



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101978043 B

(45) 授权公告日 2013.06.19

(21) 申请号 200880015212.X

(22) 申请日 2008.04.29

(30) 优先权数据

07009217.6 2007.05.08 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.11.09

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/003447 2008.04.29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/135195 EN 2008.11.13

(73) 专利权人 贺利氏贵金属有限及两合公司

地址 德国哈瑙市

(72) 发明人 米夏埃尔·兰贝特

克里斯蒂娜·于利洪科

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 丁业平 张天舒

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 19/56 (2006.01)

C12R 1/46 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1759175 A, 2006.04.12,

CN 1314950 A, 2001.09.26,

krishnamurthy madduri et.

al. production of the antitumor drug

epirubicin(4'-epidoxorubicin) and its

precursor by a genetically engineered

strain of streptomyces peucetius. 《nature

biotechnology》. 1998, 69-74.

审查员 黄蕊

权利要求书1页 说明书13页 附图6页

(54) 发明名称

产生可用作抗癌药的蒽环类代谢物的遗传修饰菌株

(57) 摘要

本发明涉及一种微生物菌株,其以至少0.5g/升发酵液的滴度产生蒽环类代谢物。

1. 一种微生物菌株,其以至少 0.5g/升发酵液的滴度产生蒽环代谢物,其中所述菌株选自保藏号 No. DSM12245 的波塞链霉菌表灰变种 (*Streptomyces peucetius* var. *caesius*),其中所述菌株以至少 0.1g/升发酵液的滴度分别产生化合物表道诺红菌素、13-二氢-表道诺红菌素、4'-表-领地霉素和 ϵ -紫红霉酮,其中所述菌株携带有编码 4'-酮还原酶和进行 O-甲基化所需的基因,并且所述基因为 *ekr8* 和 *rdmB*。

2. 根据权利要求 1 所述的菌株,其中该菌株所产生的表道诺红菌素、13-二氢-表道诺红菌素、4'-表-领地霉素和 ϵ -紫红霉酮中的任意一种占全部蒽环代谢物部分的至少 10%。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任意一项所述的菌株,其中内源性道诺霉素代谢物的生物合成被阻断。

4. 一种通过发酵来生产蒽环代谢物的方法,其通过利用根据权利要求 1 至 3 中任意一项所述的生产菌株来进行发酵。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中通过在任何时间添加树脂,从发酵液中吸附出表道诺霉素类化合物粗品和 ϵ -紫红霉酮。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述树脂选自离子型吸附剂和非离子型吸附剂。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述树脂选自聚苯乙烯。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述树脂选自 XAD-7 和 Diaion HP-20。

9. 根据权利要求 5 至 8 中任意一项所述的方法,其中所述树脂的添加量为 1 克/升至 100 克/升。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述树脂的添加量为 15 克/升至 40 克/升。

产生可用作抗癌药的蒽环类代谢物的遗传修饰菌株

技术领域

[0001] 本发明涉及波赛链霉菌 (*Streptomyces peucetius*) 的遗传修饰菌株及其用途,即将这种菌株用于通过单批发酵来产生高滴度 (titre) 的蒽环类代谢物 (如 4' - 表道诺红菌素 (4' - epidaunorubicin)、13- 二氢 - 表道诺红菌素、4' - 表 - 领地霉素和 ϵ - 紫红霉酮) 的混合物,该混合物可用在本发明的下游工艺中,来生产活性药用成分表阿霉素和 / 或去甲柔毛霉素。

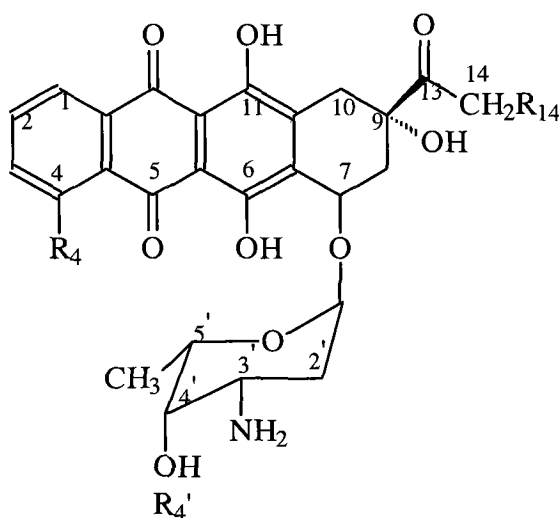
背景技术

[0002] 道诺霉素类化合物是一类由多种链霉菌 (如波赛链霉菌、天兰淡红链霉菌 (*S. coeruleorubidus*)、灰色链霉菌 (*S. griseus*)、链霉菌 C5 (*Streptomyces* sp. C5)、波塞链霉菌表灰变种 (*S. peucetius* var. *caesius*) 和分枝链霉菌 (*S. Bifurcus*)) 产生的抗肿瘤抗生素。这类抗肿瘤抗生素中的基本化合物为道诺霉素 (DiMarco 等人, 1964)。自从 1967 年和 1971 年起,道诺霉素及其 14- 羟基衍生物阿霉素分别开始被用于癌症化疗。道诺霉素尤其被用于血癌的治疗,而阿霉素展示出了较宽的抗癌谱。在目前已知被用于临床应用的的所有七种蒽环类药物中,有六种属于道诺霉素类。在这些化合物的生产工艺中,使用道诺红菌素 (daunorubicin) 或其糖苷配基 - 道诺红菌素酮作为起始物料以进行化学合成。

[0003] 蒽环类化合物被用于癌症化疗中已超过三十年的时间。阿霉素由于具有非常宽的抗癌谱,因此目前仍为主要使用的细胞毒素类药物。表阿霉素是重要程度仅次于阿霉素的抗肿瘤抗生素,现在表阿霉素变得更为重要了。

[0004] 道诺霉素类化合物可由通式 I 表述,

[0005]



[0006] 其最重要的衍生物示于表 1 中。

[0007] 表 1

[0008]

	R ₄	R ₁₄	2'取代基	4'
道诺红菌素	OCH ₃	H		
阿霉素	OCH ₃	OH		
表阿霉素	OCH ₃	OH		4'-表异构体
去甲柔毛霉素	H	H		
安那霉素	H	OH	I	4'-表异构体
吡喃阿霉素	OCH ₃	OH		4'-O-四氢吡喃基
戊柔比星	OCH ₃	戊酸酯		三氟乙酰基

[0009] 表阿霉素在临床中被用于治疗多种癌症。随着表阿霉素与阿霉素的竞争,其市场不断增长。新配方、缀合物以及与其他抗癌药物的新组合也扩大了表阿霉素的应用范围。例如,美国专利 5,874,550 中披露了表阿霉素的生产工艺,其包括通过发酵制备道诺红菌素,并对糖苷配基和糖部分进行合成修饰。

[0010] 去甲柔毛霉素(4-去甲氧道诺红菌素)被用于治疗某些类型的癌症,包括白血病、淋巴瘤、以及其他骨髓疾病。据称,去甲柔毛霉素所造成的副作用小于阿霉素。然而,去甲柔毛霉素每年的全球市场份额不超过 20kg,这可能是由于其生产工艺极为复杂,从而导致价格过高。由道诺霉素酮(daunomycinone)生产去甲柔毛霉酮(idarubicinone),其中道诺霉素酮是通过道诺红菌素的发酵以及随后的酸水解而获得的。继续对道诺红菌素酮(daunorubicinone)进行合成修饰,以得到去甲柔毛霉酮。按照(例如)美国专利 No. 4,325,946 中所述,通过一系列复杂的合成反应连接糖残基道诺糖胺(daunosamine)。在基因工程以前,几乎不可能生成可生产所需的非内源性物质的菌株。尽管对化学结构的修饰是微小的,例如表道诺红菌素与道诺红菌素的区别仅在于道诺糖胺部分中的 4'-OH 基团的立体化学结构的不同,但是仍需要多次突变以造成这些改变。这意味着需要进行多次诱变,并且选取并测试百万个克隆,以找到化学结构的所需改变。

