



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104093848 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201280054408.6

(22) 申请日 2012.09.07

(30) 优先权数据

61/533,039 2011.09.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/054195 2012. 09. 07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/036787 EN 2013.03.14

(71) 申请人 绿光生物科学公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 威廉·杰瑞米·布雷克

丹尼尔·克莱恩-马库斯查梅尔

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司 11287

代理人 江葳

(51) Int. Cl.

C12P 17/18 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

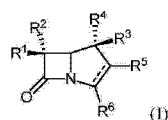
权利要求书10页 说明书77页 附图27页

(54) 发明名称

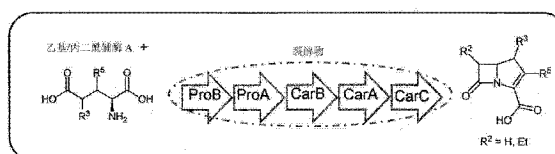
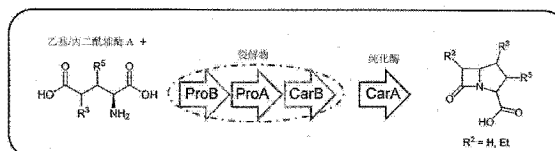
碳青霉烯 (CARBAPENEM) 的无细胞制备

(57) 摘要

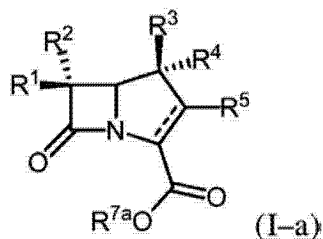
本文提供用于生成碳青霉烯、例如式 (I) 化合物或其盐的无细胞系统；其中 (II)、R¹、R²、R³、R⁴、R⁵和 R⁶如本文所定义。还提供包含通过本发明无细胞系统生成的化合物的医药组合物，以及这些化合物和组合物用于治疗细菌感染的用途。



II



1. 一种细胞裂解物,其包含一组能生成式 (I-a) 化合物,

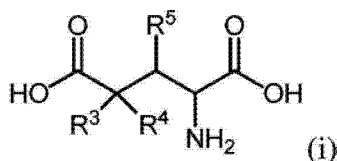


或其盐或互变异构体或其组合的酶;

其是从以下物质生成:

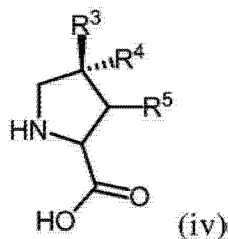
葡萄糖和甘氨酸或其盐;和/或

葡萄糖和式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸:



或其盐;和/或

葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物:



或其盐;

其中:

虚线----代表单键或双键;

R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组:氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基;

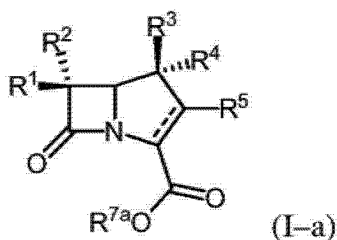
R^5 选自由以下组成的群组:氢、 $-OR^8$ 、 $-SR^8$ 和 $-N(R^8)_2$;

R^8 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组:氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基、 $-C(=O)R^{8a}$ 、 $-C(=O)OR^{8a}$ 、 $-C(=O)SR^{8a}$ 、 $-C(=O)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=NR^{8b})R^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})OR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})SR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=S)R^{8a}$ 、 $-C(=S)OR^{8a}$ 、 $-C(=S)SR^{8a}$ 、 $-C(=S)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=O)NR^{8b}SO_2R^{8a}$ 、 $-S(=O)R^{8a}$ 、 $-SO_2R^{8a}$ 、 $-SO_2N(R^{8a})_2$ 、 $-Si(R^{8a})_3$ 、 $-P(=O)(R^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(OR^{8a})$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(N(R^{8b})_2)$ 、 $-P(=O)(N(R^{8b})_2)_2$ 、 $-P(=O)_2R^{8a}$ 、 $-P(=O)_2OR^{8a}$ 、 $-P(=O)_2N(R^{8b})_2$ 、 $-B(R^{8a})_2$ 、 $-B(OR^{8a})_2$ 和 $-BR^{8a}(OR^{8a})$, 其中如果氧保护基团附接到氧原子,且如果硫保护基团附接到硫原子,那么 R^{8a} 选自由以下组成的群组:任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经

取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基,或两个 R^{8a} 基团或 R^{8a} 与 R^{8b} 基团接合形成任选地经取代的杂环;且 R^{8b} 在每一情况中独立地选自以下组成的群组:氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团,或两个 R^{8b} 接合形成任选地经取代的杂环;且

R^{7a} 为氢。

2. 一种生成式 (I-a) 化合物,



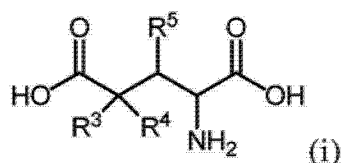
或其盐或互变异构体或其组合的方法;

所述方法包含:

提供包含一种或一种以上酶的根据权利要求 1 所述的细胞裂解物,其中所述一种或一种以上酶选自以下组成的群组: γ -谷氨酰基激酶、Glu-5-P 脱氢酶、糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶、羧甲基-Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶和甲基转移酶和其同工酶;

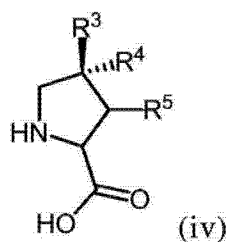
其中使所述一种或一种以上细胞裂解物与以下物质接触:

- (1) 葡萄糖和甘氨酸或其盐;和/或
- (2) 葡萄糖和式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸:



或其盐,和/或

- (3) 葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物:



或其盐;

其中:

虚线 --- 代表单键或双键；

R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 在每一情况中选自由以下组成的群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基；且

