



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I852986 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：109103905

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 02 月 07 日

(51)Int. Cl. : C12N9/04 (2006.01)

C12P33/02 (2006.01)

C07J5/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/02/08 歐洲專利局

19305153.9

(71)申請人：法商優若亞琵法國公司 (法國) EUROAPI FRANCE (FR)

法國

(72)發明人：拉特曼 克勞斯 托比亞斯 LATTEMANN, CLAUS TOBIAS (DE)；捷諾卡 博恩 JANOCHA, BERND (DE)；雷瑟 漢斯 福克 RASSER, HANS-FALK (DE)；瑞索姆 賽巴斯汀 RISSOM, SEBASTIAN (DE)

(74)代理人：陳長文；呂光；莊名字

(56)參考文獻：

WO 2006/124141A2

期刊 Devendran, Saravanan et al. Identification and characterization of a 20 β -HSDH from the anaerobic gut bacterium *Butyricicoccus desmolans* ATCC 43058. Journal of lipid research vol. 58 American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2017 916-925

期刊 Duax, W L, and D Ghosh. Structure and function of steroid dehydrogenases involved in hypertension, fertility, and cancer. Steroids vol. 62 Elsevier 1997 95-100

期刊 Alina Swizdor, Teresa Kolek, Anna Panek and Natalia Milecka Selective Modifications of Steroids Performed by Oxidative Enzymes Current Organic Chemistry vol 16 Bentham Science Publishers 2012 2551-82

審查人員：陳婷妤

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：3 共 27 頁

(54)名稱

微生物之生物技術最佳化

(57)摘要

本發明係關於一種基因改造之細菌及其工業應用，尤其於類固醇之 1,2-脫氫中之應用。

The present invention concerns a genetically modified bacterium and to its industrial application, in particular in the 1,2-dehydrogenation of steroids.



I852986

【發明摘要】

【中文發明名稱】

微生物之生物技術最佳化

【英文發明名稱】

BIOTECHNOLOGICAL OPTIMIZATION OF MICROORGANISMS

【中文】

本發明係關於一種基因改造之細菌及其工業應用，尤其於類固醇之1,2-脫氫中之應用。

【英文】

The present invention concerns a genetically modified bacterium and to its industrial application, in particular in the 1,2-dehydrogenation of steroids.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

微生物之生物技術最佳化

【英文發明名稱】

BIOTECHNOLOGICAL OPTIMIZATION OF MICROORGANISMS

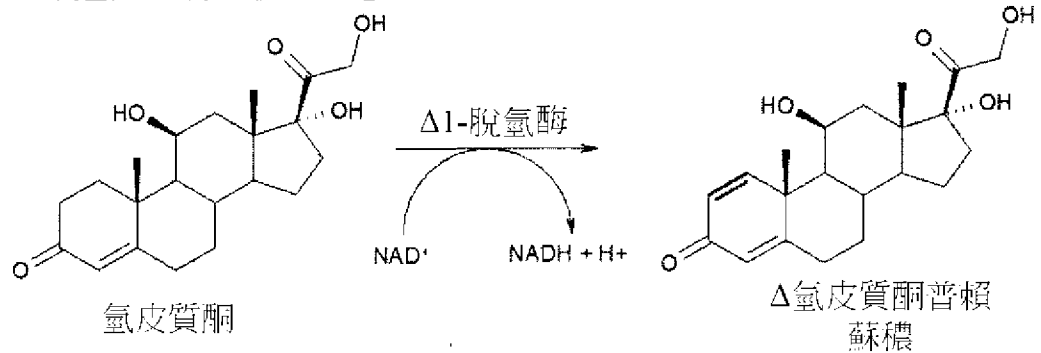
【技術領域】

【0001】本發明係關於一種基因改造之細菌及其工業應用，尤其類固醇之1,2-脫氫中之應用。

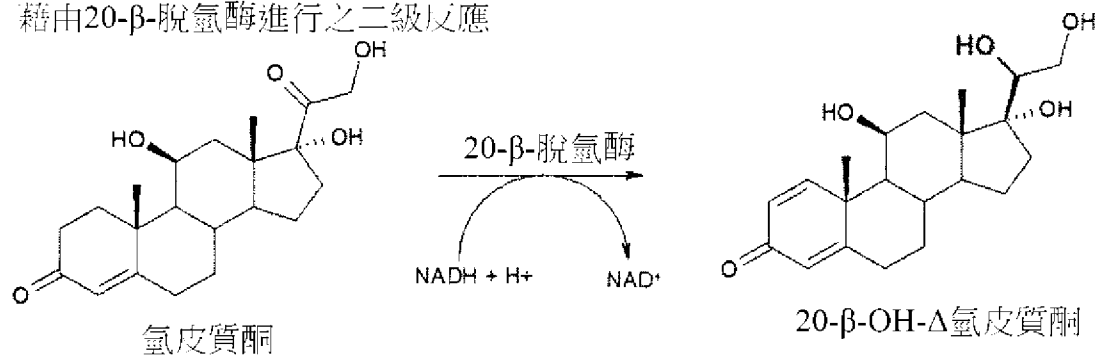
【先前技術】

【0002】類固醇之1,2-脫氫(亦稱為 Δ^1 -脫氫)可藉由用具有恰當酶系統之細菌進行生物轉化來進行。舉例而言，轉化可藉由類諾卡氏菌科(*Nocardioideaceae* family)之微生物催化，其經製備且用作細菌懸浮液或在細菌懸浮液之細胞溶解之後用作上清液。不幸地，微生物亦表現催化類固醇分子上之第二(非所需)反應之酶，其為位置20處之酮基還原且導致在本文中稱為「20-OH雜質」之副產物產生。下文用氫皮質酮之實例示意此等兩種反應。

藉由 $\Delta 1$ -脫氫酶進行之初級反應



藉由20- β -脫氫酶進行之二級反應



【0003】已識別出引起在位置20處類固醇中之酮還原的酶20 β -HSDH(20- β -羥基類固醇脫氫酶)，其為造成此副反應之原因。

【發明內容】

【0004】本發明人現已識別造成副反應活性之基因且遺傳工程改造缺乏此活性之微生物。當用於類固醇轉化中時，其不再產生非所需之副產物且根據本發明之該遺傳工程改造之微生物可在無任何一或多個潛在成熟步驟的情況下直接用於類固醇轉化。亦可省略用於純化產物以移除非想要副產物之額外步驟。可直接在產生之後使用生物轉化之產物。總之，此產生更高產物產率、更高產物品質及更簡單之生產過程。

【圖式簡單說明】

【0005】圖1：藉由雙交換之基因不活化之示意性圖示。具有由兩個同源肩部(包含正方形之方框)側接之相關基因之截斷形式(包含字母「T」之箭頭)及安普黴素(apramycin)抗性 β -葡萄糖醛酸苷酶之基因(包含垂直