[0011] 现在,人们深知细菌菌株的遗传修饰简便了非内源性物质的生产。然而,人们也认识到,尽管这些菌株以相对较高的水平产生内源性代谢物,但是其所累积的外源代谢物、杂合化合物的量较低。这使得其经济效益不高,因而该工艺通常不具备商业可行性。

[0012] 欧洲专利公开 EP1123310 描述了这样一种对蒽环类化合物的糖部分的成功修饰,其将基因 snogC 导入可产生蒽环的菌株,从而形成了阿克拉菌酮-4'-表-2-脱氧岩藻糖。然而,如上述那样,其生产滴度较低。

[0013] 此外,通常不能由复杂的基质(complex matrix)的纯化得到所需代谢物,其中复杂的基质通常包含 10 到 20 种类似产物。而产率低的另一原因是生产菌株对非内源性化合物的耐性较差。通过向发酵液中逐步加入毒性产物(例如表道诺红菌素、表阿霉素或去甲柔毛霉素)以使生产菌株适应非内源性代谢物的这种做法耗时很长,并且优选导致对生产菌株毒性较低的代谢物的累积。

[0014] 目前,在(例如)国际专利公开 WO 2006/111561 A1 中公布了关于以生物技术产生蒽环表阿霉素的产率及经济效益方面的一些进步。通过对链霉菌属中波赛链霉菌的菌株

进行诱变处理,可获得这样的微生物菌株,该菌株以至少 0.1g/升发酵液的浓度产生表波赛链霉菌(表阿霉素前体)和/或表阿霉素本身。

[0015] 在多个出版物中描述了蒽环类化合物的生物合成路径以及底物特异性(最近的一篇综述可参见 Niemi 等人,2002),不过对于道诺霉素生物合成的最终步骤、在糖基化后进行的糖苷配基修饰反应以及其中的分子遗传学,人们尚未充分理解。其生物合成路径示于图 1 中。蒽环类化合物的合成看来是连续的。正在开发道诺霉素类的一些新配方、缀合物、新分子以及前体药物,以用于抗癌药物。由道诺红菌素开始,通过化学合成来生产蒽环是一种多步工艺,其最终产率较低,这表明需要对工艺进行改进。因此,非常需要经改进的生产菌株以及高效且商业上可行的生产工艺。

附图说明

[0016] 图 1 为属于蒽环类化合物的道诺霉素类药物的生物合成路径示意图。

[0017] 图 2 为生产并从发酵批料中分离出表道诺霉素类化合物粗品以及 ϵ -紫红霉酮的示意图。

[0018] 图 3 示出了识别由微生物菌株获得的代谢物的典型层析谱,其中该菌株为本发明的能够以高滴度产生表道诺霉素以及 ϵ -紫红霉酮的菌株。典型的代谢物分布:Rt = 6.95013-DHED, Rt = 7.8504' - 表领地霉素, Rt = 8.7254' - 表道诺红菌素, Rt = 15.842 ϵ -紫红霉酮

发明内容

[0019] 在本说明书中,将诸如表道诺红菌素(CAS#56390-08-0)、13-二氢-表道诺红菌素(即,4'-表-柔毛霉素醇,下文中称为 13-DHED)、以及表领地霉素(由于其与 Feudomycin B 类似而获此命名)之类的表道诺霉素统称为表道诺霉素类化合物。

[0020] 本发明涉及经遗传修饰改善的生产菌株,优选为衍生自波赛链霉菌的菌株,其以至少 0.5g/升发酵液的滴度产生包含非内源性代谢物(如表道诺霉素类化合物)在内的蒽环代谢物混合物,这种蒽环代谢物混合物随后可用以生产蒽环抗生素,尤其是表阿霉素和去甲柔毛霉素。

[0021] 在本发明中,我们使用了波塞链霉菌表灰变种(*S. peucetius* var. *caesius*)的突变菌株(其保藏于 DSMZ,保藏号为 No. DSM 12245),其为巴尤霉素的生物合成阻断菌株,并且能够以超过野生型菌株上百倍的滴度产生道诺霉素。该菌株还产生大量的 ϵ -紫红霉酮。通过用基因 *ekr8* 来替换功能基因 *dnmV*(Otten 等人,1997),以进一步对该菌株进行基因修饰,这样使得道诺霉素代谢物在 4' 位上具有相反的立体化学结构,从而提供了表道诺霉素代谢物类。用于替换的基因是在鸟枪法克隆实验中意外发现的,该实验涉及利用得自 *snogC* 的探针从细菌培养物中分离基因(Torkkell 等人,2001)。该命名为 G001/pB70dv 的遗传修饰菌株以约 800mg/升发酵液的滴度累积表道诺红菌素代谢物,同时以 200mg/升至 300mg/升的相对较高的水平产生 ϵ -紫红霉酮。然而,经发现,表道诺霉素代谢物的混合物含有被称作表洋红霉素的 4-OH 化合物,使得纯化工艺变得有些复杂。

[0022] 从宿主菌株 G001 中除去质粒 pB70dv,并向由此获得的菌株中导入可获得的不同基因构建体,令人惊讶的是,质粒 pB89rdmB 使得菌株可产生表道诺霉素代谢物,而未

产生表洋红霉素。此外,当用诱变剂对该菌株培养物进行再次处理时,生产滴度得到了出人意料的提高。通过试管培养对产生表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的 200 个突变体进行研究,从而识别出高产菌株,即所产生的蒽环代谢物超过 1g/升发酵液。这些菌株产生了良好的表道诺霉素代谢物和 ϵ -紫红霉酮的混合物:典型的为表道诺红菌素:13-DHED:4'-表领地霉素: ϵ -紫红霉酮的滴度分别为 600mg/l:500mg/l:200mg/l:200mg/l。在全部的培养物中,还发现了少量副产物表阿霉素。

[0023] 对于这些菌株,糖苷配基部分的糖基化并未进行完全,并且在发酵液中发现了大量的关键的生物合成中间物 ϵ -紫红霉酮。在发酵液中使用树脂,并对这些经遗传修饰菌株进行培养,产生了更高滴度的代谢物,并且简化了下游工艺。

[0024] 本发明还涉及产生并从单批的发酵物料中分离出表道诺霉素类化合物粗品以及 ϵ -紫红霉酮的方法,其中表道诺霉素类化合物包括表道诺红菌素、13-二氢-表道诺红菌素(13-DHED)、4'-表领地霉素。

[0025] 本发明的工艺流程大致描述于图 2 中。

[0026] 本发明的目的在于使表道诺霉素和 ϵ -紫红霉酮的产生最大化,并使非内源性副产物的产生最小化,从而以这种方式简化随后的下游工艺。适用于本发明生产工艺中的生产菌株的重要方面为:

[0027] i) 其粗代谢物分布适于下游工艺处理,并且

[0028] ii) 其过生产(overproduction)能力不受菌株对表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮敏感性的限制。

[0029] 在本发明工艺中,将单批的发酵物料用作表阿霉素和去甲柔毛霉素(两种都是具有重要商业价值的蒽环类化合物)的合成材料的来源。

[0030] 发明详述

[0031] 考虑到现有工艺的已知缺陷,能够在单批发酵中提供高滴度的非内源性代谢物的混合物是具有重大的经济利益的,该非内源性代谢物的混合物适于进行随后的多于一种的蒽环抗生素的生产,尤其是表阿霉素和去甲柔毛霉素的生产。为了简化随后的下游加工工序,本发明在经济上更重要的方面是尽可能地避免其他的内源性化合物的形成。所有这些即为本发明的目的。

[0032] 为了达到更为高效的生产目的,最初使用经优化的菌株并通过单批发酵来产生一种蒽环,如表阿霉素。但是进行具有商业可行性的生产工艺的最佳方案是利用这样的修饰菌株,该修饰菌株能够在单批发酵中在同一时间以高滴度产生代谢物混合物,该代谢物混合物可用作生产多于一种的蒽环抗生素的起始物料。