R^5 选自由以下组成的群组：氢、 $-\text{OR}^8$ 、 $-\text{SR}^8$ 和 $-\text{N}(\text{R}^8)_2$ ；

R^8 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{8b})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{8b})\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{8b})\text{OR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{8b})\text{SR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{8b})\text{N}(\text{R}^{8b})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{OR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{8a}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{8b})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{8b}\text{SO}_2\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{8a})_2$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{8a})_3$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{8a})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{8a})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{8a})(\text{OR}^{8a})$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{8a})(\text{N}(\text{R}^{8b})_2)$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{N}(\text{R}^{8b})_2)_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{8a}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{OR}^{8a}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{8b})_2$ 、 $-\text{B}(\text{R}^{8a})_2$ 、 $-\text{B}(\text{OR}^{8a})_2$ 和 $-\text{BR}^{8a}(\text{OR}^{8a})$ ，其中如果氧保护基团附接到氧原子，且如果硫保护基团附接到硫原子，那么 R^{8a} 选自由以下组成的群组：任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基，或两个 R^{8a} 基团或 R^{8a} 与 R^{8b} 基团接合形成任选地经取代的杂环；且 R^{8b} 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团，或两个 R^{8b} 接合形成任选地经取代的杂环；且

R^{7a} 为氢。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中 R^1 为氢。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中 R^3 为氢或 $-\text{CH}_3$ 。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中 R^2 为氢、 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。

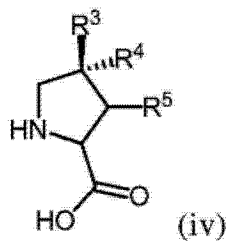
6. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中 R^4 为氢。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中一种或一种以上选自由以下组成的群组的酶在裂解前存在于细胞质中： γ -谷氨酰基激酶、Glu-5-P 脱氢酶、糖酵解 / 乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶和其同工酶。

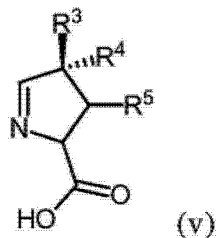
8. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中一种或一种以上选自由以下组成的群组的酶在裂解前被隔离在所述细胞的壁膜间隙中：羧甲基-Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶和甲基转移酶和其同工酶。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中所述细胞裂解物是经改造以过表达所述酶群组的大肠杆菌生物体的裂解物。

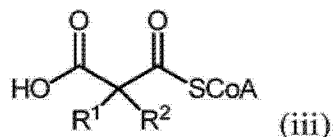
10. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中所述式 (iv) 脯氨酸化合物：



或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为下式的吡咯化合物：

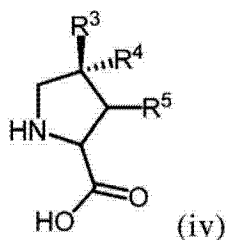


或其盐；且其中葡萄糖或其盐被酶促转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物：

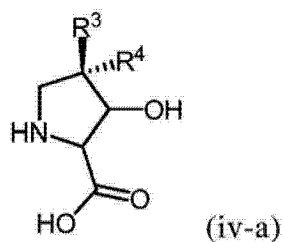


或其盐；其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

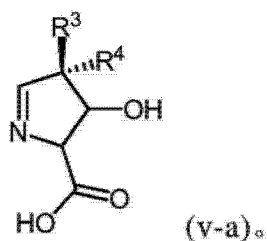
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法，其中所述式 (iv) 脯氨酸化合物：



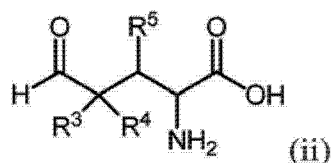
或其盐，其中 R⁵ 为氢，在与脯氨酸-3-羟化酶接触后被酶促转化为下式的 3-羟化脯氨酸化合物：



或其盐；且所述式 (iv-a) 的 3-羟化脯氨酸化合物或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为下式的 3-羟化吡咯化合物：

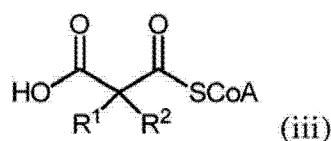


12. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法, 其中所述葡萄糖和甘氨酸或其盐在与一种或一种以上选自自由糖醇解 / 乙酰基 -CoA 生物合成多酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 γ -谷氨酰基激酶和 Glu-5-P 脱氢酶和其同工酶组成的群组的酶接触后被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛:



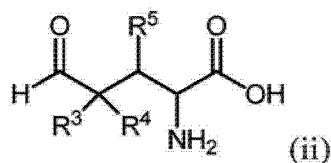
或其盐;且

其中葡萄糖或其盐被酶促转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物:



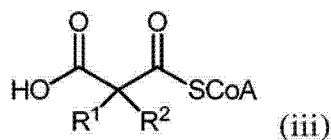
或其盐;其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

13. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法, 其中所述式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸或其盐在与 γ -谷氨酰基激酶和 Glu-5-P 脱氢酶接触后被转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛化合物:



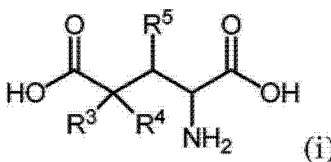
或其盐;且

其中葡萄糖或其盐被酶促转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物:

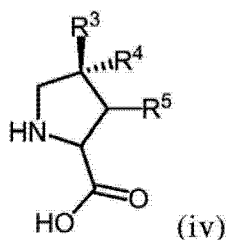


或其盐;其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

14. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法, 其中所述式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸:

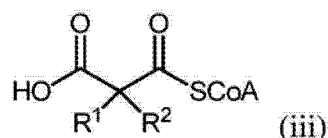
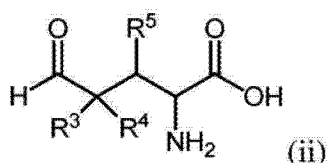


或其盐在与 γ -谷氨酰基激酶 -GP- 还原酶多酶复合体接触后被酶促转化为式 (iv) 脯氨酸化合物:



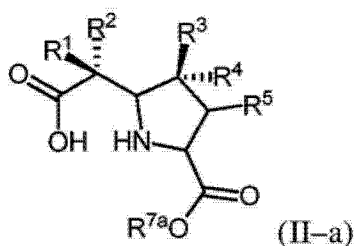
或其盐。

15. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法, 其中所述细胞将葡萄糖与甘氨酸或其盐的所述组合、或葡萄糖与式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸或其盐的所述组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛或其盐:



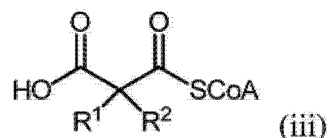
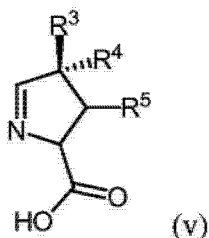
其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团 ; 且

其中所述式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛或其盐和所述式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐在与羧甲基-Pro 合酶或其同工酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物:



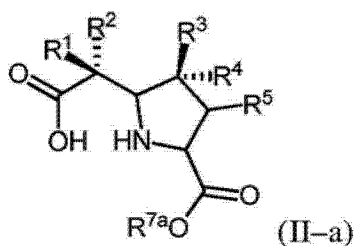
或其盐。

16. 根据权利要求 1 或 2 所述的裂解物或方法, 其中所述细胞将葡萄糖或其盐和所述式 (iv) 脯氨酸化合物或其盐的所述组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (v) 吡咯化合物或其盐:



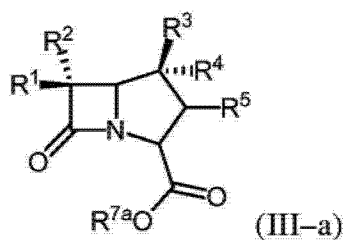
其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团 ; 且

其中式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (v) 吡咯化合物或其盐在与羧甲基-Pro 合酶或其同工酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物:



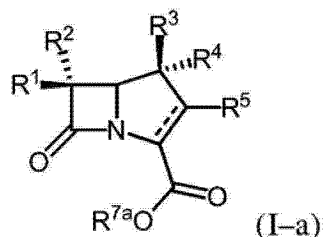
或其盐。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的裂解物或方法, 其中所述吡咯烷基化合物 (II-a) 或其盐在与碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶或其同工酶接触后生成式 (III-a) 的 β -内酰胺化合物:



或其盐。

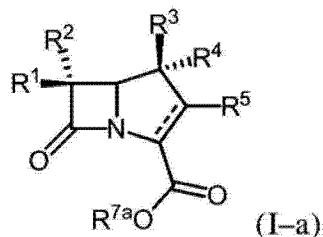
18. 根据权利要求 17 所述的裂解物或方法, 其中所述式 (III-a) 的 β -内酰胺化合物或其盐在与碳青霉烯合酶或其同工酶接触后生成式 (I-a) 化合物:



或其盐, 其中 $\equiv$ 代表双键。

19. 根据权利要求 18 所述的裂解物或方法, 其中 R^5 为氢。

20. 根据权利要求 19 所述的裂解物或方法, 其进一步包含使所述式 (I-a) 化合物:



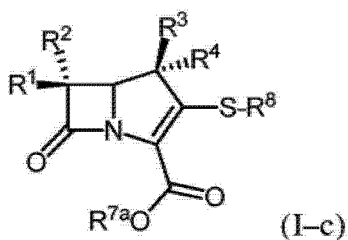
或其盐, 其中 $\equiv$ 代表双键;

与转移酶和下式的化合物接触:

HSR^8

其中 R^8 选自由以下组成的群组: 任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基;

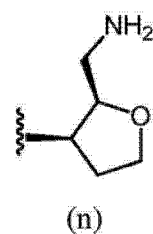
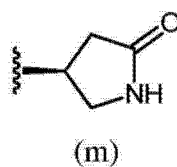
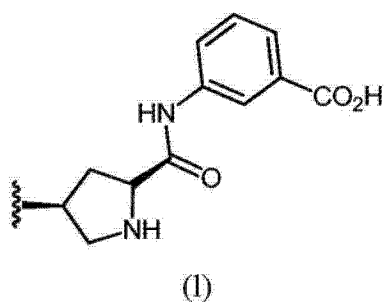
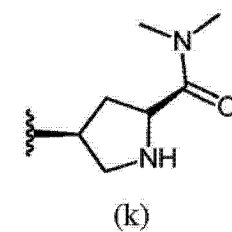
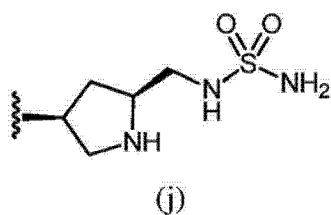
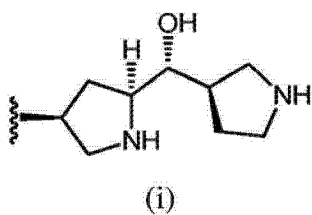
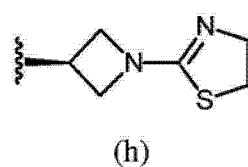
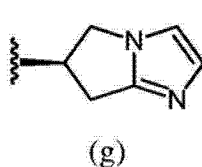
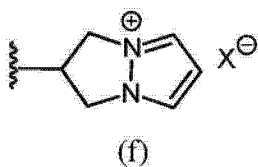
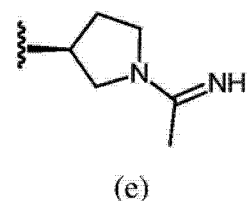
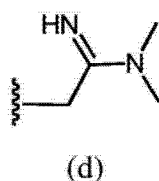
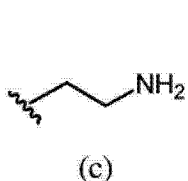
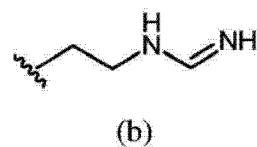
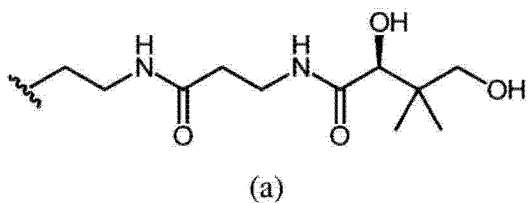
以提供式 (I-c) 含硫醇化合物：