線及波浪線之箭頭)的質體與細菌之染色體及與染色體中之相應序列重組的同源肩部中之一者接觸(步驟1)。此步驟導致形成中間單一交換構築，將整個質體整合至基因組(由點線包圍)中。接著菌株含有相關基因之兩種變異體且展現對安普黴素之抗性 β -葡萄糖醛酸苷酶活性。在幾輪培養(步驟2)之後，兩個剩餘的同源肩部彼此相互作用(點線)且發生雙交換(步驟3)。接著，所獲得之菌株僅含有基因之截斷形式(包含字母「T」之箭頭)。

【0006】圖2：在用簡單類諾卡氏菌自氫皮質酮產生潑尼松龍之經典製程之後所獲得之產物的HPLC-層析圖。箭頭指向20-OH潑尼松龍雜質。

【0007】圖3：在用簡單類諾卡氏菌之雙交換突變體NOSIM5169自氫皮質酮產生潑尼松龍之經典製程之後所獲得之產物的HPLC-層析圖。箭頭指向通常觀測到20-OH潑尼松龍雜質之位置。

【實施方式】

【0008】因此本發明之第一態樣係關於一種基因改造之細菌，其中與對應未改造之細菌相比，降低或抑制編碼20 β -HSDH之基因的表現，其中該對應未改造之細菌具有 Δ 1-脫氫酶活性及20- β -脫氫酶活性。

【0009】如本文所用，術語「**對應未改造之細菌**」指示與接著進行基因改造的未改造之細菌相同的細菌菌株。

【0010】術語「**細菌**」意謂原核微生物。未改造之細菌具有20 β -HSDH活性及 Δ 1-脫氫酶活性。在一個實施例中，細菌來自選自以下各者中之目：放線菌目(Actinomycetales order)、梭菌目(Clostridiales order)、氣單胞菌目(Aeromonadales order)、巴斯德氏菌目(Pasteurellales order)、芽孢桿菌目(Bacillales order)、乳桿菌目

(Lactobacillales order)、雙歧桿菌目(Bifidobacteriales order)及紅蝨菌目(Coriobacteriales order)。在一個較佳實施例中，細菌來自放線菌目。舉例而言，細菌可為類諾卡氏菌，諸如簡單類諾卡氏菌(*Nocardioides simplex*)；鏈黴菌(*Streptomycetaceae*)，諸如白色鏈黴菌(*Streptomyces albus*)；或分支桿菌(*Mycobacteriaceae*)，諸如鳥分支桿菌(*Mycobacterium avium*)，且特別地為鳥分枝桿菌副結核亞種MAP4(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* MAP4)。在一個特定實施例中，細菌來自類諾卡氏菌科，較佳地為類諾卡氏菌，且最佳地，細菌為簡單類諾卡氏菌。

【0011】術語「來自類諾卡氏菌科之細菌」意謂來自此科具有20 β -HSDH活性及 Δ 1-脫氫酶活性之任何細菌，諸如例如以下屬之細菌：放線菌、氣微菌(*Aeromicrobium*)、弗林德斯菌(*Flindersiella*)、弗萊德門菌(*Friedmanniella*)、高麗菌(*Kribbella*)、大理石雕菌(*Marmoricola*)、微白霜菌(*Micropruina*)、黃黴菌(*Mumia*)、類諾卡氏菌(*Nocardioides*)、脂肪桿菌(*Pimelobacter*)、丙酸桿菌(*Propionicicella*)、丙酸單胞菌(*Propionicimonas*)、騰格里放線菌(*Tenggerimyces*)或嗜熱菌(*Thermasporomyces*)。較佳地，來自類諾卡氏菌科之細菌係簡單類諾卡氏菌(先前命名為簡單節桿菌(*Arthrobacter simplex*)或簡單棒狀桿菌(*Corynebacterium simplex*)或簡單脂肪桿菌)。較佳地，細菌為簡單類諾卡氏菌ATCC6946。其他較佳細菌包括黃色弗萊德門菌(*Friedmanniella flava*)(分類學ID:1036181)、相模原弗萊德門菌(*Friedmanniella sagamiharensis*)(分類學ID:546874)、獨島類諾卡氏菌(*Nocardioides dokdonensis*)FR1436(分類學ID:1300347)、連城類諾卡氏菌

(*Nocardioides lianchengensis*)(分類學ID:1045774)、耐冷類諾卡氏菌(*Nocardioides psychrotolerans*)(分類學ID:1005945)、四川類諾卡氏菌(*Nocardioides szechwanensis*)(分類學ID:1005944)、科伊爾棒狀桿菌(*Corynebacterium coyleae*)(分類學ID:53374)、喜甘胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glyciniphilum*)AJ 3170(分類學ID:1404245)、克氏棒狀桿菌(*Corynebacterium kroppenstedtii*)DSM 44385(分類學ID:645127)、婁氏棒狀桿菌(*Corynebacterium lowii*)(分類學ID:1544413)、企鵝棒狀桿菌(*Corynebacterium spheniscorum*)(分類學ID:185761)、活瘤胃棒狀桿菌(*Corynebacterium vitaeruminis*)DSM 20294 (分類學ID:1224164)、海產氣微菌(*Aeromicrobium marinum*)DSM 15272(分類學ID:585531)、藤黃類諾卡氏菌(*Nocardioides luteus*)(分類學ID:1844)、耐鹽棒狀桿菌(*Corynebacterium halotolerans*) YIM 70093 = DSM 44683 (分類學ID:1121362)、海洋棒狀桿菌(*Corynebacterium maris*)DSM 45190 (分類學ID:1224163)、里格爾棒狀桿菌(*Corynebacterium riegelii*)(分類學ID:156976)。

【0012】術語「**基因**」意謂編碼胺基酸特定序列或對應於胺基酸特定序列之DNA序列，該等胺基酸包含一或多種蛋白質或酶之全部或部分，且可包括或可不包括調節DNA序列，諸如啟動子序列，其測定例如表現基因之條件。特定言之，術語基因可意欲用於編碼蛋白質之基因組序列，亦即包含調節子、啟動子、內含子及外顯子序列之序列。

【0013】如本文所用，術語「**編碼20 β -HSDH之基因**」對應於編碼任何細菌之20 β -HSDH之基因。較佳地，編碼20 β -HSDH之基因與序列SEQ ID NO:1具有至少60%一致性，更佳地其與序列SEQ ID NO:1具有大

於70%、75%、80%、85%、90%、95%且最佳大於99%一致性。根據實施例，編碼20 β -HSDH之基因與序列SEQ ID NO:3具有至少60%一致性，更佳地其與序列SEQ ID NO:3具有大於70%、75%、80%、85%、90%、95%且最佳大於99%一致性。

