部分给予微生物的命名。

生物学纯的微生物白色类诺卡氏菌 ATCC 55424 (SC 13910)，白色类诺卡氏菌 ATCC 55425 (SC 13911)

和腾黄色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 6 (S C 1 3 9 1 2) 都是新的微生物。本发明也仔细考虑到了这些微生物的用于本文所述的水解或酯化方法中的突变体，如那些通过化学，物理（例如， $\times$ -射线）或生物学手段（如：通过分子生物学技术）改良的微生物。

白色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 4 (S C 1 3 9 1 0) 和 A T C C 5 5 4 2 5 (S C 1 3 9 1 1) 可在培养基 A 9 4 (玉米浸液 (35 克) ， 结晶葡萄糖 (20 克) ， 试剂级 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 克) ， CaCO_3 (3.5 克) ， 豆油 (5 ml) 及蒸馏水 (1 升)) 中培养。这些生物从土壤中分离（从得自 New Brunswick, New Jersey 的样品中），并且是革兰氏阳性，在不同培养基中显示需氧生长的非游动性生物。在固体 Y S 培养基淡乳油 (0.2 % 酵母提取物，1 % 淀粉) 中，菌丝体为白色至淡乳油色。在固体和液体培养基中生长伴随产生可扩散的深色色素。显微镜下，在液体培养物中的生长特性是菌丝体聚集并含有大量分枝菌丝。

腾黄色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 6 (S C 1 3 9 1 2) 可在培养基 A 9 4 (玉米浸液 (35 克) ， 结晶葡萄糖 (20 克) ， 试剂级 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 克) ， CaCO_3 (3.5 克) ， 豆油 (5 ml) 及蒸馏水 (1 升)) 中培养。这个生物体从土壤中分离（从来自 New Brunswick, New Jersey 的样品中），并且是革兰氏阳性的，在多种培养基中显示需氧生长的非游动性微生物。在固体 Y S 培养基 (0.2 % 酵母提取物，1 % 淀粉) 中，菌丝体为深乳油色。在显微镜下，在液体培养物中的生长特性是菌丝体聚集并含有大量分枝菌丝。

根据 Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology, Volum 2

(Ed. P. H. A. Sneath) (1986) 中的描述, 上述生物体白色类诺卡氏菌 ATCC 55424 (SC 13910) 和 ATCC 55425 (SC 13911) 和 嗜黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912) 分别被鉴定为白色类诺卡氏菌和嗜黄色类诺卡氏菌的菌株。

用于本水解或酯化方法中的酶有水解酶, 特别是酯酶, 蛋白酶或脂肪酶。优选的酶包括从微生物, 特别是上述微生物中得到的酶。酶可通过提取和纯化方法分离, 例如通过疏水柱层析, 凝胶过滤, 然后通过阴离子交换柱。本发明进一步提供通过上述技术从白色类诺卡氏菌 ATCC 55424 (SC 13910) 和 ATCC 55425 (SC 13911) 及嗜黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912) 中分离得到的能够参与本水解或酯化方法的酶。

进行 C-13 修饰的酶和微生物

本发明所用的酶或微生物是能够催化本文所述的酶水解的任何酶或微生物。酶或微生物不考虑其来源或纯度, 可以其游离状态或固定于载体上, 如通过物理吸附或载留应用。

根据本发明的方法, 选择适宜微生物进行起始 C-13 带酰氧基的紫杉烷的酶水解的优选方法是使用下述新的筛选方法, 包括步骤:

(a) 选择固体生长培养基 (i) 使被筛选的微生物在其中生长, (ii) 起始物 C-13 带酰氧基的紫杉烷在其中是不溶的, 并因此与生长培养基形成的混合物具有浑浊的外观, (iii) 用本发明的水解方法得到的 C-13 带羟基的紫杉烷产物在其中是可溶的, 并且优选断裂的 C-13 侧链也是可溶的, 并因此与生长培养基形成的混合物具有透明的外观;

(b)使微生物与上述步骤(a)中选择的生长培养基接触,例如在允许微生物生长的条件下放入混合有起始物C-13带酰氧基的紫杉烷的Petri培养皿中;

(c)观察微生物生长的区域周围是否出现清晰的边界。

形成清晰的边界表示水解已经发生,因而此微生物可适于本水解方法。本文所用术语“清晰”及“浑浊”应理解为彼此相对的。因此,使足够量的起始物C-13带酰氧基的紫杉烷与生长培养基混合,以使其在悬浮液中是可见的(显出“浑浊”外观),清晰度的测定是相对于悬浮液的所说的起始可见度而言,即该可见度的减少。

本发明提供的另一优选的筛选方法与上述方法相对应,不同的是在选择的固体生长培养基中起始物C-13带酰氧基的紫杉烷是可溶的,因此,与生长培养基混合后,具有透明的外观,而用本发明的水解方法得到的C-13带羟基的紫杉烷是不溶的(优选断裂的C-13侧链在其中也不溶),因此,与生长培养基混合后,具有混浊的外观。观察微生物生长区域周围的浑浊边界可选择到适宜的微生物。

本发明中一个特别优选的筛选方法在本文实施例中阐述。

上述优选的筛选方法可适用于起始物C-13带酰氧基的紫杉烷和C-13带羟基的紫杉烷产物相对溶解度不同至可以观察到本发明的水解是否发生的程度的场合。

用于C-13水解的微生物的例子包括下面菌属:类诺卡氏菌属、诺卡氏菌属、红球菌属、小多孢菌属、糖多孢菌属、假诺卡氏菌属、厄氏菌属、原小单孢菌属及间孢囊菌属。特别优选的微生物是类诺卡氏菌属、例如白色类诺卡氏菌、黄色类诺卡氏菌、暗黄色类诺卡氏菌、赭黄色类诺卡氏菌、单纯类诺卡氏菌及嗜热丁香色类诺卡氏菌,尤其