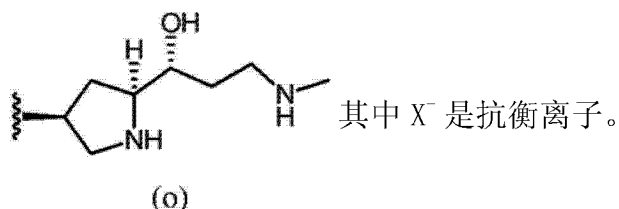


或其盐。

21. 根据权利要求 20 所述的裂解物或方法, 其中 R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。

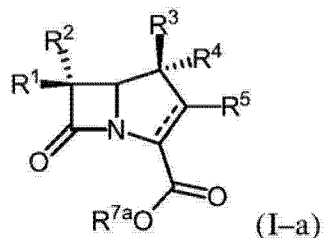
22. 根据权利要求 21 所述的裂解物或方法, 其中 R^8 选自由以下组成的群组：





23. 根据权利要求 18 所述的裂解物或方法, 其中 R^5 是 $-OH$ 。

24. 根据权利要求 23 所述的裂解物或方法, 其中使所述式 (I-a) 化合物:



或其盐或互变异构体或其组合, 其中 $\equiv$ 代表双键;

与下式的化合物接触:

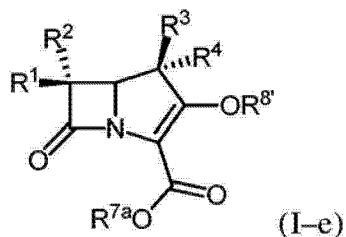


其中:

X 是离去基团; 且

$R^{8'}$ 选自由以下组成的群组: $-C(=O)R^{8a}$ 、 $-C(=O)OR^{8a}$ 、 $-C(=O)SR^{8a}$ 、 $-C(=O)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=NR^{8b})R^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})OR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})SR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=S)R^{8a}$ 、 $-C(=S)OR^{8a}$ 、 $-C(=S)SR^{8a}$ 、 $-C(=S)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=O)NR^{8b}SO_2R^{8a}$ 、 $-S(=O)R^{8a}$ 、 $-SO_2R^{8a}$ 、 $-SO_2N(R^{8a})_2$ 、 $-Si(R^{8a})_3$ 、 $-P(=O)(R^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(OR^{8a})$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(N(R^{8b})_2)$ 、 $-P(=O)(N(R^{8b})_2)_2$ 、 $-P(=O)_2R^{8a}$ 、 $-P(=O)_2OR^{8a}$ 、 $-P(=O)_2N(R^{8b})_2$ 、 $-B(R^{8a})_2$ 、 $-B(OR^{8a})_2$ 和 $-BR^{8a}(OR^{8a})$, 其中如果氧保护基团附接到氧原子, 且如果硫保护基团附接到硫原子, 那么 R^{8a} 选自由以下组成的群组: 任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基, 或两个 R^{8a} 基团或 R^{8a} 与 R^{8b} 基团接合形成任选地经取代的杂环; 且 R^{8b} 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组: 氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团, 或两个 R^{8b} 接合形成任选地经取代的杂环;

以提供式 (I-e) 化合物:

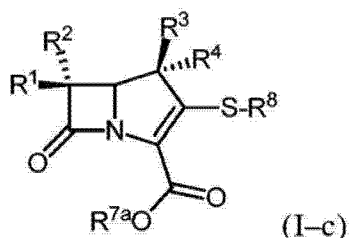


或其盐。

25. 根据权利要求 24 所述的裂解物或方法, 其中使所述式 (I-e) 化合物与式 HS-R^8 化合物接触,

其中 R^8 选自由以下组成的群组: 任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基;

以提供式 (I-c) 含硫醇化合物:



或其盐。

26. 根据权利要求 15 到 25 中任一权利要求所述的裂解物或方法, 其中 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。

27. 根据权利要求 26 所述的裂解物或方法, 其进一步包含使所述化合物与加氧酶接触以提供其中 R^2 是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 的羟化化合物。

28. 根据权利要求 15 到 25 中任一权利要求所述的裂解物或方法, 其中 R^1 和 R^2 二者都为氢。

29. 根据权利要求 28 所述的裂解物或方法, 其进一步包含使所述化合物与甲基转移酶接触以提供其中 R^1 是氢且 R^2 是 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 的化合物。

30. 根据权利要求 29 所述的裂解物或方法, 其进一步包含使其中 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 的所述化合物与加氧酶接触以提供其中 R^2 是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 的羟化化合物。

31. 一种医药组合物, 其包含通过根据权利要求 2 到 30 中任一权利要求所述的方法制备的化合物或其盐以及医药上可接受的赋形剂。

32. 一种治疗细菌感染的方法, 其包含向有需要的个体投与治疗有效量的通过根据权利要求 2 到 30 中任一权利要求所述的方法制备的化合物或其盐或根据权利要求 31 所述的医药组合物。