[0033] 本发明提供了经改善的生产菌株,其用于通过发酵来产生表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的工艺中。若干种链霉菌菌株可产生道诺霉素,而优选将波赛链霉菌用作本发明中表道诺霉素类化合物的生产菌株。在本发明说明书(包括实施例)中,波塞链霉菌表灰变种 G001(DSM12245)被用作亲本菌株,该亲本菌株被用以进行遗传修饰,从而获得能够累积表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的菌株。

[0034] 然而,任何具有如下特征的菌株均适用于该工艺:

[0035] 1. 具有较高的表道诺霉素代谢物产生能力:总量超过 0.1g/升。

[0036] 2. 不完全的糖基化体系,从而在发酵过程中获得 ϵ -紫红霉酮:其份额超过总蒽

环代谢物部分的 10%。

[0037] 3. 分别以总蒽环代谢物部分的至少 10% 的量产生表道诺红菌素、13-DHED、表领地霉素和 ϵ -紫红霉酮所有这些代谢物。

[0038] 4. 产生道诺红菌素及相关代谢物的生物合成路径被阻断。

[0039] 波塞链霉菌表灰变种 G001 的突变菌株被用作本发明的亲本菌株。然而,具备产生道诺霉素类化合物的生物合成机理的一些其他菌株同样适用。该菌株中的产生鲍霉素的過程被化学诱变剂 NTG (N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍) 阻断,对相应基因 *dnrH* 进行测序,以识别出造成阻断鲍霉素生产的点突变。该点突变引起氨基酸发生改变;Gly 被 Asp 替换。尽管任何道诺红菌素生产菌株都是适合的,然而鲍霉素的生物合成受到阻断的高产菌株为本发明的优选宿主菌株。

[0040] 可通过能得到在受选宿主 (selected host) 中进行表达的基因的任何已知方法,来进行 4'-酮还原酶基因的克隆。我们将得自基因 *snogC* 的 DNA 片段 (Ylihonko 等人 (1999) 报道示出其能够产生 4' 表蒽环类化合物) 用作探针以筛选相应的酮还原酶基因,该酮还原酶基因与道诺糖胺路径中的糖基转移酶 (例如 *ekr8*) 具有较好的协同作用。使用大肠杆菌作为基因文库的宿主菌株,杂交是有利的筛选策略。用于杂交的探针可以是任何得自 *snogC* 或类似基因的片段,其可通过具有合适的限制位点的亚克隆或通过 PCR 扩增来产生。将基因文库用的菌落转移至膜上,以进行滤膜杂交,通常使用尼龙膜。可使用任何方法来检测杂交,然而尤其可使用 DIG 系统 (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany)。由于探针与杂交 DNA 是异源的,因此根据 Boehringer Mannheim 手册:DIS System User's Guide for Filterhybridization,优选在 65°C 以及较低的盐浓度下进行杂交的严谨洗涤。利用带有 *ekr8* 的菌株来监测发酵液中的表道诺霉素类化合物 (除了 ϵ -紫红霉酮以外),从而通过该实验来证实基因的功能,其中 *ekr8* 被克隆于高拷贝数表达载体 pIJE486 中。任何能够改变道诺糖胺中 4'-OH 基团的立体化学结构的 4'-酮还原酶均适于被克隆至产生道诺红菌素的菌株中,以使其根据本发明产生表道诺霉素 (除了 ϵ -紫红霉酮以外),然而优选的是,该基因能够高效表达。根据道诺霉素类化合物的生物合成路径,基因 *dnmV* (Otten 等人,1997) 主管道诺糖胺路径中的酮还原步骤。这个特别的基因是被转入基因的竞争者,因此优选使基因 *dnmV* 失活或将其除去。可通过任何已知扰乱基因功能的技术来实现基因 *dnmV* 的失活。为达到该目的,优选的是同源重组以进行基因失活。也可通过诸如化学诱变的随机技术来造成基因的突变。

[0041] 将基因 *ekr8* 克隆于不同构建体中,并将这些构建体导入通过除去亲本菌株 G001 中的质粒而获得的菌株中,并对所获菌株的代谢物进行分析。从一个克隆的代谢物分布来看,它有望用于下游工艺。该克隆载有质粒 pB89rdmB (*rdmB*, 参见 Jansson 等人,2003),并且表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的生产滴度几乎相当于菌株 G001 产生的道诺霉素类化合物滴度的 50%。质粒 pB89rdmB 含有基因 *ekr8* 和 *rdmB*。将该克隆称作 G005a。该基因构建体可在任何能够在链霉菌中复制的载体中进行表达。然而,优选将高拷贝数质粒用作载体。对于本发明而言,经发现质粒载体 pIJE486 (Ylihonko 等人,1996) 是有利的。

[0042] 已经有关于将 DNA 导入宿主细胞中的若干方法的描述。极为优选的方法为原生质体转化,本发明中一直使用了该方法。然而,任何被用以产生菌株、以使该菌株具有本发明菌株特征的方法和载体、以及上述方法和载体均可使用。

[0043] 经发现,上述含有质粒 pB89rdmB 的菌株对道诺霉素类化合物不具有足够的内源抗性,因此对表道诺霉素类化合物有些敏感,从而导致菌株的稳定性较差,这可由重复培养中所发现的生产滴度的改变而看出。通过使其适应表阿霉素或表道诺红菌素可增强其耐受性,从而提高 13DHED 的滴度。用诱变剂在严谨条件下对该菌株培养物进行处理,尽管可使用任何化学诱变剂,然而优选的是 NTG。与含有 pB89rdmB 的克隆相比,通过诱变处理获得了这样的克隆,其产生的相同代谢物的量得以提高,并且还观察到其具有长期稳定性。稳定性对于商业化生产而言是很关键的因素,因此尽管这一点很令人意外,但仍然是非常有利的。在无选择压力的条件下,该遗传修饰菌株是稳定的。该新克隆在第八天达到生产量的高峰,而亲本菌株 G001 则在第六天达到最高生产量。通常来说,突变菌株所产生的主要产物为表道诺红菌素、13-DHED、表领地霉素和 ϵ -紫红霉酮,而其他种类的蒽环级分不足产量的 10%。

[0044] 表 2 提供了关于本发明菌株的典型代谢物分布的信息。含量单位为 mg/l。

[0045] 表 2

[0046]

菌株	4' - 表道诺 红菌素	13-DHED	4' - 表领地 霉素 B	其他表道 诺霉素类 化合物(未 具体指明) *	ϵ -紫红霉 酮
G001/pB70dv	250-350	50-150	无	350-450	200-300
含有 pB89rdmB 的克隆	350-450	250-400	150-250	< 100	150-300
经 NTG 诱变处 理菌株	500-700	400-600	150-300	< 100	150-300

[0047] * 主要为表洋红霉素

[0048] 在试图使用波赛链霉菌或相关菌株以生产用于临床应用的蒽环类化合物时,人们所熟知的困难是其稳定性较差,即从产率方面来看,菌株培养物的生产滴度会发生改变。使用这种菌株在经济上是不可行的,最糟糕时,其会造成很大的经济损失,在最坏的情况中,会导致癌症患者不能得到所需的细胞毒性药物。菌株在产率方面的不稳定性是由道诺红菌素以及相关代谢物的诱变所导致的。因此,本发明的稳定的生产菌株对于生产蒽环类化合物是有利的,并且能够保证持续地供应重要的细胞毒性抗癌药物。

[0049] 可在含有适合的营养源的培养基中进行本发明经修饰的生产菌株的培养,优选为链霉菌菌株,最优选为波赛链霉菌菌株。优选的培养基为 E1 培养基,在实验 2 中对 E1 培