是白色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 4 (S C 1 3 9 1 0) 和
A T C C 5 5 4 2 5 (S C 1 3 9 1 1) 及 嗜 黄 色 类 诺 卡 氏 菌
A T C C 5 5 4 2 6 (S C 1 3 9 1 2) 。

如上所述，本发明进一步提供的生物学纯的微生物白色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 4 (S C 1 3 9 1 0) ， 白色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 5 (S C 1 3 9 1 1) 和 嗜 黄 色 类 诺 卡 氏 菌 A T C C 5 5 4 2 6 (S C 1 3 9 1 2) 都是新的微生物。应明确的是，本发明也仔细考虑到了用于本文所述的水解方法的这些微生物的突变体，如那些通过化学、物理（例如， $\times$ -射线）或生物学方法（如通过分子生物学技术）修饰的微生物。

本方法所用酶是水解酶。优选的酶包括从微生物特别是上述微生物中得到的酶。酶可通过本文实施例中所述的例如提取和纯化方法分离，特别是对发现于细胞外的微生物培养基中活性部分的纯化，例如使用阴离子交换柱，然后进行疏水柱层析和凝胶过滤。本发明进一步提供例如使用上述技术从白色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2 4 (S C 1 3 9 1 0) 和 A T C C 5 5 4 2 5 (S C 1 3 9 1 1) 及 嗜 黄 色 类 诺 卡 氏 菌 A T C C 5 5 4 2 6 (S C 1 3 9 1 2) 中分离得到的能够完成本水解的酶。

应用酶和微生物进行 C - 1 0 和 C - 1 3 修饰

应用微生物时，细胞可以完整湿细胞或干细胞（如：冷冻干燥、喷雾干燥或热干燥细胞）的形式被使用，或以处理过的细胞物质（如：破裂细胞或细胞提取物）形式被使用。也考虑到基因工程生物体的使用。宿主细胞可以是任何细胞，例如被修饰为含有一或多个表达一种或多种能进行本文所述催化作用之酶的基因的大肠杆菌。

应用一种或多种微生物时，可先进行微生物的发酵，然后进行本发明的酶水解或酯化（两步发酵及水解或酯化），或同时进行，即在后一种情况中，发酵和水解或酯化同时进行（一步发酵及水解或酯化）。

微生物的生长本领域技术人员应用适宜的培养基即可实现。适于微生物生长的培养基包括那些能够提供微生物细胞生长所必须的之营养素的培养基。典型的生长培养基包括必要的碳源，氮源及元素（例如微量的）。也可以加入诱导剂。本文所用术语“诱导剂”，包括能够增加微生物细胞内所需酶活性形成的任何化合物。

碳源可包括糖，如麦芽糖、乳糖、葡萄糖、果糖、甘油、山梨醇、蔗糖、淀粉、甘露糖醇、丙二醇等；有机酸，如乙酸钠、柠檬酸钠等；和醇，如乙醇、丙醇等。

氮源可包括N-Z胺A、玉米浸液、大豆粉、牛肉提取物、酵母提取物、糖蜜、面包酵母、胰化胨、nutrisoy、胨、酵母粉、氨基酸（如谷氨酸钠等）、硝酸钠、硫酸铵等。

微量元素包括镁、锰、钙、钴、镍、铁、钠及钾盐。也可加入微量或优选多于微量的磷酸盐。

所用培养基可包含一种以上碳源或氮源或其它营养素。

优选的生长培养基包括液体培养基，特别是本文实施例所述之培养基。

在微生物生长期间进行摇瓶或发酵罐培养时，对反应混合物搅拌和通气以影响水解或酯化过程中可利用的氧量。搅拌速度优选从100至250RPM；通气量优选每分钟每单位体积培养基通入约1至10体积空气。

按照本发明的方法，用于微生物生长和／或水解或酯化的培养基的pH值优选从大约6至大约8.5，温度优选从大约24℃至大约37℃。水解或酯化可在试管中进行1至48小时，或优选达到所需产物的最大收率。本发明的水解方法优选在pH6至8条件下，特别是在非碱性条件下进行。

作为水解反应介质，虽然可使用有机液体，或可混溶或不可混溶（双相的）有机／水混合液，但优选使用含水液体。酯化反应时，虽然可以使用其它介质，但优选使用有机溶剂或双相有机／水反应介质。

进行C-10修饰时，根据起始物和酯化或水解反应的介质的总重量，优选使用0.025～2.5重量％的C-10带羟基或带酰氧基的紫杉烷起始物。在本发明的酯化方法中，酰化剂对C-10带羟基的紫杉烷的摩尔比优选从大约1：1至大约1000：1。所用酶或微生物的量（相对于起始物）的选择应使本发明的酶水解或酯化催化反应进行。使用本发明的水解或酯化方法时，优选分别得到超过90％（由起始带酰氧基的紫杉烷得到的C-10水解产物的百分比）或超过50％（由起始带羟基的紫杉烷得到的C-10酰化产物的百分比）的产率。可在起始紫杉烷的C-10位选择性地水解或酯化。即只获得C-10水解或酯化的大部分产物（如唯一的）而其它位置上不发生水解或酯化。

进行C-13位修饰时，根据起始物和水解反应介质的总重量，优选使用0.025至0.25重量％的C-13带酰氧基的紫杉烷起始物。对所用酶或微生物的量（相对于起始物）的选择应使本发明的酶水解催化反应进行。使用本发明的水解方法时，优选得到超过90％的产率（由起始酰氧基紫杉烷得到的C-13水解产物的百分

比)。可在起始紫杉烷的C-13位选择性地水解。即只获得C-13水解的大部分产物(如唯一的)而其它位置上不发生水解。

分离

本发明方法中，C-10带酰氧基或羟基的产物及如下所述的偶联产物可通过如提取、蒸馏、结晶及柱层析等方法分离和纯化。

同样，本发明水解方法的C-13带羟基的产物及如下所述的偶联产物可通过如提取、蒸馏、结晶及柱层析等方法分离和纯化。

实用性

紫杉烷是含有上述紫杉烷部分的二萜烯化合物。特别有用的是其中紫杉烷部分的11，12位通过烯键连接的紫杉烷及13位含有侧链的紫杉烷如紫杉醇。药理活性的紫杉烷如紫杉醇可被用做抗肿瘤剂治疗癌症(如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌或肺癌、黑色素瘤和白血病)病人。