碳青霉烯 (CARBAPENEM) 的无细胞制备

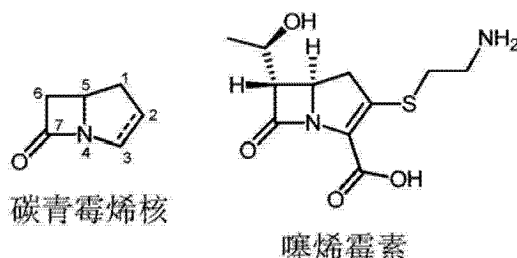
[0001] 相关申请案

[0002] 本申请案依据 35U. S. C. § 119(e) 主张对 2011 年 9 月 9 日申请的美国临时专利申请案 U. S. S. N. 61/533, 039 的优先权, 其是以引用方式并入本文中。

背景技术

[0003] 在 1976 年, 发现从土壤细菌卡特利链霉菌 (*Streptomyces cattleya*) 获得的发酵液可有效用于筛选肽聚糖生物合成的抑制剂。最初尝试证实, 活性物质的分离因所述组份的化学不稳定性而难以进行。在多次尝试和广泛纯化后, 最终以 >90% 纯度分离所述材料, 从而使得可对首先分离的天然碳青霉烯 (carbapenem) 抗生素噻烯霉素 (thienamycin) 进行结构阐释。例如, 参见卡汉 (Kahan) 等人, 抗生素杂志 (*J. Antibiot.*) (1979) 32 : 1-12。

[0004]

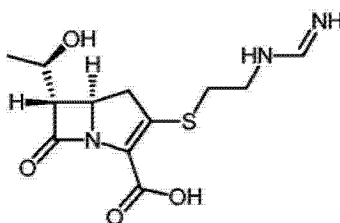


[0005] 从 1978 年到 2000 年, 已报道总共超过 23 次噻烯霉素的化学合成, 大多在 12 个或 12 个以上连续化学步骤后以相对低产率 (例如, 约 0.2% 到 10% 产率) 产生噻烯霉素。例如, 参见萨尔茨曼 (Salzmann) 等人, 美国化学学会会志 (*J. Am. Chem. Soc.*) (1980) 102 : 6161 ; 黄 (Huang) 等人, 美国化学学会会志 (1980) 102 : 2060 ; 赖德尔 (Reider) 等人, 四面体通讯 (*Tetrahedron Letters*) (1982) 23 : 2293-2296 ; 德赛尔佑 (Desiraju) 等人, 化学学会会志与化学通讯 (*J. Chem. Soc. Chem. Comm.*) (1984) 494 ; 埃文斯 (Evans) 等人, 四面体通讯 (1986) 27 : 4961 ; 格里科 (Grieco) 等人, 美国化学学会会志 (1984) 106 : 6414 ; 和雅各比 (Jacobi) 等人, 有机化学杂志 (*J. Org. Chem.*) (1996) 61 : 2413。通过传统发酵从卡特利链霉菌产生噻烯霉素也面临重大障碍, 例如低效价和难以分离并纯化通过发酵产生的噻烯霉素。例如, 参见美国专利 3, 950, 357 和 4, 006, 060, 其各自以引用方式并入本文中。业内最终认为噻烯霉素由于其在水性介质中的化学不稳定性以及对脱氢肽酶 -I (DHP-I) 的生物不稳定性而不适于临床治疗。此后研究者已在寻找噻烯霉素的替代物, 其维持噻烯霉素的极佳抗细菌活性, 但不受噻烯霉素的稳定性问题的困扰。

[0006] 在 1985 年研发出一种所述碳青霉烯亚胺培南 (imipenem) 作为静脉注射产品。例如, 参见以引用方式并入本文中的美国专利 4, 194, 047。亚胺培南具有针对好氧和厌氧革兰氏 (Gram) 阳性以及革兰氏阴性细菌的广谱活性, 且继续常用于抵抗铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*), 其为医院感染的主要因素之一。当前亚胺培南的制造利用化学合成途径, 其是用简单构造块合成最终产物, 通常产率较低, 从而导致产生大量废物且制造成本高。例如, 参见格拉博夫斯基 (Grabowski), 手性 (*Chirality*) (2005) 17 : S249-S259,

以及其中引用的参考文献。

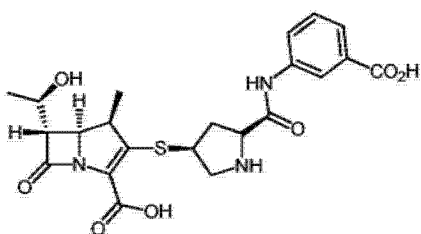
[0007]



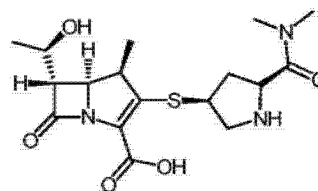
亚胺培南

[0008] 已发现其它有前景的碳青霉烯抗生素在人类中有效,例如,包括厄他培南 (ertapenem) (INVANZ, 默克 (Merck))、美罗培南 (meropenem) (MERREM, 阿斯利康 (Astra Zeneca))、帕尼培南 (panipenem)、比阿培南 (biapenem)、多利培南 (doripenem) (FINIBAX, 强生 (Johnson&Johnson))、L-646591 和 ER-35768, 其各自用于非经肠使用;经口活性碳青霉烯 CL-191121、L-036、DU-6681 和 R-95867 以及其相应的酯前药 L-084、DZ-2640 和 CS-834。例如,参见熊谷 (Kumagai) 等人,当今医药化学 (Curr. Med. Chem.)-抗感染剂 (Anti-Infective Agents) (2002)1:1-14。其它碳青霉烯包括 (但不限于) 沙福曲南 (saftrinam)、替比培南 (tebipenem)、托莫培南 (tomopenem)、S-4661、SM216601、GV129606、ZD-4433、R-83201、BO-2502A、BO-3482、DK-35C、DA-1131、S-4661、L-786, 392、L-695256、L-786, 392、GV104326、GV-118819、GV143253、MK-0826、J-110, 441、J-111225、FR-21818、DX-8739、CS-023、ME-1036、CP5068、CL188624、CL-190294、OCA-983、T-5575 和 PZ-60。这些碳青霉烯中大部分是通过化学合成产生。