培养基进行了描述。pIJ486 的质粒体包含可使得菌株对硫链丝菌肽具有耐受性的基因。因此,一般的实验方案建议保留选择压力,以使含有质粒的菌株保持在培养液中。然而,令人惊讶的是,在没有硫链丝菌肽的条件下进行所述菌株的培养时,并未造成克隆质粒的丢失,这表明在培养中,优选的是未补加抗生素的 E1 培养基。

[0050] 在蒽环类化合物的生产方法中,有人描述了将吸附性树脂添加到发酵液中(Torkkell 等人,2001,以及Metsä-Ketelä等人,2003)。该毒性产品同样也是诱变剂,其从两方面造成影响:(i) 由毒性而造成生产降低;以及(ii) 使生产菌株发生诱变。因此,优选的是这样的吸附剂,该吸附剂不会对培养液中的产物或细菌造成干扰,而是会吸附那些被分泌出的代谢物以及那些累积在细胞中的代谢物。

[0051] 在本发明的优选实施方案中,在培养之前或在培养过程中,将非离子型吸附剂加入到培养基中,以从发酵液中收集代谢物,从而提高每批的回收率。在诸如 E1(在实验部分对其有更为详细的描述)之类的合适的培养基中,聚苯乙烯树脂(如Amberlite XAD-7(CAS #37380-43-1)(Rohm & Haas Germany GmbH, Frankfurt))或DiaionHP-20 会提高表道诺红菌素、13-DHED 以及表领地霉素的回收率。 ϵ -紫红霉酮会一同从发酵液中被吸附出来。由于 XAD-7 通过分子的交联,从而对表道诺霉素代谢物具有极强的吸附能力,所以获得高产率。经回收获得的表道诺霉素类化合物粗品含有约 500mg/l-700mg/l 的表道诺红菌素、400mg/l-600mg/l 的 13-DHED、150mg/l-300mg/l 的 4'-表领地霉素、150mg/l-300mg/l 的 ϵ -紫红霉酮。如果将 Diaion HP-20 用作吸附剂,则可回收得到相同的产率,但是加入到 E1 培养基中的吸附剂的量需要大幅提高。

[0052] 可在任何能使表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的产生最大化的条件下进行发酵。然而,有利的是在 26°C -34°C 以及 pH 为 6.5 至 7.5 的条件下,发酵 7 天至 14 天。可在发酵培养的任何时间添加吸附剂,但是若在发酵培养开始时向培养物中加入吸附剂,则能获得最佳的产率。

[0053] 可通过透析将吸附于吸附树脂中的物质与发酵液分离,其中所述吸附于吸附树脂中的物质主要包含表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮。使用有机溶剂来萃取出树脂,优选使用甲醇和丁醇。溶剂的建议用量为发酵罐中发酵液体积的 10%至 50%。重复萃取 1 至 5 次,以释放出用于所有蒽环代谢物的吸附剂,该树脂在用水洗涤后是可循环利用的。

[0054] 在从吸附剂中回收了所有代谢物之后,对含有 ϵ -紫红霉酮的糖苷配基部分进行分离是有利的。

[0055] 对蒽环类化合物粗品的继续加工

[0056] 13-DHED 向表道诺红菌素的转化

[0057] 可通过层析以及随后的结晶,从而轻松地将 13-DHED 从糖苷部分中分离出来,同时也会分离出表道诺红菌素。13-DHED 可吸附于加入到链霉菌发酵液中的树脂上,该链霉菌能够进行道诺霉素的合成,尤其是合成的后期步骤。尽管任何菌株都是合适的,然而有利的是使用早期生物合成路径被阻断且不能累积道诺霉素代谢物的菌株。

[0058] 表道诺红菌素向表阿霉素的转化

[0059] 将表道诺红菌素粗品(纯度 $\geq 80\%$)用作合成化学的起始物料,以获得表阿霉素,其中表阿霉素是常用的抗癌药物。可使用任何合成反应或生物催化反应系列来进行 14-羟基化。

[0060] 将表道诺红菌素转化为其 14- 羟基化形式 - 表阿霉素存在多种可能性。尽管在发酵液中发现了微量的表阿霉素,但是内源性基因产物 14- 羟化酶自身在培养条件下不具有足够的活性,以将所有形成的表道诺红菌素转化为表阿霉素。根据我们的实验(数据未示出),尽管有非常多的拷贝的 14- 羟化酶基因,但是仍不能完成表阿霉素生产过程。然而,两个美国专利公开 US 5,955,319 和 US 6,210,930 披露了通过基因产物 doxA,从而以较低的水平将道诺红菌素转化为阿霉素。显而易见的是,生物转化深受环境的影响,因此我们尚未成功地重复该转化过程。

[0061] 与由道诺红菌素合成阿霉素类似,将羟基加在完整的表道诺红菌素的 C14 上存在多种可能性。

[0062] 在将表阿霉素从合成混合物中萃取出来之后,可通过层析和 / 或结晶来进行表阿霉素的纯化。然而,为了达到活性药用成分所需的质量,层析分离后表阿霉素的纯度必须 $\geq 97\%$ 。

[0063] ϵ - 紫红霉酮向去甲柔毛霉素的转化

[0064] 已知生物合成按照图 1 中所示出的顺序进行。使阿克拉菌酮(多种蒽环类化合物的典型前体)进行 11- 羟基化,以形成经糖基化的 ϵ - 紫红霉酮。对于糖基化形式,对 10 位的修饰需要使用例如道诺糖胺之类的糖物质,尽管其他的糖残基是可用的。在进行了 10 位修饰后,发生 13- 氧合,并且道诺红菌素生物合成的最终步骤为 C-4 上的 O- 甲基化。因此,尽管存在 4- 脱氧形式,仍可成功地进行 10 位修饰和 13 位修饰以及糖基化。4- 脱氧阿克拉菌酮以及 4- 脱氧 - ϵ - 紫红霉酮均被转化成去甲柔毛霉素。

[0065] 由于本发明工艺能够产生并由单批发酵料中回收 ϵ - 紫红霉酮、表道诺红菌素、13-DHED 和 4'- 表 - 领地霉素,因此本发明工艺是确实高效的。

[0066] 基于上述原因,可有利地将本发明的菌株用于发酵中,以生产用于商业应用的表阿霉素和去甲柔毛霉素。本发明的工艺能够以高产率和低成本生产重要的蒽环类化合物。该发酵工艺的流程示于图 2 中。通过下述实施例对本发明进行更为详细的描述。对本领域技术人员显而易见的是,随着技术的进步,可以不同的方式来实施本发明的概念。本发明及其实施方案并不仅限于上述具体例子,而是可在权利要求范围内进行改变。

实施例

[0067] 实施例 1

[0068] 产生高滴度表道诺霉素类化合物和 ϵ - 紫红霉酮的微生物菌株的构建

[0069] 在大肠杆菌中进行链霉菌 DNA 的操作,随后将扩增 DNA 导入链霉菌菌株中。本实验中所用的菌株和质粒列于下表 3 中。

[0070] 表 3. 菌株和质粒

[0071]