通过C-10修饰获得的化合物

用本发明的C-10水解或酯化方法得到的化合物在制备C-10具有所需取代基的上述药理学活性紫杉烷中是特别有用的中间体。因此，例如在按照本发明方法得到的C-10修饰的化合物上也带有C-13羟基时，这些化合物可与形成C-13酰氧基侧链的中间体化合物如 β -内酰胺偶联，得到C-13带酰氧基侧链的紫杉烷，如紫杉醇或其类似物。在这方面，按照本发明的方法在C-13位进行修饰可在对C-10修饰之前或之后进行。

按照本发明方法制备的带酰氧基或羟基的化合物可任选在用于偶联C-13酰氧基侧链前修饰。例如，除C-13位以外的一个或多个羟基可在偶联前先被保护，然后再脱去保护。

由本发明的水解和酯化方法得到的C-10带酰氧基和带羟基的紫杉烷(可按上述方法修饰或不修饰),例如可用于制备C-13带酰氧基侧链的紫杉烷,制备方法可参见欧洲专利公开No.400,971,美国专利No.4,876,399,美国专利No.4,857,653,美国专利No.4,814,470,美国专利No.4,924,012,美国专利No.4,924,011及Kingston, Pharm. Ther., Vol. 52, 1-34 (1991),特别是1992年12月23日由Poss等人提交的(律师目录号No.LD60)美国专利申请系列No.07/995,443,及1993年3月19日由Thottathil等人提交的(律师目录号LD57)美国专利申请系列号08/033598,所有这些文献均并入本文作为参考文献。

通过C-13修饰获得的化合物

用本发明的水解方法得到的C-13含羟基的化合物在制备上述C-13带侧链的紫杉烷中是特别有用的中间体。特别是按照本方法制备的C-13带羟基的化合物可与形成侧链的中间体化合物如 β -内酰胺偶联,得到C-13带侧链的紫杉烷。这种侧链的加入,可增加紫杉烷产物的所需药理学活性,或可以形成比起始化合物更容易转变为具有更强的所需药理学活性的紫杉烷。

按照本发明方法制备的C-13带羟基的化合物可在用于偶联形成侧链前被修饰或不被修饰。例如按照本发明方法在C-10位的修饰可在C-13位水解之前、其间或之后进行;和/或除C-13位以外的一个或多个羟基可在偶联前先进行保护,然后再脱去保护。

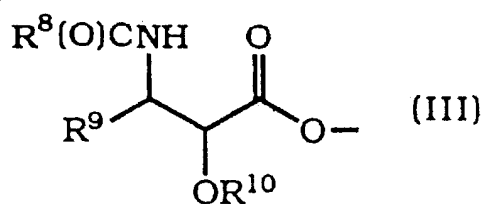
由本发明的水解方法制得的C-13带羟基的紫杉烷(如上所述进行修饰或未修饰),可用于制备C-13带酰氧基侧链的紫杉烷,

制备方法参见欧洲专利申请No. 400, 971, 美国专利No. 4,876,399, 美国专利No. 4, 857, 653, 美国专利No.4,814,470,美国专利No. 4, 924, 012, 美国专利No. 4, 924, 011, 及 Kingston, Pharm. Ther., Vol. 52, 1-34 (1991), 特别是1992年12月23日由Poss等人提交的(律师目录号No. LD 60)美国专利申请系列号No.07/995443及1993年3月19日由Thottathil等人提交的(律师目录号No. LD 57)美国专利申请系列号No. 08/033598, 所有这些文献均列入本文作为参考文献。优选制备式VI的C-13带酰氧基的紫杉烷。

进行C-10修饰的优选化合物

在本发明的C-10水解方法中, 优选使用具有式II的紫杉烷或其盐, 从而经酶水解法提供相应的式I化合物或其盐。同样, 在本发明的C-10酯化方法中, 优选使用具有式I的紫杉烷或其盐, 从而经酶酯化法提供相应的式II化合物或其盐。

在式I和II中, R^7 优选为 $R^{11}-C(O)-O-$, 特别是其中 R^{11} 为烷基, 如甲基; R^2 优选为羟基或木糖基(Xylosyl); R^3 优选为烷基, 如甲基; R^4 优选为芳基, 如苯基; 且 R^1 优选为羟基或具有下列式III的基团:



其中

R^8 和 R^9 各自是烷基、烷氧基、链烯基、链烯氧基、炔基、炔氧基、

环烷基、环烷基氧基、环烯基、环烯氧基、芳基、芳氧基、杂环或杂环氧基；及

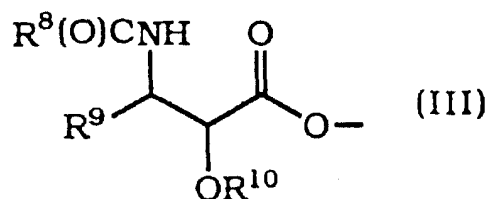
R^{10} 是氢或羟基保护基。

具有式 I 和 II 的紫杉烷的例子有三尖杉宁碱(cephalomannine)，10-脱乙酰紫杉醇，7-木糖基紫杉醇，紫杉醇 C，7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇，紫杉醇，浆果赤霉素 III、10-脱乙酰浆果赤霉素 III 及 7-木糖基-10-脱乙酰浆果赤霉素 III。浆果赤霉素 III 经酶水解形成 10-脱乙酰浆果赤霉素 III（例如同时生成乙酸）。例如本发明优选实施方案是使用水解酶。此反应可经本发明的酶酯化方法而逆转。