[0009]

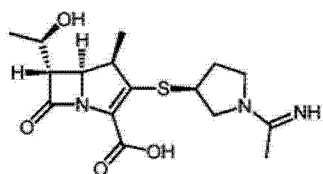


厄他培南

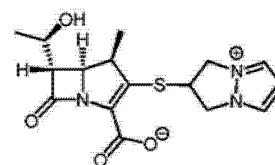


美罗培南

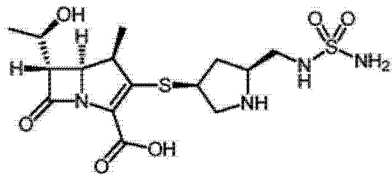
[0010]



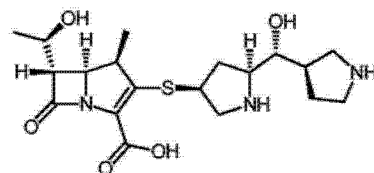
帕尼培南



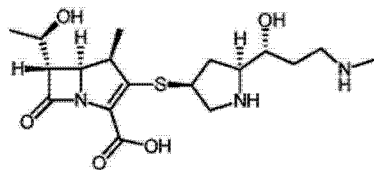
比阿培南



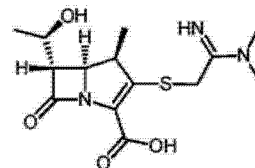
多利培南



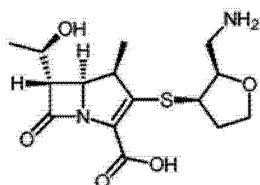
ER-35768



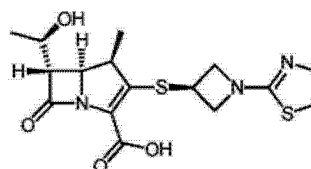
来那培南(lenapenem)



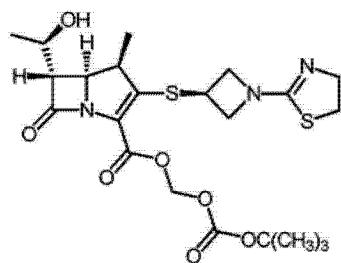
L-646591



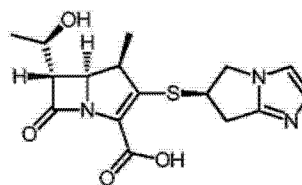
CL-191121



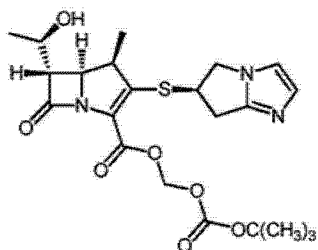
L-036



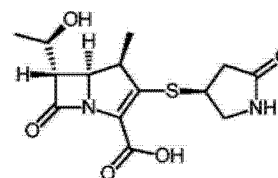
L-084



DU-6681

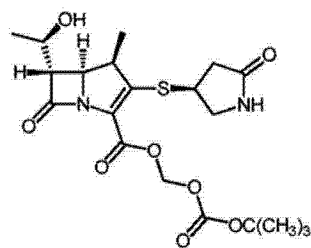


DZ-2640



R-95867

[0011]



CS-834

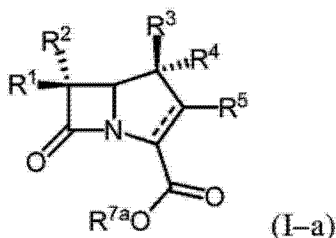
[0012] 因此, 业内仍然需要用于产生和研发现有的和新的碳青霉烯抗生素的更有效、环境亲善且成本有效的工艺。

发明内容

[0013] 本发明提供可用于生成碳青霉烯和其中间体的无细胞系统、方法和组合物(例如, 所有裂解物)。

[0014] 在一个方面中, 提供细胞裂解物, 其包含一组能生成式(I-a)化合物的酶:

[0015]



(I-a)

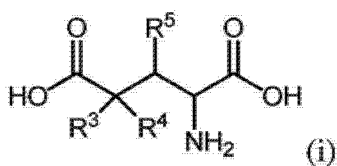
[0016] 或其盐或互变异构体或其组合;

[0017] 其是从以下物质生成:

[0018] (1) 葡萄糖和甘氨酸或其盐; 和 / 或

[0019] (2) 葡萄糖和式(i)的任选地经取代的谷氨酸:

[0020]

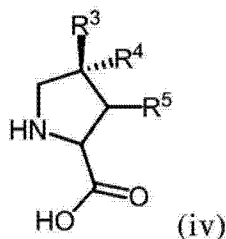


(i)

[0021] 或其盐; 和 / 或

[0022] (3) 葡萄糖和式(iv)脯氨酸化合物:

[0023]

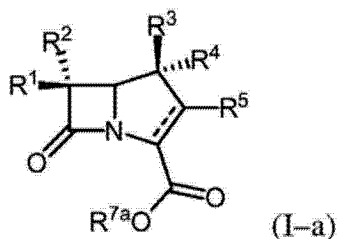


(iv)

[0024] 或其盐; 其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^{7a} 如本文中所定义, 且 --- 代表单键或双键。

[0025] 在另一方面中, 提供生成式(I-a)化合物的方法:

[0026]



[0027] 或其盐或互变异构体或其组合；

[0028] 所述方法包含：

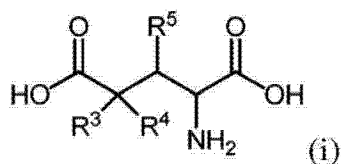
[0029] 提供包含一种或一种以上酶的细胞裂解物，其中所述酶选自由以下组成的群组：激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）、糖酵解 / 乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶、羧甲基-Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶；