菌株 / 质粒	说明	参考文献或来源
大肠杆菌 XL1-Blue	大肠杆菌克隆用宿主	Stratagene

G001	产生道诺毒素的链霉菌菌株	DSM12245
G001/pB70dv	产生表道诺毒素类化合物和表洋红毒素的链霉菌菌株	DSM 19076

[0072] 分别按照 Hopwood 等人 (1985) 以及 Sambrook 等人 (1989) 的实验室手册中的描述进行链霉菌和大肠杆菌菌株的培养以及 DNA 的分离和操作。通过高压电穿孔将质粒导入大肠杆菌菌株中,并通过原生质体转化将质粒导入链霉菌中 (Ylihanko 等人,1996)。使用基因 *snogC* 作为探针,从而从链霉菌基因文库中克隆出相应的基因。将该被克隆出的基因在大肠杆菌中扩增并转移至 G001 中的载体 pIJE486 中,将通过小规模培养获得的产物与 G001 产物加以对比,以对其进行研究。通过这种方式,发现带有 *ekr8* 的克隆除了产生道诺毒素类化合物外,还会产生表道诺毒素类化合物。对克隆进行选择,使其不能产生典型的道诺红菌素代谢物,而是累积表道诺毒素类化合物,将该克隆命名为 G001/pB70dv (保藏号 :DSM 19076)。按照实施例 2 中所述条件对该克隆进行培养,发现所获产物含有表道诺毒素类化合物以及表洋红毒素类化合物。在 TSB 培养基 (每升 TSB 培养基中使用 30g 胰酶大豆肉汤粉) 中,对含有质粒 G001/pB70dv 的克隆进行多轮培养,以消除质粒。所获菌株不再带有该质粒,并产生糖苷配基。将基因 *ekr8* 克隆至带有参与蒽环生物合成的后期步骤的基因的不同构建体中,并导入上述产生糖苷配基的菌株中。对在实施例 2 中所述条件下进行小规模培养而获得的样品进行分析研究,所获带有质粒 pB89rdmB 的克隆能够产生表道诺毒素代谢物,而不会继续在发酵液中继续累积表洋红毒素。其含量示于上表 2 中。

[0073] 表洋红毒素类化合物的产生可能是由于克隆 G001/pB70dv 中 4-O- 甲基化酶的不完全活性所造成的。因此,认为在构建体 pB89rdmB 中克隆的基因 *rdmB* 是进行完整生物合成的原因,从而避免了表洋红毒素类化合物的产生。尽管尚未证明它具有 O- 甲基转移酶活性,但是 *rdmB* (ACCESSION U10405) 与 *dnrK* 具有很高的序列相似性 (参见 Jansson 等人, 2003)。借助 NTG (N- 甲基 -N' - 硝基 -N- 亚硝基胍) (Sigma-Aldrich) 继续对带有 pB89rdmB 的菌株进行诱变处理。诱变处理后,在琼脂板上挑取约 200 个菌落,并首先在 3ml 的 E1 培养基中进行培养。关于培养条件的其它细节,可参见下面的实施例 2。对通过随机诱变处理而获得的、其表道诺毒素类化合物的产生得以改善、并且具有与带有 pB89rdmB 的菌株相同的产物分布谱的克隆进行多轮培养。最终选取那些与以相同比例带有 pB89rdmB 的克隆相比,能够产生更多表道诺毒素代谢物的微生物菌株,并且培养基中不含产生选择压力的硫链丝菌肽。

[0074] 经过十四轮的重复培养,证实了这种菌株具有适于商业化生产的稳定性 (数据未示出)。

[0075] 实施例 2

[0076] 产生高滴度表道诺毒素类化合物和 ϵ - 紫红霉酮的微生物菌株的培养和产物分布

[0077] 将按实施例 1 中所述方法获得的菌株在 50ml E1 培养基中培养,其中 E1 培养基中补加有 XAD-7 (15g/l)。(E1 :每升自来水中含有 :葡萄糖 20g ;可溶性淀粉 20g ;肽 :5g ;酵母

提取物 2.5g ; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.3g ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g ;NaCl 3g ; $CaCO_3$ 3g ;pH 7-7.5)。

[0078] 为了测定生产滴度,从培养的第四天开始提取化合物,直至第十天结束。为了测定所产生的蕙环代谢物的量,将 XAD-7 与水一同从一个培养瓶中倒出,洗涤 XAD-7,并将之用 40ml 甲醇振荡至少 30 分钟以进行萃取。使用 HPLC 来分析样品。XAD-7 在 E1 培养基中的使用使表道诺霉素的产率由约 400mg/l-500mg/l 增至 500mg/l-700mg/l。其他产物参见表 2。最佳生产时间为十一天。在吸附剂的存在下,在培养结束时未发现菌落形态的改变,这表明通过在培养期间使表道诺霉素代谢物吸收至 XAD 中,可防止表道诺霉素产生毒性和诱变作用。

[0079] 所获产物的典型层析谱示于图 3 中。

[0080] 实施例 3

[0081] 表道诺霉素代谢物和 ϵ -紫红霉酮在发酵中的产生

[0082] 按照如下方法进行种子培养:在四个盛有 60ml E1 培养基的烧瓶中,对能够以高滴度产生表道诺霉素类化合物和 ϵ -紫红霉酮的菌株进行四天的培养,其中所述 E1 培养基补加有硫链丝菌肽 (5mg/l)。将培养物合并,并使用这 240ml 发酵液对发酵罐内的补加有 XAD-7 (15g/l) 的 20 升 E1 培养基进行接种。在 20 升的体积内发酵 11 天,发酵条件为:30℃ 至 34℃,350rpm,通气 10 升/分钟。

[0083] 实施例 4

[0084] 表道诺霉素类化合物粗品和 ϵ -紫红霉酮的回收和纯化

[0085] 4.1 表道诺霉素类化合物粗品的纯化

[0086] 从由发酵获得的 20 升发酵液中,将吸附有各种被取代表道诺霉素和 ϵ -紫红霉酮的 XAD-7 溶析出来。用水洗涤该树脂,以除去细胞碎片。树脂沉淀用 1 升甲醇萃取两次到五次。向 3 升合并后的甲醇萃取液中加入 1 升氯仿,以借助氯仿来萃取出糖苷配基。将溶剂层和水层分离。在微碱性条件下将位于水层中的糖苷萃取至氯仿中,用饱和 $NaHCO_3$ 使 pH 稳定。用水洗涤以除去盐。最终使氯仿相过滤通过筒式过滤器。使用所述方法得到的表道诺霉素的产率相当于粗萃取物的 70%。

[0087] 4.2 ϵ -紫红霉酮的纯化

[0088] 将在上述 4.1 中通过萃取而获得的溶剂部分干燥,并浓缩至较小的体积。使用氯仿作为洗脱液来进行快速层析。通过将纯化后的部分溶解至氯仿-甲醇混合物中、并浓缩至较小的体积,从而使其结晶,这样获得纯度 > 90% 的 ϵ -紫红霉酮。将干燥后的沉淀物溶解,并使用 $CHCl_3$:丙酮:甲醇溶剂体系进行快速层析以将其纯化。萃取出糖苷。进行两次萃取以使产率最大化。在从氯仿中萃取出全部糖苷后,用饱和 $NaHCO_3$ 进行萃取以使 pH 稳定。随后用 RO 水萃取两至四次以除去盐。用两相分离器使相发生分离。

[0089] 实施例 5

[0090] 各化合物从表道诺霉素类化合物级分中的分离

[0091] 进行层析,以从实施例 4.1 中获得的表道诺霉素类化合物中分离出表道诺红菌素、13-DHED 以及表领地霉素。将过滤后的氯仿泵入硅胶柱中,并使用氯仿-甲醇溶液作为流动相,以通过层析法进行纯化。分别收集这三种代谢物的纯级分,并分别将各级分汇集。向表道诺红菌素级分中加入丁醇,并调节为酸性 pH。随后开始蒸发。当蒸发持续进行时,表道诺红菌素开始结晶。将晶体过滤并在真空干燥箱中干燥。借助乙醇-水溶液使 13-DHED

级分结晶。

[0092] 实施例 6

[0093] 表道诺霉素粗品向表阿霉素的合成转化

[0094] 通过作为一锅法反应 (one spot reaction) 的化学合成, 将经纯化的表道诺红菌素转化为表阿霉素, 该化学合成包括两个反应: 溴化和水解。在第一个反应中, 用溴在 C-14 位置上进行取代, 在第二步骤中, 在 C-14 位置上进行羟基化, 以形成表阿霉素。将按照实施例 5 中所述获得的表道诺红菌素溶解在甲醇中, 并加入溴。在 10℃ 下进行反应, 并用 HPLC 加以分析。在一天后, 通过加入甲酸钠缓冲液从而使溴化反应停止。将 pH 调整为 < 3, 并且将反应混合物的温度调至 50-60℃。反应进程由 HPLC 监测, 当表阿霉素的量不再增加时, 通过使反应混合物冷却从而将反应停止。