紫杉醇是按本说明书所述方法制备的优选终产物。

进行 C-13 修饰的优选化合物

在本发明的方法中，优选使用具有式 VI 的紫杉烷或其盐，经 C-13 酶水解提供相应的式 V 化合物或其盐。在式 V 和 VI 中， R^{12} 优选为 $R^6 - C(O) - O -$ ，乙酰氧基或羟基， R^2 优选为羟基或木糖基； R^3 优选为烷基，如甲基； R^4 优选为芳基，如苯基； R^7 优选为具有下列式 III 的基团：



其中

R^8 ， R^9 和 R^{10} 定义同前。

具有式 VI 的起始紫杉烷的例子有单一的三尖杉宁碱、10-脱乙

酰紫杉醇、7-木糖基紫杉醇，紫杉醇-C及7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇，或它们彼此的或与紫杉醇的混合物。优选的水解产物有浆果赤霉素III、10-脱乙酰浆果赤霉素III、7-木糖基浆果赤霉素III及7-木糖基-10-脱乙酰浆果赤霉素III。

水解后的偶联优选提供具有式III之C-13带酰氧基的上述式VI的紫杉烷产物。紫杉醇是按本文所述水解及偶联方法制备的优选终产物。

在本发明的任何方法中，可适宜地应用或制备反应物或产物的盐或溶剂化物，如水合物。

通过下述实施例进一步描述本发明，这些实施例只是说明而不是限制本发明权利要求的范围。

实施例1

浆果赤霉素III的10-脱乙酰化反应

使从土壤中分离的赭黄色类诺卡氏菌ATCC 55426 (SC 13912) 在28℃，含10ml培养基，转速为150rpm的50ml锥形烧瓶中生长三天。培养基中每升蒸馏水含有：10g细菌胰化胨，5g细菌酵母提取物，6ml三丁酸甘油酯及0.06ml吐温80，最终pH 6.8±0.2。离心分离得到细胞，用10ml 50mM的磷酸钾缓冲液(pH7)洗涤，并再悬浮于2ml这种缓冲液中。在细胞悬浮液中加入0.5mg浆果赤霉素III的20μl甲醇溶液，在环境温度(大约23℃)下用Fisher Roto-Rack将悬浮液混合20小时。用二氯甲烷提取悬浮液，将提取液蒸干，再溶解并用下述HPLC方法2分析之。样品含0.257mg/ml 10-脱乙酰浆果赤霉素III(100%转化率)及微量浆果赤霉素III。在其它三种培养基中生长的ATCC

5 5 4 2 6 菌株的洗涤细胞同样可实现这种转化。

实施例 2

浆果赤霉素Ⅲ的 1 0 - 脱乙酰化反应

使赭黄色类诺卡氏菌 A T C C 5 5 4 2.6 (S C 1 3 9 1 2) 在 2 0 ml 培养基中生长，培养基中每升蒸馏水含有：1 0 g 细菌胰化胨，5 g 细菌酵母提取物及 0 . 0 6 ml 吐温 8 0，pH 6 . 8 ± 0 . 2。在 4 L 锥形烧瓶中接种 1 L 同一培养基。烧瓶在 2 8 ℃ 振荡三天，然后离心分离得到细胞。细胞团块用 6 0 0 ml 5 0 m M 的磷酸钾缓冲液 (pH 7) 洗涤，再离心得到 3 6 . 6 g 湿细胞。将细胞在 - 7 2 ℃ 冷冻，在两天内冷冻干燥至 2 . 5 g，用乳钵和杵研磨并在 2 ℃ 保存。在环境温度下，将 1 . 9 8 ml 5 0 m M 磷酸钾缓冲液 (pH 7)，50mg 干细胞及 0 . 5 mg 浆果赤霉素Ⅲ的 2 0 μ l 甲醇溶液用 Roto-Rack 混合，混合时间如下面表 1 所示。加入 2 ml 甲醇终止反应。用微离心机除去沉淀物，样品用下述 H P L C 方法 1 分析。所得结果示于表 1 中。

表 1

时间 (分钟)	1 0 - 脱乙酰 - 浆果赤霉素Ⅲ (mg / ml)	浆果赤霉素Ⅲ mg / ml	转化率 (%)
0	0 . 0 0 7	0 . 2 5 2	—
3 0	0 . 0 5 1	0 . 1 4 3	2 2
6 0	0 . 1 0 6	0 . 1 0 6	4 6
1 2 0	0 . 2 0 4	0 . 0 3 4	8 8

实施例 3

紫杉醇的 10-脱乙酰化反应

从腾黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912) 中得到的部分纯化的提取物 (在Whatman DE 52上用阴离子交换柱层析纯化) 含有 34 毫单位/ml 酶 (1 毫单位是指 28℃ 时, 在含 0.25 mg/ml 浆果赤霉素 III 和 1% 甲醇的 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 中, 每分钟能够将 1 nmole 浆果赤霉素 III 水解为 10-脱乙酰浆果赤霉素 III 的酶量)。28℃ 时, 将 2 ml 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7)、0.5 mg 紫杉醇、1% 甲醇及 34 毫单位的酶在 Fisher RotoRack 上保温 3.5 小时。反应经用 4 ml 二氯甲烷提取而终止。干燥提取物, 再溶解于甲醇中并用下述 HPLC 方法 3 分析。样品含 0.075 mg 紫杉醇及 0.186 mg/ml 10-脱乙酰紫杉醇 (78% 转化率)。

腾黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912) 的选择纯化

使腾黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 在含有 1% 胰化脲和 0.5% 酵母提取物的发酵器中生长。所有的纯化步骤均在 4℃, 50 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 中进行。将细胞以 10% w/v 悬浮于缓冲液并使之在 10,000 psi 下通过微量流化器二次以溶解细胞。然后经 24000 × g 离心 15 分钟以澄清溶胞产物。加入硫酸铵至 60% 饱和, 将所得沉淀物悬浮于含 1 M 硫酸铵的缓冲液中并加于疏水相互作用层析 (HIC-乙醚 (Toya-pearl)) 柱 (5.5 × 2.6 cm) 上, 流速为 2 ml/min。酶活性部分用缓冲液洗脱。然后将活性部分加到 Pharmacia Sephacryl S-200 硅胶过滤柱 (2.6 × 84 cm) 上, 流速为 0.5 ml/min。将从柱上得到的活性部分加到