[0030] 其中使所述一种或一种以上细胞裂解物与以下物质接触：

[0031] (1) 葡萄糖和甘氨酸或其盐；和 / 或

[0032] (2) 葡萄糖和式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸：

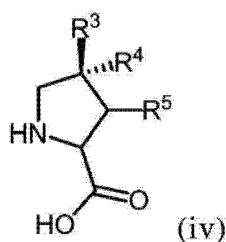
[0033]



[0034] 或其盐，和 / 或

[0035] (3) 葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物：

[0036]



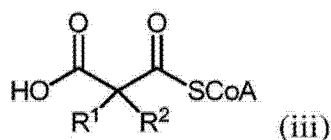
[0037] 或其盐；其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^{7a} 如本文中所定义，且所述 --- 代表单键或双键。在某些实施例中， --- 代表单键。在某些实施例中， --- 代表双键。在某些实施例中， R^1 为氢。在某些实施例中， R^3 为氢或 $-\text{CH}_3$ 。在某些实施例中， R^2 为氢、 $-\text{CH}_3$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。在某些实施例中， R^4 为氢。在某些实施例中， R^5 为氢或 $-\text{OH}$ 。

[0038] 在某些实施例中，细胞裂解物是经改造以过表达一种或一种以上酶的大肠杆菌 (E. coli) 生物体的裂解物。在某些实施例中，细胞裂解物是不同细胞裂解物的组合，其中每一种不同裂解物经改造以过表达一种或一种以上酶，例如一种或一种以上不同酶或两种或两种以上酶的不同组合。在某些实施例中，细胞裂解物是经改造以过表达一种或一种以上选自自由以下组成的群组的酶的细胞的裂解物： γ -谷氨酰基激酶、Glu-5-P 脱氢酶、糖酵解 /

乙酰基 -CoA 生物合成多酶、乙酰基 -CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基 -CoA 还原酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶、羧甲基 -Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶。在某些实施例中，在裂解前在细胞中存在一种或一种以上选自以下组成的群组的酶： γ -谷氨酰基激酶、Glu-5-P 脱氢酶、糖酵解/乙酰基 -CoA 生物合成多酶、乙酰基 -CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基 -CoA 还原酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶和其同工酶。在某些实施例中，在裂解前在细胞的细胞质中发现一种或一种以上酶。在某些实施例中，在裂解前一种或一种以上选自以下组成的群组的酶被隔离在细胞的壁膜间隙中：羧甲基 -Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶和甲基转移酶和其同工酶。

[0039] 在某些实施例中，葡萄糖被酶促转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物：

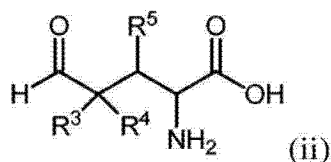
[0040]



[0041] 或其盐；其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

[0042] 在某些实施例中，葡萄糖和甘氨酸在与乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、激酶和脱氢酶接触后被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛：

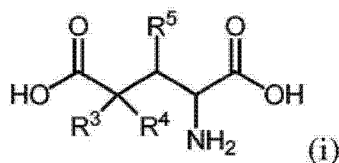
[0043]



[0044] 或其盐。

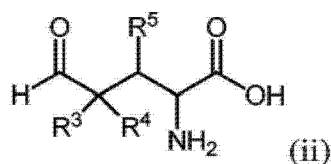
[0045] 在某些实施例中，式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸：

[0046]



[0047] 在与激酶和脱氢酶接触后被转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛化合物：

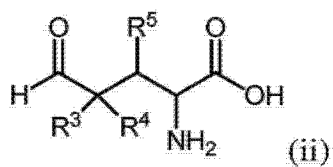
[0048]



[0049] 或其盐。

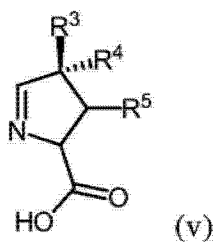
[0050] 在某些实施例中,式(ii)的任选地经取代的谷氨酸半醛化合物:

[0051]



[0052] 或其盐环化形成下式的吡咯化合物:

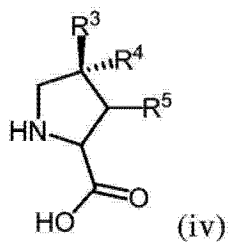
[0053]



[0054] 或其盐,且水为副产物。

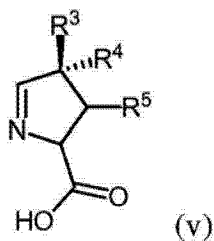
[0055] 在某些实施例中,式(iv)脯氨酸化合物:

[0056]



[0057] 或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为下式的吡咯化合物:

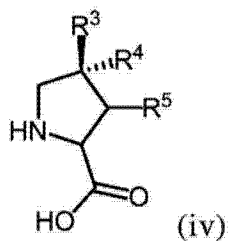
[0058]



[0059] 或其盐。

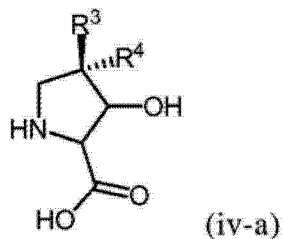
[0060] 在某些实施例中,式(iv)脯氨酸化合物:

[0061]



[0062] 或其盐,其中R⁵为氢;在与脯氨酸-3-羟化酶接触后被酶促转化为下式的3-羟化脯氨酸化合物:

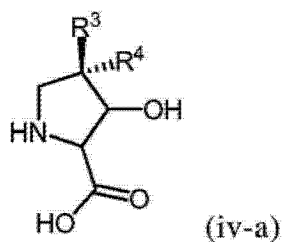
[0063]



[0064] 或其盐。

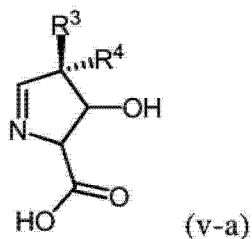
[0065] 在某些实施例中,下式的 3- 羟化脯氨酸化合物 :