[0095] 通过 RP- 硅胶层析来进行纯化。将各级分收集并用 HPLC 分析, 并且将纯级分 (纯度 > 97%) 汇集在一起。在结晶后, 所获纯度超过 98%。

[0096] 实施例 7

[0097] 糖苷配基和蒽环类化合物的分析检测

[0098] HPLC

[0099] 仪器: Jasco HPLC

[0100] 柱: Phenomenex, Aqua, 150 × 4.6mm, 3 μm

[0101] 溶剂 A: 0.05% TEA (用 TFA 将 pH 调节至 2.0)

[0102] 溶剂 B: THF, 其中含有 10% 的 MeOH

[0103] 柱温: 室温

[0104] 流速: 1ml/ 分钟

[0105] 检测器: UV-Vis, 480nm

[0106] 注射量: 5 μl

[0107] 梯度:

[0108]

时间 (分钟)	溶剂 A [%]	溶剂 B [%]
0	80	20
10	60	40
27	45	55
28	10	90
30	10	90
31	80	20
36	80	20

[0109] 微生物的保藏

[0110] 根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的规定, 在 DMSZ (全称为 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, 地址为 Mascheroder 路 1b, 邮编 :D38124, Braunschweig, 德国) 将如下微生物进行保藏。

[0111]	微生物	编号	保藏日期
[0112]	G001/Pb70dv	DSM 19076	2007-02-23

[0113] 文献列表

[0114] Di Marco A, Silvestrini R, Gaetani M, Soldati M, Orezzi P, DasdiaT, Scarpinato BM, Valentini L:1964, “道诺霉素”, 一种新型的紫红霉素族抗生素 (‘daunomycin’, a new antibiotic of the rhodomycin group). 自然 (Nature)15: 706-707.

[0115] Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM 和 Schrepf H(1985), 链霉菌的基因操作: 实验室手册 (Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual), John Innes 基金会 (John Innes Foundation) 出版, Norwich.

[0116] Jansson A, Niemi J, Lindqvist Y, Mantsala P 和 Schneider G(2003), 阿克拉霉素-10-羟化酶 - 一种浅绛红链霉菌的蒽环生物合成中所涉及的 S-腺苷-L-甲硫氨酸依赖型甲基转移酶同系物 - 的晶体结构 (Crystal structure of aclacinomycin-10-hydroxylase, a S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase homolog involved in anthracycline biosynthesis in Streptomyces purpurascens). 分子生物学杂志 (J Mol Biol)334:269-280.

[0117] **Metsä-Ketelä** M, Palmu K, Kunnari T, Ylihonko K 和 **Mäntsälä** P(2003) 蒽环向 Angucyclines 的生物合成工程 (Engineering Anthracycline Biosynthesis toward Angucyclines), 抗微生物剂和化学治疗 (Antimicrobial Agents and Chemotherapy), 47(4), 1291-1296

[0118] Niemi J, Kantola J, Ylihonko K, **Mäntsälä**, P. (2002), 微生物次级代谢产物中生物合成、遗传和调控: 蒽环的生物合成: 步骤、酶和基因 (综述) (Anthracycline biosynthesis: steps, enzymes and genes (review) in Microbial secondary metabolites: biosynthesis, genetics and regulation) (Francisco Fierro & Juan Francisco Martin 编著), Research Signpost 出版社, 37/661, Kerala, 印度.

[0119] Otten SL, Gallo MA, Madduri K, Liu X, Hutchinson CR. (1997), 道诺红菌素前体胸苷二磷酸-L-道诺糖胺的生物合成所需的三种酶的编码基因 - 波赛链霉菌 dnmZUV 基因的克隆与表征 (Cloning and characterization of the Streptomyces peucetius dnmZUV genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunorubicin precursor thymidine diphospho-L-daunosamine), 细菌学杂志 (J Bacteriol). 179(13), 4446-50.

[0120] Sambrook J, Fritsch EF 和 Maniatis T(1989), 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: a Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory 出版社, Cold Spring Harbor, 纽约.

[0121] Torkkell S, Kunnari T, Palmu K, **Mäntsälä** P, Hakala J 和 Ylihonko K(2001),

诺加链霉菌的诺加霉素生物合成的完整基因簇 :20-kb DNA 区域的表征以及杂交结构的生成 (The entire nogalamycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces nogalater* : characterization of a 20-kb DNA region and generation of hybrid structures), 分子遗传学和基因组学 (Molecular Genetics and Genomics) 266 :276-288.

[0122] Torkkell S. 2001, 蒽环抗生素 :诺加霉素 - 一种诺加链霉菌产物 - 的生物合成路径以及分子遗传学 (Anthracycline antibiotics :Biosynthetic pathway and molecular genetics of nogalamycin, a product of *Streptomyces nogalater*), Publications in Annales Universitatis Turkuensis- 序列号 :275.

[0123] Ylihönkö K, Tuikkanen J, Jussila S, Cong L 和 Mäntsälä P (1996), 在诺加链霉菌中诺加霉素的生物合成中所涉及的基因簇 :序列分析以及蒽环路径的早期阻断突变的互补 (A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater* : sequence analysis and complementation of early blocked mutations of the anthracycline pathway), 分子基因遗传学 (Mol Gen Genet) 251 :113-120.