【0014】「與參考序列具有至少x%一致性之基因」意指核酸之序列與參考序列之不同之處在於在其整個長度範圍內，每100個核苷酸之參考序列均具有至多100-x的核苷酸變化。換言之，為獲得與參考序列具有至少x%一致性之序列的核酸，目標序列中之至多100-x%之核苷酸可用另一胺基酸或核苷酸插入、缺失目標序列中之至多100-x%之核苷酸或用另一胺基酸或核苷酸取代目標序列中之至多100x%之核苷酸。

【0015】與參考序列相比，與參考序列至少60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致之核酸序列可包含一或多個突變，諸如一或多個缺失、一或多個插入及/或一或多個取代。在取代之情況下，取代較佳對應於靜止取代或引起轉譯胺基酸序列中保守取代之取代。

【0016】比較兩個或更多個序列之一致性的方法在科學團體中已熟知。舉例而言，在Wisconsin Sequence Analysis Package，9.1版中可用之程式(例如程式BESTFIT及GAP)可用於測定兩個序列之間的一致性百分比。BESTFIT使用Smith及Waterman之「局部同源性」演算法且發現兩個序列之間的相似性之最佳單一區域。用於確定序列之間的一致性的其他程式在此項技術中亦已知，例如針刺(Needle)程式，其係基於Needleman及Wunsch演算法，描述於Needleman及Wunsch (1970) J. Mol Biol. 48:443-453，舉例而言具有以下用於聚核苷酸序列比較之參數：比較矩陣：DNAFULL；空隙開放罰分=10，空隙擴展罰分=0.5，末端空隙罰分：錯

誤，末端空隙開放罰分=10，末端空隙延長罰分=0.5。

【0017】術語「**基因改造**」意謂例如DNA、RNA、cDNA之遺傳物質或任何製程、機制中之任何可偵測變化，或此類變化之結果。此包括基因突變，其中基因之結構(例如DNA序列)改變；由任何突變製程產生之任何基因或DNA；及由改造基因或DNA序列表現之任何表現產物(例如蛋白質或酶)。一般而言，在個體中藉由比較由該個體表現之核酸或多肽之序列與對照群體中表現之對應核酸或多肽來識別突變。

【0018】術語「**降低或抑制編碼20 β -HSDH之基因之表現**」意謂降低或抑制信使RNA(mRNA)及/或由編碼20 β -HSDH之基因編碼之蛋白質的表現量。與未改造之細菌相比，編碼20 β -HSDH之基因之表現可降低至少75%、80%、85%、90%或95%。較佳地，編碼20 β -HSDH之基因之表現降低100%，因此對應於表現之抑制。

【0019】可藉由熟習此項技術者熟知之方法量測基因或核酸之表現量，尤其包括基於直接雜交之分析及基於擴增之分析。

【0020】與未改造之細菌相比，編碼20 β -HSDH之基因表現可藉由此基因之不活化或缺失而降低或抑制。在一特定實施例中，編碼20 β -HSDH之基因經突變，且較佳經截斷。

【0021】較佳地，基因改造之細菌不包含任何外源DNA。

【0022】使基因不活化、缺失或截斷之實驗室方法為此項技術中所熟知。

【0023】如本文中所計畫，當編碼20 β -HSDH之基因經突變及/或截斷時，其可能不編碼全功能之20 β -HSDH蛋白質，但編碼活性低於在相同條件下量測到之對應的天然20 β -HSDH蛋白質的20 β -HSDH蛋白質，尤其

所編碼之20 β -HSDH蛋白質可能無活性。

【0024】根據本發明之基因改造之細菌較佳具有 Δ 1-脫氫酶活性，但與未改造之細菌相比具有降低或缺乏20- β -脫氫酶活性。

【0025】因此，如本申請案中顯而易知，本發明係關於一種基因改造之細菌，其中：

- 對應的未改造之細菌具有 Δ 1-脫氫酶活性及20- β -脫氫酶活性，
- 至少一種基因改造誘發降低或抑制編碼20- β -羥基類固醇脫氫酶(20 β -HSDH)之基因表現，且
- 較佳地，該基因改造之細菌保持其 Δ 1-脫氫酶活性。

【0026】較佳地，根據本發明之基因改造之細菌具有 Δ 1-脫氫酶活性，但由於基因改造具有與未改造之細菌相比降低或缺乏20- β -脫氫酶活性。

【0027】本發明之第二態樣係關於一種用於產生根據本發明之基因改造之細菌的方法，其包含：

- a)提供具有 Δ 1-脫氫酶活性及20- β -脫氫酶活性之細菌；及
- b)使該編碼20 β -HSDH之基因不活化或缺失。

【0028】產生根據本發明之基因改造之細菌之方法的步驟b可由編碼20 β -HSDH之基因的突變、截斷或缺失組成。可藉由熟習此項技術者已知之任何方法達成突變或截斷，且較佳藉由編碼20 β -HSDH之基因之雙交換達成。

【0029】較佳地，所獲得之基因改造之細菌不包含任何外源DNA。

【0030】在另一態樣中，本發明係關於一種用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法，其包含：

a)提供未1,2-脫氫化之類固醇；

b)在足以獲得1,2-脫氫化類固醇之條件下使未1,2-脫氫化之該類固醇與根據本發明之細菌或其提取物接觸。

【0031】較佳地，根據本發明之用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法中所用的未1,2-脫氫化之類固醇為皮質類固醇。

【0032】在一個特定實施例中，該方法中所用之未1,2-脫氫化之類固醇為孕酮、甾固酮、雄烯二酮或此等分子之衍生物，其含有類固醇架構，該架構含有在位置1、2之間未脫氫化之六個碳原子之環A。

【0033】在一個特定實施例中，未1,2-脫氫化之類固醇為：

- 11 β 17,21-三羥基孕-4-烯-3,20-二酮(氫皮質酮(hydrocortisone))且該方法用於製備11 β ,17 α ,21-三羥基-1,4-孕二烯-3,20-二酮(潑尼松龍(prednisolone))；或

- 17 α ,21-二羥基-4-孕烯-3,11,20-三酮(皮質酮(cortisone))且該方法用於產生17 α ,21-二羥基-1,4孕二烯-3,11,20-三酮(潑尼松(prednisone))；或

- 孕-4-烯-3,20-二酮且該方法用於產生孕-1,4-二烯-3,20-二酮；或

- 11 β ,17,21-三羥基-6 α -1,4-孕烯-3,20-二酮(6-甲基氫皮質酮)，用於產生11 β ,17 α ,21-三羥基-6 α -甲基-1,4-孕二烯-3,20-二酮(6-甲基潑尼松龍)；或