阴离子交换 (BioRad-0.2) 柱 (2 ml 柱, 流速 2 ml/min) 上, 并用 4.2 ml 0.08 M NaCl 盐梯度洗脱活性部分。合并活性部分并通过一个上述的 Sephacryl S-200 柱。估计在含有十二烷基磺酸钠的硅胶上酶的分子量为 40,000 ± 10,000。以上方法各步骤所得的结果如下:

步骤	体积 ml	蛋白质 mg	活性 mu	比活性 mu/mg	回收率 %
细胞提取物	100	450	2050	4.5	-
硫酸铵	70	196	2830	14.4	138
HIC (乙醚)	7	24	953	39.9	46.5
Sephacryl S-200	7	0.7	190	271	9.3
BioRad-02	3	0.09	51	567	2.5
Sephacryl S-200	8	0.03	26	867	1.3

* C-10-脱乙酰酶的纯化: 在 25℃ 含 0.25 mg/ml 浆果赤霉素 III 及 1% 甲醇的 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 中, 1 毫单位酶 (mu) 催化 1 nmole/min 浆果赤霉素 III 转变为 10-脱乙酰浆果赤霉素 III。用 BioRad 蛋白质分析试剂检测蛋白质。

实施例 4

10-脱乙酰浆果赤霉素 III 乙酰化形成浆果赤霉素 III

金黄色类诺卡氏菌 ATCC 55426 (SC 13912) 细胞在 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7.2) (10% 重量/体积) 中用微量流化器碎裂, 经搅拌 3 小时使 10-脱乙酰酶从提取液中吸附到 Whatman DEAE 纤维素 DE 52 阴离子交换剂上 (每升 DE 52 含 10 g 提取物蛋白质)。过滤收集 DE 52, 用缓冲液洗涤并冷冻干

燥，得到每mg固体含0.091毫单位酶。0.2ml 1M磷酸钾缓冲液(pH8)、100mg固定化酶(如固定于DE52树脂上)、1.8ml水、2mg10-脱乙酰浆果赤霉素III和0.5ml乙酸乙烯酯在室温下用磁棒剧烈搅拌14.5小时。用二氯甲烷提取反应混合物。干燥提取液，再溶于甲醇中以便使用下述HPLC方法1分析。样品含有0.688mg/ml10-脱乙酰浆果赤霉素III和0.203mg/ml浆果赤霉素III(19%转化率)。

HPLC方法

方法1

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

流动相：55%甲醇，45%水

流速：1ml/min

柱温：环境温度

检测波长：235nm

方法2

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

流动相：溶剂A：15mM KH_2PO_4 ，用三氟乙酸调节到pH4。

溶剂B：乙腈

时间/分钟	溶剂A (%)	溶剂B (%)
0	75	25
20	55	45
23	40	60
24	25	75

2 8

7 5

2 5

柱温：3 5 °C

检测波长：2 3 0 nm。

方法 3¹

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

流动相：6 0 %甲醇，4 0 %水

流速：1 ml/min

柱温：环境温度

检测波长：2 3 5 nm

1 参见Monsarrat 等：Drug Metabolism and Disposition, 18, 895-901 (1990)。

实施例 5

树苗提取物的水解

将Taxus hicksii树苗的乙醇提取液用毫微滤器浓缩1 0至1 5倍。在2 8 °C下，将0 . 5 ml提取液、0 . 5 ml 1 M磷酸钾缓冲液（pH 7 ），5 4 毫单位从白色类诺卡氏菌ATCC 55425（SC 13911）中部分纯化的酶（用阴离子交换层析法及硫酸铵沉淀法纯化）及4 ml水在Fisher Roto Rack中保温4 8小时（从ATCC 55425中制得的酶可用于本文所述的C - 1 3水解）。另一管中含同样混合物及从产黄色类诺卡氏菌ATCC 55426（SC 13912）中制得的1 4 毫单位酶（固定于5 0 0 mg DE 5 2上，见实施例4 ）。在28°C保温23小时后，加入第二部分从ATCC 55426中得到的1 4 毫单位酶（固定于DE 5 2上）及4 ml水，继续保温22小时。对照样品没有酶。用二氯甲烷提取样品，将蒸发的提取液溶于

甲醇并用上述HPLC方法 2 分析。所得结果示于下表 2。

结果表明，用 C-13 酰化酶（得自 SC 13911）处理后，随着紫杉醇，三尖杉宁碱，7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇及 10-脱乙酰紫杉醇被消耗，而浆果赤霉素Ⅲ及 10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ的量不断增加。10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ加上浆果赤霉素Ⅲ与起始紫杉醇的摩尔比从 11.7% 增至 43.6%。当树苗提取液同时用 C-13 脱乙酰化酶（得自 SC 13911）和 C-10 脱乙酰化酶（得自 13912）处理时，浆果赤霉素Ⅲ转变为 10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ且 10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ的浓度与初始值相比增加 6 倍。因此，紫杉烷混合物用 C-13 脱乙酰化酶和 C-10 脱乙酰化酶处理后，得到主要产物 10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ。

表 2

树苗提取液的水解

酶来源	10-脱乙酰浆果赤霉素Ⅲ	浆果赤霉素Ⅲ	7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇	三尖杉宁碱	紫杉醇	10-DAT
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
无	0.167	0.142	0.246	0.243	0.401	0.201
SC 13911	0.400	0.771	0.027	0.000	0.000	0.014
11+12 ⁺	1.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