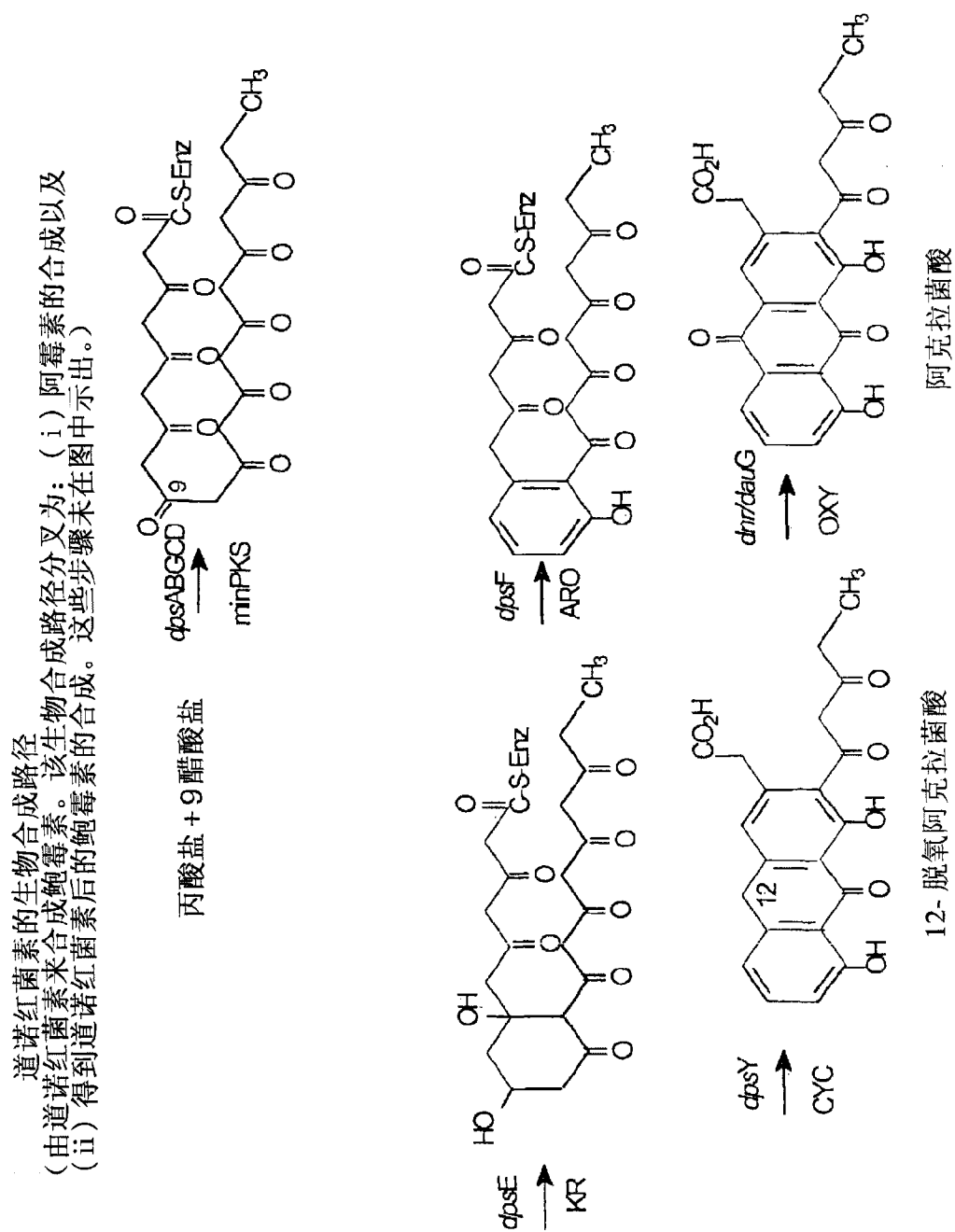
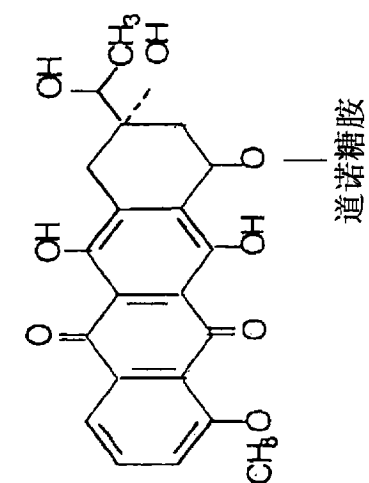
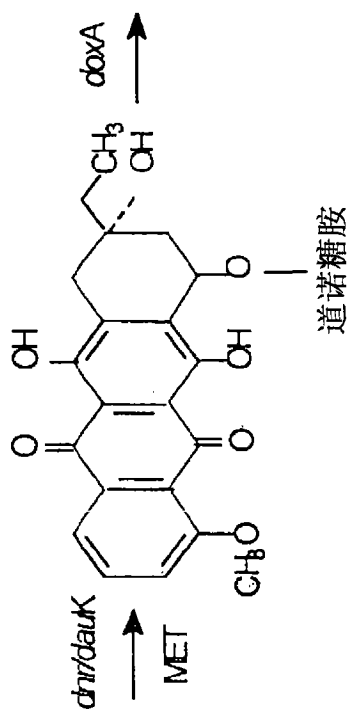