- 9,11-脫氫脫氧皮質醇(dehydrocortexolone)且該方法用於產生1,2-9,11-脫氫脫氧皮質醇；或

- 9,11脫氫脫氧皮質醇-17,21-二乙酸且該方法用於產生1,2-9,11脫氫脫氧皮質醇；或

- 9,11-16,17-脫氫脫氧皮質醇-21-乙酸且該方法用於產生1,2-9,11-

16,17-脫氫脫氧皮質醇-21-乙酸；或

- 16- α -甲基氫皮質酮且該方法用於產生16- α -甲基潑尼松龍。

【0034】在一個實施例中，使用根據本發明之細菌之提取物進行用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法的步驟b)。該提取物較佳具有 Δ 1-脫氫酶活性，且較佳具有降低或缺乏20- β -脫氫酶活性。特定言之，此類提取物可藉由根據本發明之細菌之細胞溶解，及視情況分級分離該細胞溶解產物以濃縮 Δ 1-脫氫酶活性或促進 Δ 1-脫氫酶活性之純化來獲得。

【0035】用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法可進一步包含回收及純化該1,2-脫氫化類固醇。

【0036】較佳地，用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法不包含消除20- β -脫氫化類固醇之步驟。實際上，若編碼20- β -HSDH之基因之表現顯著降低，則此步驟可為不必要。

【0037】此外，用於產生1,2-脫氫化類固醇之方法可包含將1,2-脫氫化類固醇調配成醫藥組合物。

【0038】在另一態樣中，本發明係關於根據本發明之細菌或其提取物的用途，其用於自未1,2-脫氫化之類固醇產生1,2-脫氫化類固醇。

【0039】該提取物較佳具有 Δ 1-脫氫酶活性，且較佳具有降低或缺乏20- β -脫氫酶活性。特別地，此提取物可藉由根據本發明之細菌之細胞溶解，及視情況在分級分離該細胞溶解產物，以濃縮 Δ 1-脫氫酶活性或促進 Δ 1-脫氫酶活性純化之後獲得。

【0040】較佳地，未1,2-脫氫化之類固醇為皮質類固醇。

【0041】在一個特定實施例中，未1,2-脫氫化之類固醇為孕酮、甾固酮、雄烯二酮或此等分子之衍生物，其含有類固醇架構，該架構含有六

個碳原子之環A在位置1、2之間未脫氫化。

【0042】在一個特定實施例中，未1,2-脫氫化之類固醇為：

- 11 β 17,21-三羥基孕-4-烯-3,20-二酮(氫皮質酮)且產生11 β ,17 α ,21-三羥基-1,4-孕二烯-3,20-二酮(潑尼松龍)；或
- 17 α ,21-二羥基-4-孕烯-3,11,20-三酮(皮質酮)且產生17 α ,21-二羥基-1,4孕二烯-3,11,20-三酮(潑尼松)；或
- 孕-4-烯-3,20-二酮且產生孕-1,4-二烯-3,20-二酮；或
- 11 β ,17,21-三羥基-6 α -1,4-孕烯-3,20-二酮(6-甲基-氫皮質酮)且產生11 β ,17 α ,21-三羥基-6 α -甲基-1,4-孕二烯-3,20-二酮(6-甲基潑尼松龍)；或
- 9,11-脫氫脫氧皮質醇且產生1,2-9,11-脫氫脫氧皮質醇；或
- 9,11脫氫脫氧皮質醇-17,21-二乙酸且產生1,2-9,11脫氫脫氧皮質醇；或
- 9,11-16,17-脫氫脫氧皮質醇-21-乙酸且產生1,2-9,11-16,17-脫氫脫氧皮質醇-21-乙酸；或
- 16- α -甲基氫皮質酮且產生16- α -甲基潑尼松龍。

【0043】如本文所用，術語「**醫藥組合物**」係指1,2-脫氫化類固醇與諸如生理學上適合之載劑及賦形劑之其他化學組分的製劑。醫藥組合物的目的為促進向生物體投與該1,2-脫氫化類固醇。

【0044】本發明之醫藥組合物可藉由此項技術中熟知之製程製造，例如藉助於習知混合、溶解、粒化、研磨、磨粉、糖衣藥丸製造、粉碎、乳化、囊封、包覆或凍乾製程。

【0045】通常，醫藥組合物可包含本發明之1,2-脫氫化類固醇及醫藥學上可接受之媒劑。

【0046】本發明將藉由以下圖及實例進一步說明。

【0047】

序列表：

SEQ ID NO:1對應於簡單類諾卡氏菌之NOSIM5169之序列。

SEQ ID NO: 2對應於簡單類諾卡氏菌之NOSIM3735之序列。

SEQ ID NO:3對應於鳥分支桿菌副結核亞種MAP4之20 β -HSDH之基因的序列。

【0048】

實例：

分析簡單類諾卡氏菌之基因組，發現兩種用於20 β -HSDH之可能基因，稱為NOSIM5169(對應於序列SEQ ID NO:1)及NOSIM3735(對應於序列SEQ ID NO:2)。其皆與造成鳥分枝桿菌副結核亞種MAP4之20 β -HSDH的基因序列(對應於序列SEQ ID NO:3)具有共通相似性。

【0049】

1. 質體構築(NOSIM5169)

用於使NOSIM5169不活化之質體構築法如下：藉由PCR擴增2.0及1.7 kbp大小之同源肩部。用於擴增一個肩部之引子含有XbaI及EcoRV限制位點且第二同源肩部之引子經設計以含有EcoRV及EcoRI限制位點。

【0050】隨後將肩部選殖於第一質體中。

【0051】為獲得新的第二質體，將潮黴素抗性之基因鈍端選殖於EcoRV限制位點中。

【0052】將無潮黴素抗性基因之質體命名為「第二質體-hyg」。

【0053】

2. 用於簡單類諾卡氏菌之電穿孔法

該方法係基於針對節桿菌所描述之程序(Zhang等人, 2011)。用於製備電穿孔勝任細胞之最佳化程序如下：將簡單類諾卡氏菌之細胞接種於20 ml LB+Ph中(LB表示溶源性培養液，且Ph表示磷黴素(Phosphomycin))且培養直至獲得固定相。接著將來自預培養物之1%接種物接種於新鮮LB培養基中且培養直至光學密度在600 nm下接近0.4-0.5。接著分別添加安比西林(Ap)及甘胺酸至30 µg/l及5 g/l之最終濃度，且繼續培養。在3 h之後，將培養物置放於冰上且藉由離心(4500 rpm，6 min，4°C)採集。在冰冷電穿孔緩衝液(0.5 M山梨糖醇、10%甘油)中洗滌三次之後，藉由離心將細胞濃縮100倍。最後，將懸浮液分佈於60 µl等分試樣中且儲存於冰上(此方案用於生成簡單類諾卡氏菌NOSIM5169-hyg)。