酶来源	紫杉醇	C	D+B/T*
	mg/ml		
无	痕量		116.8

SC 13911	0.000	436.3
11+12	0.000	400.8

10-DAT 是 10-脱乙酰紫杉醇

+ SC 13911 和 SC 13912

*D+B/T 是 (10-脱乙酰紫杉醇 + 紫杉醇) 除以
(起始紫杉醇) 的摩尔百分收率。

实施例 6

能够除去紫杉醇上 C-13 侧链之微生物菌株的选择

将 Difco 醇溶琼脂培养基 (5.25 g) 与 150 ml 蒸馏水的混合物除菌并按生产商的指导部分地冷却。每升培养基含 10 g 胰化胨, 5 g 酵母提取物, 20 g 琼脂及 0.15 g 醇溶青。通过无菌过滤器向培养基中加入 25 mg 紫杉醇及 10 μ l 吐温 80 的 1 ml 甲醇溶液。每 100 mm $\times$ 15 mm 陪替氏培养器使用 15 ml 培养基。

将培养皿冷却并干燥后, 按下述方法从土壤样品中选择微生物: 将 2 g 土壤悬浮在 40 ml 水中。悬浮液的样品用水稀释 100 倍, 每个培养皿中散布 0.1 ml。所用的水已通过 0.22 μ 过滤器过滤。培养皿在 28 $^{\circ}$ C 保温, 并选择被清晰边界包围的菌落。选择的依据是紫杉醇在用于培养基中的浓度下是不溶的, 致使培养皿外观呈现浑浊, 而紫杉醇及经水解产生的侧链产物是可溶的, 从而在菌落周围形成一个清晰的边界。所选择的微生物包括: 白色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55424 (SC 13910) 及 ATCC 55425 (SC 13911) 及黄色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55426 (SC 13912)。

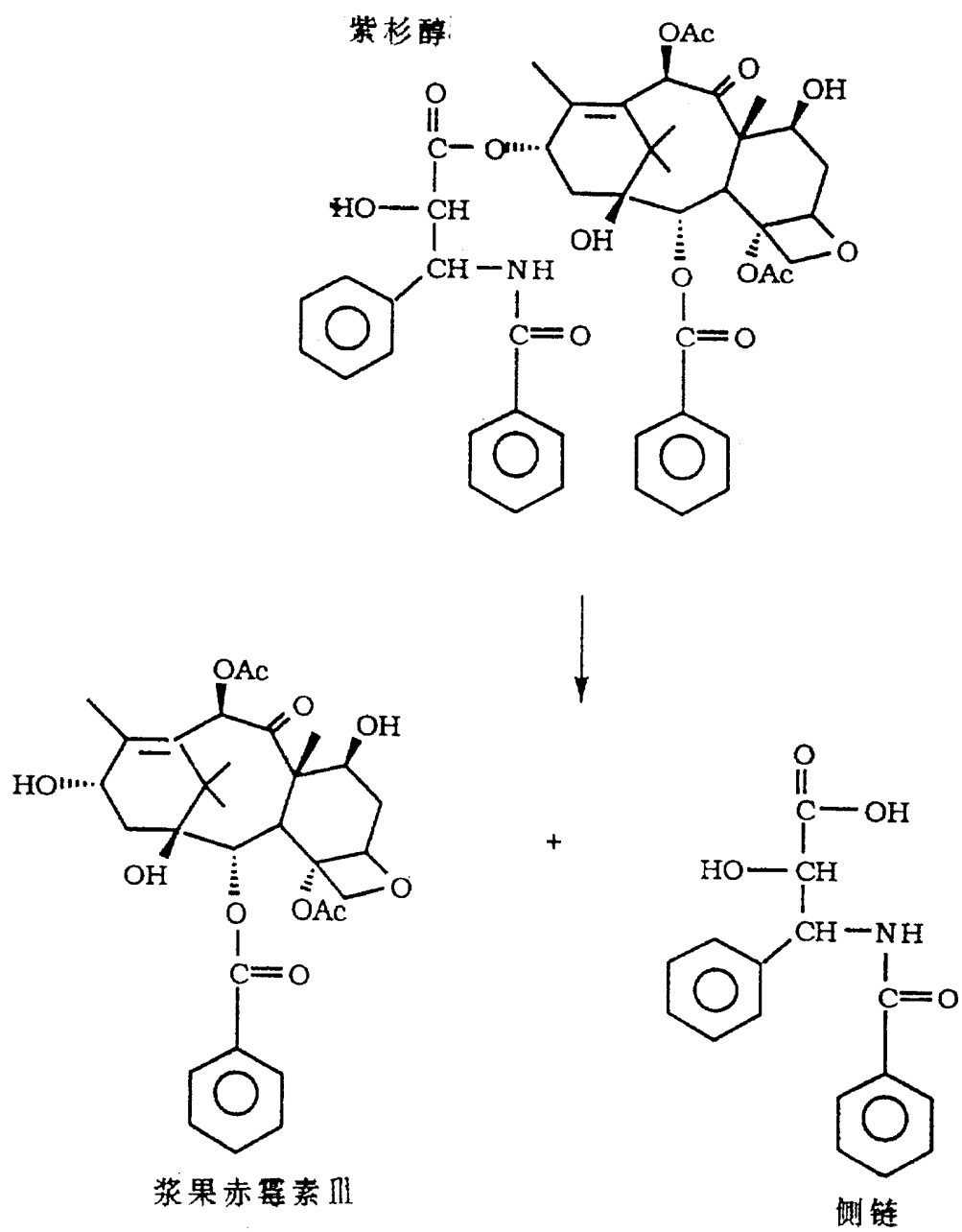
实施例 7

从紫杉醇中除去 C-13 侧链

本实施例的反应按下列流程图 1 进行。在含 10 ml 培养基的 50 ml 锥形烧瓶中接种白色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55424 (SC 13910) 或 ATCC 55425 (SC 13911) (见实施例 6, 从土壤中分离而来), 并在 28 °C 以 150 RPM 振荡 2 天。培养基中每升蒸馏水含: 10 g 细菌胰化胨, 5 g 细菌酵母提取液及 0.06 ml 吐温 80 (pH 6.8 ± 0.2)。离心除去细胞, 用 1 M KH_2PO_4 将上清液 pH 由 8.66 调至 7。