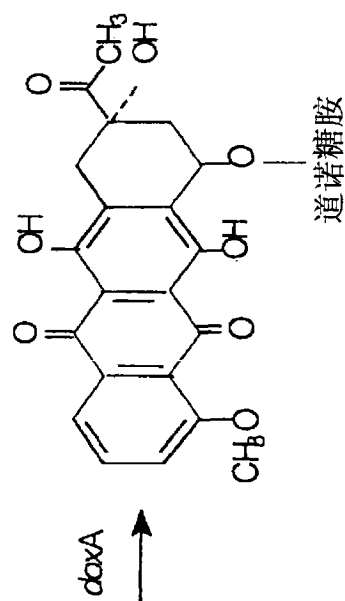
图 1a：



13- 二氢道诺红菌素



13- 脱氧道诺红菌素



道诺红菌素

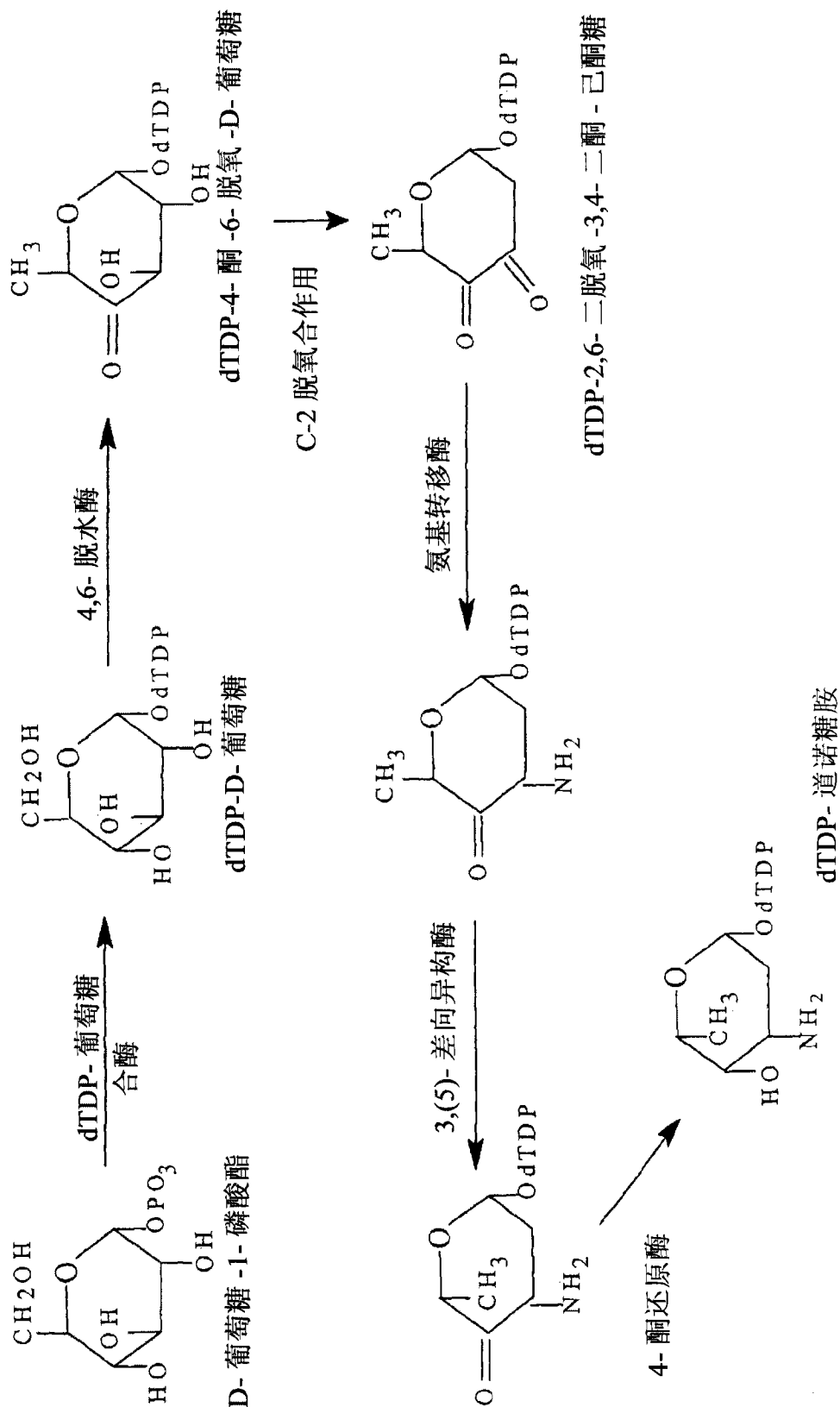


图 1b :dTDP- 道诺糖胺（用于道诺红菌素生物合成的 C-7 糖基化步骤中）的生物合成路径

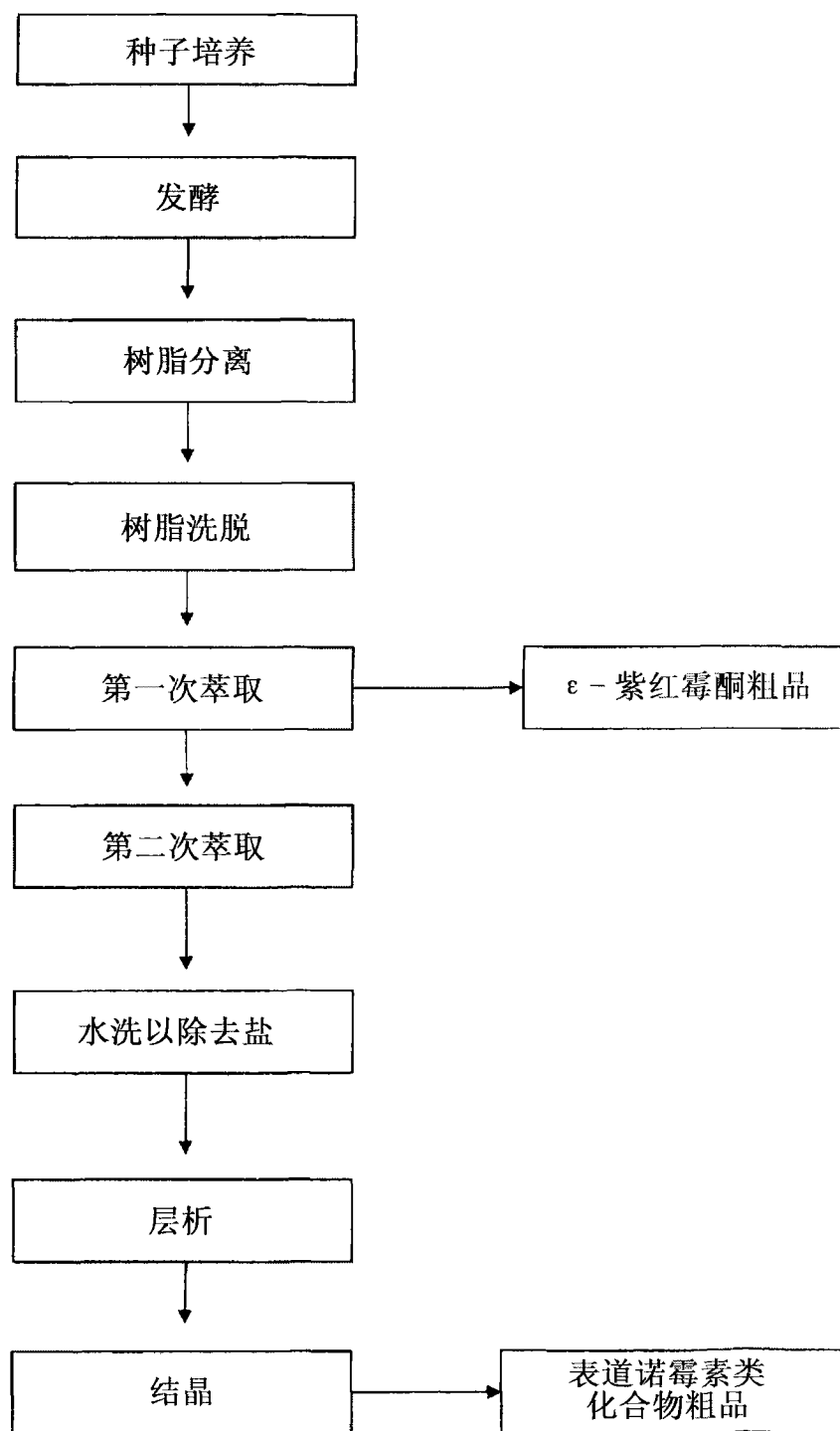


图2:表道诺霉素类化合物粗品的发酵工艺以及所述代谢物的纯化示意图。

鉴别由微生物菌株获得的代谢物的典型层析谱，其中该菌株为本发明的能够以高滴度产生表道诺霉素类化合物以及 ϵ -紫红霉酮的菌株。
典型的代谢物分布：Rt=6.950 13-DHED, Rt=7.850 4-表领地霉素，
Rt=8.725 4-表道诺红菌素，Rt=15.842 ϵ -紫红霉酮

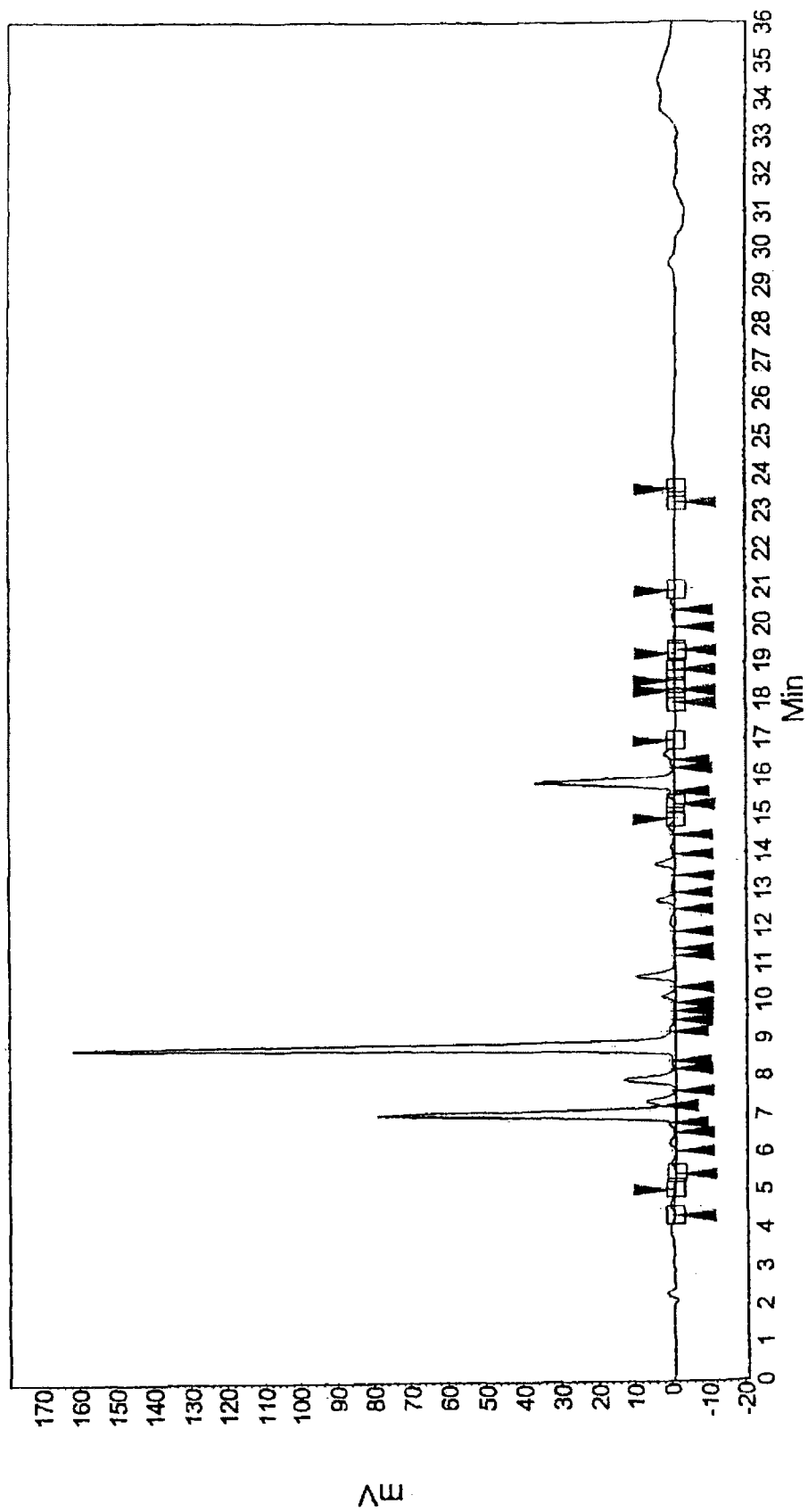


图 3