【0054】可替代地，可應用白色鏈黴菌ATCC 21838之方案(Izumikawa等人, 2003)。在此情況下，用於製備電穿孔勝任細胞之程序經改造以適合簡單類諾卡氏菌生理學：將來自簡單類諾卡氏菌之生長停滯期預培養物之1%接種物接種於新鮮LB+Ph培養基中且培養。當光學密度在600 nm下接近0.4-0.5時，藉由離心(4500 rpm，6 min，4°C)收集培養物，且用無菌冰冷的水洗滌三次。接著將菌絲體懸浮於25 ml冷電穿孔緩衝液(10%蔗糖、15%甘油)中且補充有溶菌酶(0.5 mg/ml)。在37°C下培育20分鐘之後，藉由離心收集細胞且在電穿孔緩衝液中濃縮100倍。最後，將懸浮液分佈於60 µl等分試樣中且儲存於冰上。

【0055】在兩種情況下，最佳化電穿孔程序如下：將電穿孔勝任細胞與500 ng DNA(由大腸桿菌GB2005製備)混合且將混合物轉移至預冷卻之電穿孔比色管(0.1 cm電極)中。使用Eppendorf脈衝發生器以2.1 kV/cm

對混合物進行單一脈衝。緊接著電脈衝之後，將細胞懸浮液轉移至含有 800 μ l 室溫回收培養基(SOC)之Eppendorf導管中且在 850 rpm 下在震盪下在 30°C 下培育 12 小時。為了選擇經轉化之細胞，將細菌之連續稀釋液鋪展於含有安普黴素(Am)之LB瓊脂培養盤上。對於各組實驗，藉由省略添加質體DNA來進行陰性對照。

【0056】

3. 單一交換突變體(NOSIM5169)

在電穿孔菌株簡單類諾卡氏菌而具有第二質體之後，獲得單一交換轉化子，且將其在LB+Am+X-Gluc瓊脂培養盤(參見示意性圖示之圖1)(X-Gluc代表單醯肼，X-GlcA)上修補。在安普黴素上生長且進行 β -葡萄糖醛酸苷酶(GUS)(例如Myronovskyi等人, 2011)反應的能力確認出，轉化子為單一交換突變體。在此之後，將突變體接種於 100 ml LB+Ph培養基中且在 28°C，200 rpm 下培育 48 h。

【0057】

4. 雙交換突變體(NOSIM5169)

接著將 1 ml 培養物轉移至新鮮LB+Ph培養基中且在相同條件下再培育 48 h。將此步驟重複若干次。在最後一次培育之後，在LB+X-Gluc瓊脂培養盤上製作突變體之連續稀釋液。

【0058】將不展現GUS-活性之突變體轉移至新的LB+X-Gluc上並再次檢驗。GUS-活性不存在意謂在該等突變體中發生雙交換且其已失去質體主鏈。

【0059】使通過第二測試之突變體在LB中生長，分離其gDNA，且接著藉由PCR使用與簡單類諾卡氏菌之染色體DNA同源之引子分析。

【0060】

5. 無外來DNA之雙交換突變體(NOSIM5169)

代替第二質體，使用「第二質體-hyg」來進行轉化。抗生素抗性基因(潮黴素抗性)之存在可促進雙交換突變體之進一步識別。然而，此抗性基因在簡單類諾卡氏菌之基因組中不具有活性。

【0061】因此，在雙交換之後，所獲得之突變體假定不含任何外源DNA且將可用於其他工業應用(圖1)。

【0062】在將「第二質體-hyg」引入至簡單類諾卡氏菌中之後，得到安普黴素抗性群落。

【0063】此突變體在LB+Ph培養基中經過六次傳代培養，且接著在LB+X-Gluc上製作培養物之連續稀釋液。

【0064】暴露所獲得之不能在安普黴素上生長且無GUS-活性的群落以藉由PCR進一步分析。藉由使用與簡單類諾卡氏菌鄰近於NOSIM5169之gDNA區域同源之兩個引子進行擴增。

【0065】

6. NOSIM3735之不活化

為構建具有不活化NOSIM3735之菌株，先前所述之方法不可應用，因為NOSIM3735上游之DNA區域不可達到藉由PCR擴增。為克服此挑戰，對含有簡單類諾卡氏菌基因組之片段的黏質體庫定序及測序。

【0066】為使NOSIM3735不活化，自含有該基因之黏質體庫識別適當黏質體(藉由GATC Biotech, Konstanz桑格測序(Sanger sequencing)大約1500個黏質體)，且在大腸桿菌中使用 λ 介導之重組將該基因置換為氯黴素(Cm)抗性基因cat (例如Murphy, 1998)。接著藉由BamHI核酸內切酶消

化經改造之黏質體。以此方式，獲得片段混合物且其中一個含有cat-基因替代NOSIM3735之片段側接兩個3-kb肩部用於與簡單類諾卡氏菌基因組同源重組。藉由瓊脂糖凝膠電泳分離片段，且純化7-8kb-溶離份且接合至BamHI-線性化質體中。為選擇含有具有cat-基因之構築體的突變體，使用LB+Am+Cm作為生長培養基。藉由PCR及定序分析所獲得突變體。所得質體中之一者進一步用於NOSIM3735之不活化。

【0067】根據先前適用於使NOSIM5169不活化之方案進行不活化(參見第2點及之後)。

【0068】此突變體在LB+Ph培養基中經過數次傳代培養，且接著在LB+X-Gluc上製作培養物之連續稀釋液。

【0069】暴露所獲得之不能在安普黴素上生長且無GUS-活性的群落以藉由PCR進行進一步分析。藉由使用兩個與簡單類諾卡氏菌之鄰近於NOSIM3735之gDNA區域同源之引子進行擴增。

【0070】

7. 在氫皮質酮上使用NOSIM3735及NOSIM5169

純系用於經典製程中自氫皮質酮產生潑尼松龍。

【0071】簡言之，在四氫呋喃中將氫皮質酮與甲萘醌溶液混合。接著將此懸浮液在調節至pH 8.0之磷酸鹽緩衝液中混合。接著添加細菌懸浮液。在攪拌下在30°C下培育之後，藉由添加磷酸停止反應。量測潑尼松龍之增加且藉由HPLC分析。