在每份 2 ml 上清液中加入 0.5 mg 紫杉醇的 20 μl 甲醇溶液, 混合物在环境温度 (大约 23 °C) 下搅拌 21 小时。用 4 ml CH_2Cl_2 提取溶液。提取液在室温和氮气环境下干燥, 再溶于甲醇并用 HPLC 分析 (上述方法 3)。从 ATCC 55424 (SC 13910) 菌株得到的上清液有 0.008 mg/ml 紫杉醇及 0.163 mg/ml 浆果赤霉素 III (94.9 mol% 转化率)。从 ATCC 55425 (SC 13911) 菌株得到的上清液有 0.014 mg/ml 紫杉醇及 0.166 mg/ml 浆果赤霉素 III (96.7 mol% 转化率)。(浆果赤霉素 III 及断裂的侧链产物由 LC-MS 鉴别)。

流程图 1



实施例 8

从三尖杉宁碱中除去 C-13 侧链

2 个 50 ml 锥形烧瓶各含 10 ml 培养基 (35 g 玉米浸液, 20 g 结晶葡萄糖, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.5 g CaCO_3 及 5 ml 豆油, 加蒸馏水至 1 升), 分别接种 0.5 ml 白色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55425 (SC 13911)。在 28°C, 以 150 RPM 振荡保温 2 天后, 将这两个培养物加至 4 L 的烧瓶中 (含实施例 7 所用的 1 L 培养基)。在 28°C, 以 200 RPM 保温 72 小时后, 离心除去细胞。用 1 M KH_2PO_4 将振荡上清液 pH 从 8.16 调至 7。

0.5 mg 三尖杉宁碱的 20 μl 甲醇溶液与 2 ml 上清液在立式振荡器 (Fisher Roto-Rack) 上保温 17 小时。溶液用二氯甲烷提取, 将提取液蒸干, 再悬浮于甲醇中并用 HPLC 分析 (上述方法 2)。三尖杉宁碱的浓度从 0.175 mg/ml 减少至 0 并产生 0.110 mg/ml 浆果赤霉素 III (基于起始三尖杉宁碱浓度分析), 产率为 89 mol%。

实施例 9

从 7-木糖基紫杉醇中除去 C-13 侧链

按实施例 8 所述自白色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55424 (SC 13910) 及 ATCC 55425 (SC 13911) 制得酶, 不同的是 1 L 培养物保温 2 天, 而不是 3 天。鹅黄色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55426 (SC 13912) 的生长与实施例 8 所述白色类诺卡氏菌菌株 ATCC 55425 (SC 13911) 相同。三天以后, 离心收获细胞, 用 600 ml 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 洗涤, 并再次离心。36.6 g 湿细胞在 -72°C 冷冻干燥二天至 2.52 g, 用乳钵和杵研磨并在

2℃保存。

从ATCC 55424 (SC 13910)和ATCC 55425 (SC 13911)菌株得到的1.8ml上清液及50mgATCC 55426 (SC 13912)菌的干细胞的1.8ml水溶液,分别与0.5mg 7-木糖基紫杉醇的0.2ml甲醇溶液在Fisher Roto-Rack上室温保温42小时。反应物用二氯甲烷提取,将干燥的提取物溶于甲醇中进行HPLC分析(上述方法3)。用每种酶都使7-木糖基紫杉醇从0.218mg/ml减少至0。各样品的主产物经HPLC-质谱确定为7-木糖基浆果赤霉素III。根据浆果赤霉素III标准,由ATCC 55424 (SC 13910)、ATCC 55425 (SC 13911)及ATCC 55426 (SC 13912)得到的7-木糖基浆果赤霉素III产物的浓度分别为0.112, 0.118 和 0.120mg/ml。利用浆果赤霉素III及7-木糖基浆果赤霉素III在235nm相同的消光系数,计算收率分别为88%, 93%及94% (摩尔% S)。

实施例 10

植物细胞混合物的水解

1g *Taxus hicksii* 针叶用10ml甲醇:乙酸(5000:1)提取。在10ml提取物中加入10ml水:乙酸(500:1)。混合液在20℃, 48,000×g离心10分钟。弃去沉淀物,将4ml提取液和16ml从白色类诺卡氏菌菌株ATCC 55424 (SC 13910)或ATCC 55425 (SC 13911)(制备见实施例9)得到的上清液在50ml锥形瓶中,在28℃, 150RPM振荡42小时。样品用二氯甲烷提取,将蒸干的提取物溶于甲醇中

进行HPLC分析(上述方法2)。紫杉烷浓度和(浆果赤霉素III+10-脱乙酰浆果赤霉素III)/起始紫杉醇的摩尔比例(有或无酶处理)示于下列表3中。

表 3

针叶提取液的酶水解

酶来源	10-脱乙酰浆果赤霉素III $\mu\text{g/ml}$	浆果赤霉素III $\mu\text{g/ml}$	7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇 $\mu\text{g/ml}$	三尖杉宁碱 $\mu\text{g/ml}$	紫杉醇 $\mu\text{g/ml}$	(DAB+B)* (紫杉醇)
无	0.126	微量	0.012	0.153	0.392	50.4
SC 13910	0.602	0.319	0.000	0.000	0.000	359.3
SC 13911	0.959	0.294	0.000	0.000	0.000	492.8

* (DAB+B) ÷ (起始紫杉醇) 的摩尔%比值;

DAB = 10-脱乙酰浆果赤霉素III

B = 浆果赤霉素III

实施例 1 1

酶的纯化及紫杉烷的水解

将100ml培养基(35g玉米浸液, 20g结晶葡萄糖, 5g硫酸铵, 3.5g碳酸钙及5ml豆油, 加蒸馏水至1升)置于500ml锥形烧瓶中并接种1ml白色类诺卡氏菌ATCC 55425(SC 13911), 在28℃振荡2天。将20ml这种培养物转移到含10g胰化脲及5g酵母提取物, pH6.8±0.2的1L蒸馏水中(在4L锥形烧瓶中)。烧瓶在28℃振荡3天, 离心除去细胞, 用1M KH_2PO_4 将上清液pH从7.89调至pH7。