【0072】藉由Waters-Xbridge RP18-管柱，使用水/乙腈梯度作為移動相獲得HPLC-層析圖(層析圖展示於圖2-圖3中)。

【0073】可替代地，實現產生20-OH-副產物之活性分析。使潑尼松

龍在pH 8.0下懸浮於磷酸鹽緩衝液中且與細菌懸浮液一起培育。在60分鐘之後，藉由添加磷酸停止反應。接著藉由HPLC量測20-OH酮還原產物之電位增加。

【0074】NOSIM5169之截斷准許完全抑制20 β -HSDH活性，且因此獲得無20-OH雜質之潑尼松龍(圖3)。

【0075】基因剔除NOSIM3735基因，但菌株展示與野生型株相同之反應，不能藉由基因剔除此基因而關閉非所需副反應。

【0076】

參考文獻列表：

Izumikawa, M.; Murata, M.; Tachibana, K.; Ebizuka, Y. and Fujii, I. (2003): Cloning of Modular Type I Polyketide Synthase Genes from Salinomycin Producing Strain of *Streptomyces albus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 3401 – 3405。

Murphy, K.C. (1998): Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. J. Bacteriol. 180: 2063-2071。

Myronovskyi, M.; Welle, E.; Fedorenko, V. and Luzhetskyy, A. (2011): Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Reporter in Actinomycetes. Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2011, 5370 – 5383。

Zhang, H.; Li, Y.; Chen, X.; Sheng, H. and An, L. (2011): Optimization of electroporation conditions for Arthrobacter with plasmid PART2, Journal of Microbiological Methods, 84: 114-120。

【序列表】

<110> 法商賽諾菲公司(SANOFI)

<120> 微生物之生物技術最佳化

<130> BET17P1750

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 748

<212> DNA

<213> 簡單類諾卡氏菌

<400> 1

ggtcgtcttc gtcaccggag gcgcccgcgg gctggggccc gcccttcgcc gcggcatcgt	60
cgccgccggc ggccgggtcg tcctcggcga cctgctggac gacgagggcg ccgccgtcgc	120
cgacgagctc ggccgccggc cccgctacgt ccacctcgac gtcaccagcg aggagtcctg	180
ggaggccgcc gtcgccgca gcgtcgacgc ctccggccgg ctcgacgggc tggtaacaa	240
cgccggcatc tcggccaccg gccagctgac cgccgacgag ccgaccgacg tcttcgccg	300
gatcatcgag atcaacctga tcgccgtcca caccgggctg cgcccgctcg tcccccgat	360
gcggacggcg ggccggcggt cgatcgtcaa catctcgtcg gccgcgggcc tgatgggcat	420
ggcgatgacc agcggctacg gcgccgcca gtggggcgtg cgcgggctca gcaagatcgc	480
ggcggtcgag ctccgtcgcg accggatccg ggtcaactcg gtgcaccccg gcatggtcct	540
gacgccgatg accgccccga ccgggatcgt cgccgacgag ggcgcccttc cgaacaacc	600
gtaccagcgg gtcggccggc ccgaggagct cgtgggtgcg gtcgtccacc tgctgagcga	660
cgccgcgtcg tacacgaccg gcgccgagct cgccgtcgac ggcggtgga ccgccgtcc	720
gtcgggtggag tacatcgag gtcggtga	748

<210> 2

<211> 825

<212> DNA

<213> 簡單類諾卡氏菌

<400>	2	
gtgccgctgg ccggcaccct gcccgcgcgc ccgcgcggac ggcgcttcat tggggccatg	60	
accagatcc agggcccgac gaacccgtcc accactcccc gccgcgtcgc cgaccgcgtc	120	
gtcatcgtga cgggaggagc ccgcggcadc ggccgcgcct gcgtgcgcgc actcgtcgcc	180	
gagggcgccc ggggtggtggt cgccgacgtc ctcgaggccg aggcgagcgc cctcgtcgcc	240	
gcgctggggg agcggacggc gtacgtcccc ctcgacgtga cgagcgagga ggcgtggcag	300	
cacgcggtcg cggcggccga ggagcgcttc gggccggtct cgggactcgt caacaacgcc	360	
ggcatcgtgc acatcgaccc gatcgagacc ctgagcagg ccgactaccg gcgggtgac	420	
gacgtcaacc aggtcggcgt ctctctcggc atgaaggcgg tcacgggtc gatgcggcgc	480	
gcggggggcg gctcgatcgt caacatctcc tcgaccggcg ggctggtcgc ctactcccg	540	
atcctcgggt acgtcgctc gaagtgggcc gtgcgcggca tgaccaagac cgccgcgag	600	
gagctcgcc ccgacggcat ccgggtcaac tcggtgcacc ccggcatcgt cgcctccgc	660	
atgaccgca gctccgaccg ctcccacgag caggtcagga ccagccgct ggccggggcg	720	
gcggaccgt ccgagatcg cgcgctcgtg ctcttctga tctcggagga gtccagctac	780	
agcaccggt cggagttcgt cgccgacggg ggcttacct cgctc	825	

- <210> 3
- <211> 741
- <212> DNA
- <213> 鳥分支桿菌

<400>	3	
gtgggacggg tagacggcaa ggttgcgctg atcagcgggg gcgcccgcgg catgggcgcc	60	
gagcacgcgc ggctgctggc ggccgagggc gccaaaggtag tgatcggcga catcctcgac	120	
gacgaggga aggccgtggc cgacgagatc ggcgactcgg tgcgtacgt ccacctggac	180	
gtcaccagc ccgaccagtg ggacgccgc gtcgaaaccg ccgtcggcga attcggcaag	240	
ctcaacgtgt tggtaacaa cgccggcacc gtgcgcctcg ggccgtgaa gagcttcgat	300	
ctggccaagt ggcagaagg gattgacgtc aacctgaccg gcaccttctt gggcatgcgg	360	
gtggccgtcg agccgatgat cgcgccgggc ggcggtcga tcatcaacat ctctccatc	420	

gaggggctgc gcggtgcgcc catggtgcac ccctacgtcg cctccaagtg gggcgtgcgc	480
ggcctggcga agtccgcggc gctggagctg gcgccgcaca acatccgggt caactccgtg	540
caccccggtt tcatccgcac cccgatgacc aaacacctgc ccgacgacat ggtgaccgtc	600
ccgctcggcc gtccggccga gtcccgcgag gtgtcgacgt tcgtcttggt cctggccagc	660
gacgagtcgt cgtacgcgac cggcagcgaa ttcgtgatgg acggcggact ggtcaccgac	720
gtgccgcaca agcagttcta g	741

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種基因改造之細菌，其中與對應未改造之細菌相比，降低或抑制編碼20- β -羥基類固醇脫氫酶(20 β -HSDH)之基因的表現，其中該對應未改造之細菌具有 $\Delta 1$ -脫氫酶活性及20- β -脫氫酶活性。

【請求項2】

如請求項1之基因改造之細菌，其中該編碼20 β -HSDH之基因不活化或缺失。

【請求項3】

如請求項1或2之基因改造之細菌，其中該編碼20 β -HSDH之基因經突變。

【請求項4】

如請求項1或2之基因改造之細菌，其中該編碼20 β -HSDH之基因經截斷。

【請求項5】

如請求項1或2之基因改造之細菌，其中該細菌來自類諾卡氏菌科(*Nocardioideae*)。

【請求項6】

如請求項1或2之基因改造之細菌，其中該基因改造之細菌具有 $\Delta 1$ -脫氫酶活性，但與該未改造之細菌相比具有降低或缺乏20- β -脫氫酶活性。

【請求項7】

一種產生如請求項1至6中任一項之基因改造之細菌的方法，其包含：

- a)提供具有 $\Delta 1$ -脫氫酶活性及 $20\text{-}\beta$ -脫氫酶活性之細菌；及
- b)使該編碼 20β -HSDH之基因不活化或缺失。

【請求項8】

一種產生1,2-脫氫化類固醇之方法，其包含：

- a)提供未1,2-脫氫化之類固醇；
- b)使該未1,2-脫氫化之類固醇與如請求項1至6中任一項之細菌或其提取物在足以獲得1,2-脫氫化類固醇之條件下接觸。

【請求項9】

如請求項8之方法，其中該未1,2-脫氫化之類固醇為皮質類固醇。

【請求項10】

如請求項8或9之方法，其中該未1,2-脫氫化之類固醇為氫皮質酮，且該方法為用於生產潑尼松龍(prednisolone)。