所有纯化步骤均在 4℃ 下进行。将上清液加于含 150 ml Whatman DE 52 阴离子交换剂（在 25 mM 磷酸钾缓冲液中，pH 7）的直径 5 cm 柱上。柱子先用 1 500 ml 缓冲液洗涤，然后用 4 500 ml 含 0.25 M NaCl 的缓冲液洗涤。用缓冲液加 0.45 M NaCl 洗脱活性酶。流速 5 ml/min。在从 DE 52 柱上得到的活性最大的部分中加入硫酸铵（100 mg/ml），并将溶液加于含 30 ml Pharmacia Phenyl Sepharose CL-4B（疏水相互作用柱层析，在含 100 mg/ml 硫酸铵的 pH 7 的 50 mM 磷酸钾缓冲液中）的直径 2.6 cm 柱上，流速 1.6 ml/min。柱子先用 1 500 ml 缓冲液加 20 mg/ml 硫酸铵洗涤，然后用缓冲液单独洗脱活性部分。从 Phenyl Sepharose 柱上得到的活性最大的部分用一个 Amicon Ym10 膜超滤浓缩至 4 ml 并以 0.65 ml/min 的流速通过一个 Pharmacia Sephacryl S-200 凝胶过滤柱（2.6 × 84 cm）。最高比活性部分在十二烷基磺酸钠（SDS）凝胶柱上显示一个单峰，分子量 $49\,000 \pm 10\,000$ 。纯化方法总结于下列表 4 中。（在 28℃，含 0.25 mg/ml 紫杉醇和 1% 甲醇的 50 mM 磷酸钾缓冲液中，1 毫单位酶（mu）催化 1 nmole/min 紫杉醇转变为紫杉醇赤霉素 III）。

表 4

步骤	体积 ml	蛋白质 mg	活性 mu
培养基	1 000	885	4 664
DE 52	99	104	1 194
Phenyl Sepharose CL-4B	16	6.45	801

Sephacryl S-200 8 . 8 0 . 1 5 0 1 6 4

步骤	比活性	回收率
	$\mu\text{g}/\text{mg}$	(%)
培养基	5 . 2 7	
D E 5 2	1 1 . 5	2 5 . 6
Phenyl Sepharose	1 2 4	1 7 . 2
C L - 4 B		
Sephacryl S-200	1 0 9 3	3 . 5

为说明如上纯化的酶的活性，用列于表 5 的紫杉烷底物进行下述实验。

制备含有 0 . 5 mg 紫杉烷底物及 1 % 甲醇的 2 . 0 ml 5 0 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 的样品 (样品 1 、 2 、 3 、 4 和 5) 。同时制备含有 10 μg 酶 (通过上述 Phenyl Sepharose C L - 4 B 步骤纯化) 、 0 . 5 mg 紫杉烷底物及 1 % 甲醇的 2 . 0 ml 5 0 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 7) 的样品 (样品 1 e 、 2 e 、 3 e 、 4 e 和 5 e) 。所有样品于 2 8 °C 在 Fisher Roto Rack 上混合 1 6 小时。样品 1 、 1 e 、 2 、 2 e 、 5 和 5 e 用 4 ml 二氯甲烷提取。2 ml 提取液经干燥后再溶解于 1 ml 甲醇中并用 H P L C 方法 3 分析。样品 3 、 3 e 、 4 和 4 e 用 2 ml 甲醇稀释并用 H P L C 方法 3 分析 (C - 1 3 侧链只在后者样品中检测) 。

表 5 列出每个样品经培养后剩余紫杉烷底物的量及培养结束时紫杉烷产物的量。从表 5 可见 (见样品 1 e 、 2 e 、 3 e 、 4 e 和 5 e) 、如上纯化的酶在除去 C - 1 3 侧链 (水解在此所列的紫杉烷底物) 中是

有效的。

表 5

用纯化的酶水解紫杉烷

样品	底物	残余量 mg/ml	产物	mg/ml	侧链 mg/ml
1	紫杉醇	0.268		0.003	
1e		0.30	浆果赤霉素 III	0.170	
2	三尖杉宁碱	0.239			
2e		0.011	浆果赤霉素 III	0.190	
3	7-木糖基紫杉醇	0.250			
3e		0.016	7-木糖基浆果 赤霉素 III	0.182	0.066
4	7-木糖基-10- 脱乙酰紫杉醇	0.250			
4e		0.113	7-木糖基-10- -脱乙酰浆果赤 霉素 III	0.108	0.044
5	10-脱乙酰紫杉醇	0.257			
5e		0.000	10-脱乙酰-浆 果赤霉素 III	0.150	

实施例 1 2

树苗提取物的水解

Taxus hicksii 树苗的乙醇提取物用毫微滤器浓缩 10 至 15 倍。

将 0.5 ml 提取液, 0.5 ml 1 M 磷酸钾缓冲液 (pH 7), 5.4 μl 从白色类诺卡氏菌 ATCC 55425 (SC 13911) 中得来并部分纯化的酶 (见上实施例 1.1) 及 4 ml 水于 28 °C, 在 Fisher Roto Rack 上混合 48 小时。对照样品不含酶。样品用二氯甲烷提取, 将提取液蒸干后溶于甲醇中, 用 HPLC 方法 2 分析。所得结果示于下列表 6 中。

表 6

树苗提取物的水解

酶来源	10-DAB	bacc-III	ceph	XDT	紫杉醇
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
无	0.167	0.142	0.243	0.246	0.401
SC 13911	0.400	0.771	0.000	0.027	0.000

酶来源	10-DAT	紫杉醇C	(DAB+B) / (起始紫杉醇)
	mg/ml	mg/ml	mol%
无	0.201	微量	116.8
SC 13911	0.014	0.000	436.3

在表 6 中: 10-DAB 是 10-脱乙酰浆果赤霉素 III

bacc-III 或 B 是浆果赤霉素 III

ceph 是三尖杉宁碱

XDT 是 7-木糖基-10-脱乙酰紫杉醇

10-DAT 是 10-脱乙酰紫杉醇