【請求項11】

如請求項8或9之方法，其中該方法進一步包含回收及純化該1,2-脫氫化類固醇。

【請求項12】

如請求項10之方法，其中該方法進一步包含回收及純化該1,2-脫氫化類固醇。

【請求項13】

如請求項11之方法，其不包含消除 20β -脫氫化類固醇之步驟。

【請求項14】

如請求項12之方法，其不包含消除 20β -脫氫化類固醇之步驟。

【請求項15】

如請求項8或9之方法，其進一步包含將該1,2-脫氫化類固醇調配成醫藥組合物。

【請求項16】

如請求項8之方法，其中該提取物具有 $\Delta 1$ -脫氫酶活性。

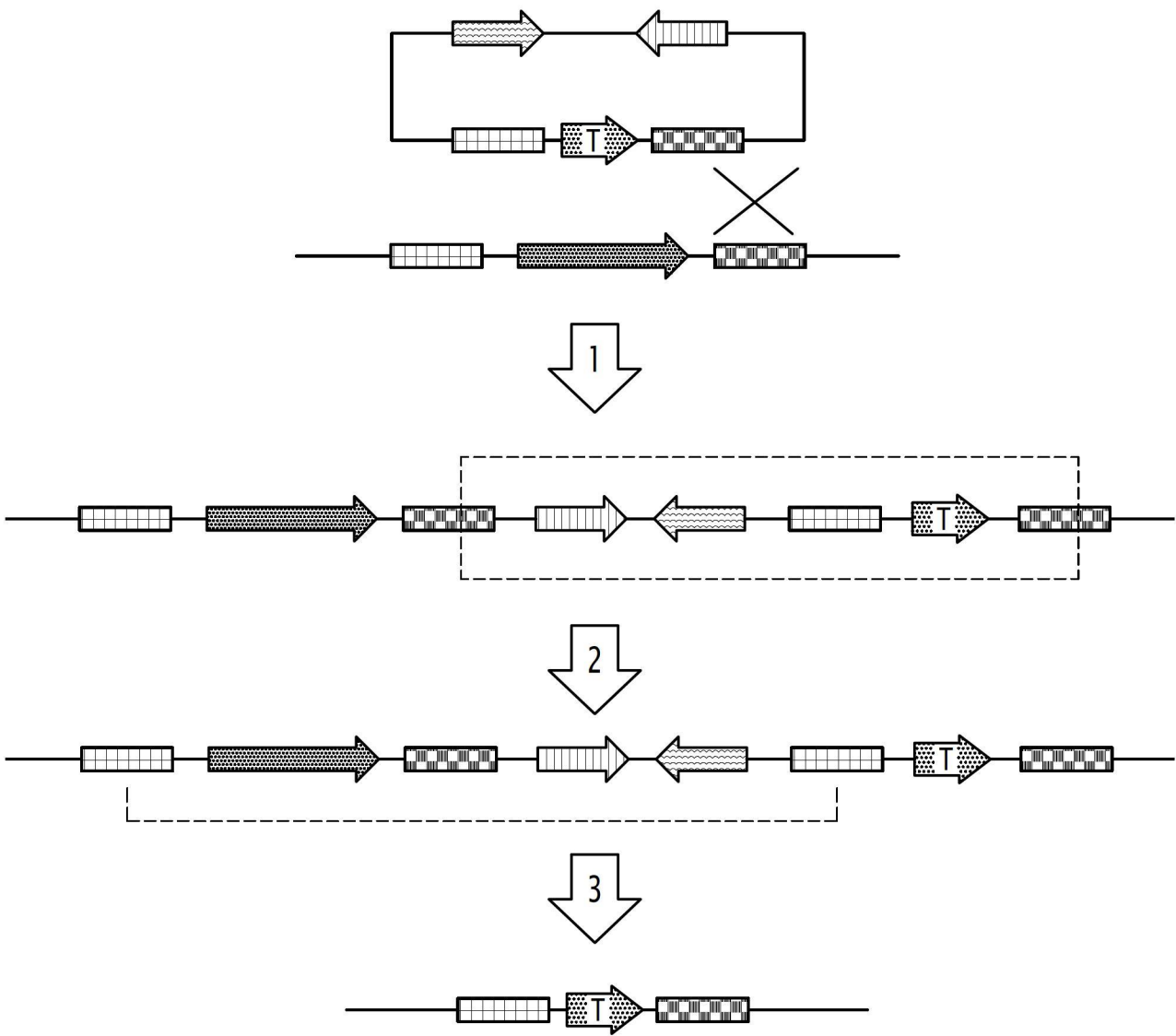
【請求項17】

如請求項8之方法，其中該提取物係藉由如請求項1至6中任一項之細菌之細胞溶解。

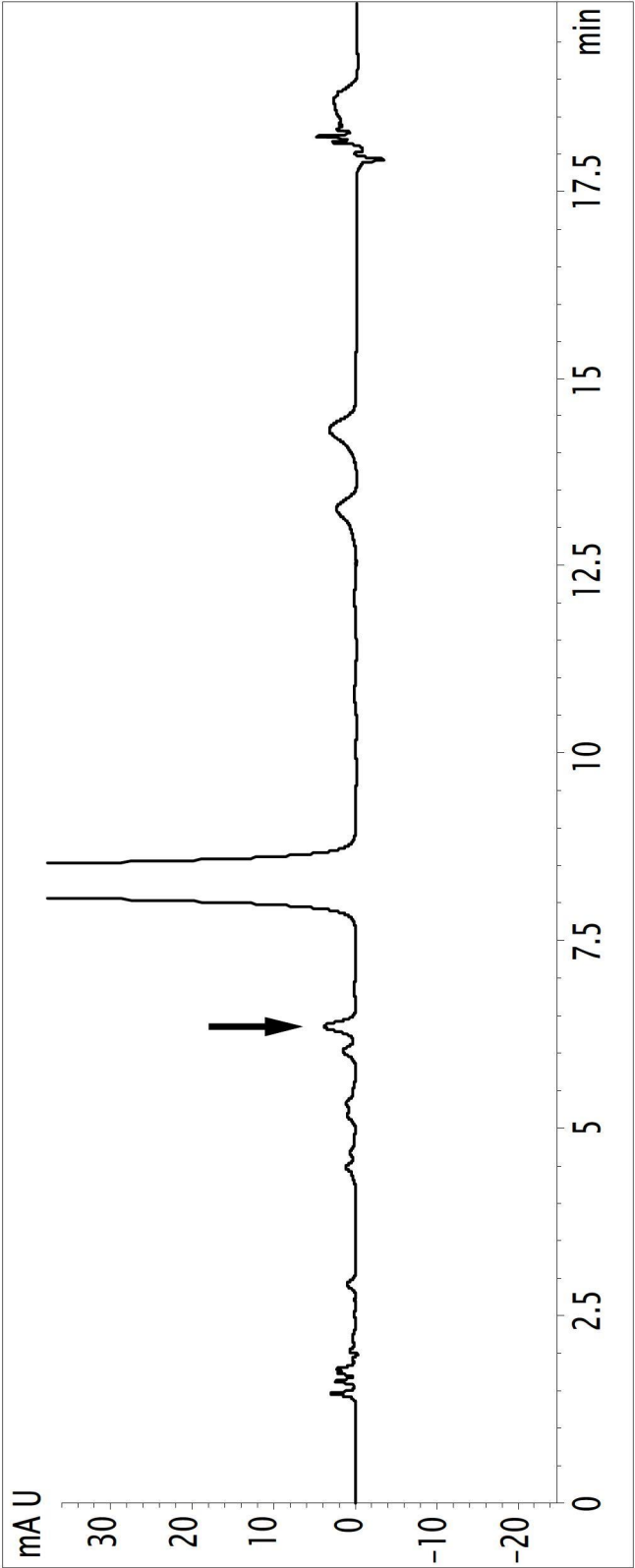
【請求項18】

如請求項17之方法，其中該提取物係藉由分級分離(fractionation)該細胞溶解產物以濃縮 $\Delta 1$ -脫氫酶活性或促進 $\Delta 1$ -脫氫酶活性之純化來獲得。

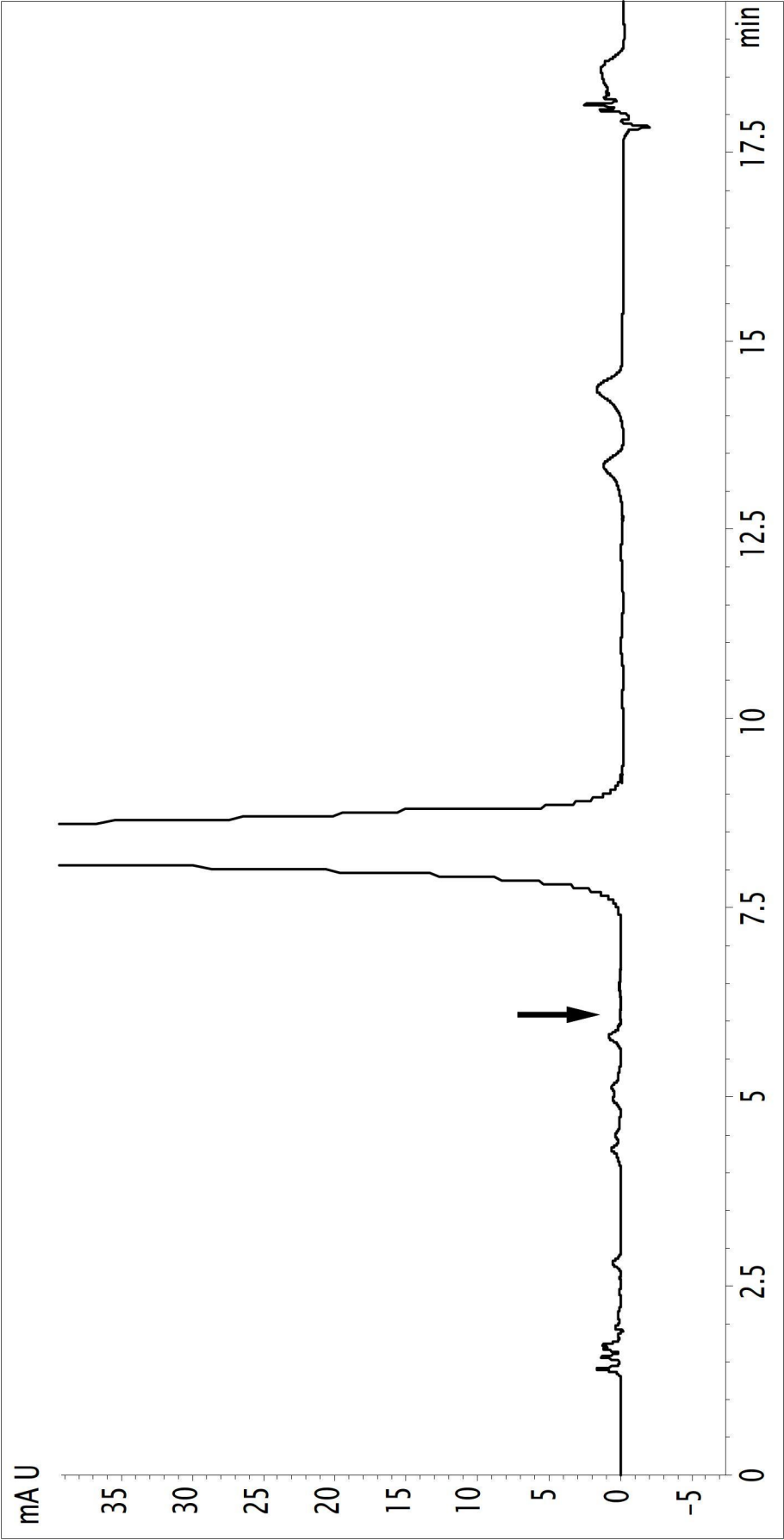
【發明圖式】



【圖1】



【圖2】



【圖3】