[0066]



[0067] 或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为下式的 3- 羟化吡咯化合物 :

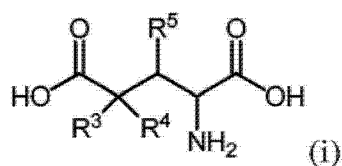
[0068]



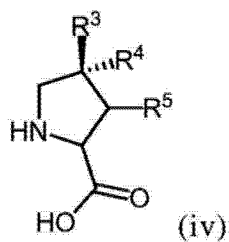
[0069] 或其盐。

[0070] 在某些实施例中,式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸 :

[0071]

[0072] 或其盐在与 γ -谷氨酰基激酶-GP- 还原酶多酶复合体 (例如,大肠杆菌 ProB 和 ProA) 接触后被酶促转化为式 (iv) 脯氨酸化合物 :

[0073]



[0074] 或其盐。

[0075] 在某些实施例中,含酶细胞裂解物将葡萄糖与甘氨酸的组合、或葡萄糖与式 (i)

的任选地经取代的谷氨酸的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛或其盐：

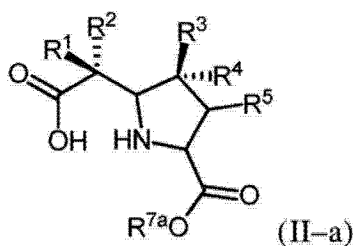
[0076]



[0077] 其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

[0078] 在某些实施例中, 式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛和式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物：

[0079]



[0080] 或其盐, 其中 R^{7a} 为氢。

[0081] 在某些实施例中, 含酶细胞裂解物将葡萄糖与式 (iv) 脯氨酸化合物的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (v) 吡咯化合物或其盐：

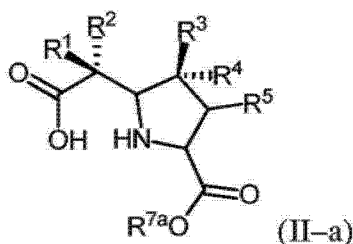
[0082]



[0083] 其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团。

[0084] 在某些实施例中, 式 (v) 吡咯化合物或其盐和式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物：

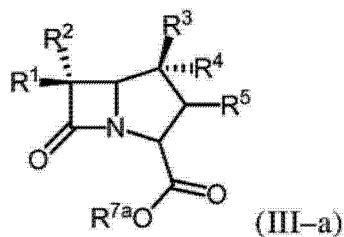
[0085]



[0086] 或其盐, 其中 R^{7a} 为氢。

[0087] 在某些实施例中, 吡咯烷基化合物 (II-a) 在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (III-a) 的 β -内酰胺化合物：

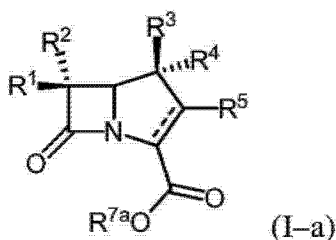
[0088]



[0089] 或其盐。

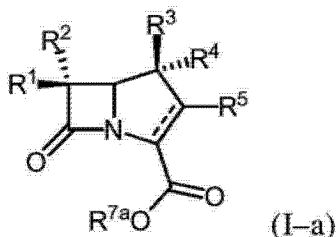
[0090] 在某些实施例中,式(III-a)的 β -内酰胺化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式(I-a)化合物:

[0091]

[0092] 或其盐,其中 $\equiv$ 代表双键。

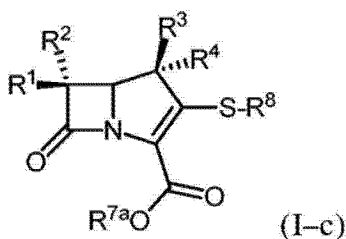
[0093] 在某些实施例中,在 R^5 为氢且 $\equiv$ 代表双键时,使式(I-a)化合物:

[0094]



[0095] 或其盐与转移酶和式 HSR^8 化合物(其中 R^8 如本文中所定义)接触,以提供式(I-c)含硫醇化合物:

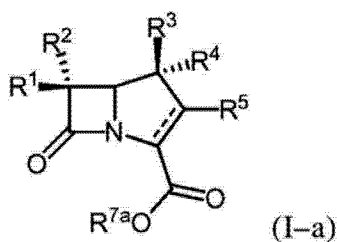
[0096]



[0097] 或其盐。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。

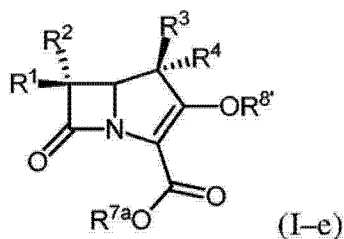
[0098] 在某些实施例中,在 $\equiv$ 代表双键且 R^5 为 $-OH$ 时,使式(I-a)化合物:

[0099]



[0100] 或其盐或互变异构体或其组合与式 R^{8'}-X 化合物（其中 X 是离去基团，且 R^{8'} 如本文中所定义）接触，以提供式 (I-e) 化合物：

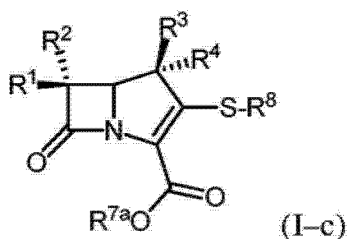
[0101]



[0102] 或其盐。

[0103] 在某些实施例中，使式 (I-e) 化合物与式 HSR⁸ 化合物（其中 R⁸ 如本文中所定义）接触，以提供式 (I-c) 含硫醇化合物：

[0104]



[0105] 或其盐。

[0106] 在某些实施例中，在 R² 为 -CH₃ 时，使式 (I-a) 化合物与加氧酶接触还提供其中 R² 是 -CH₂OH 的羟化化合物。在某些实施例中，在 R² 是 -CH₂CH₃ 时，使式 (I-a) 化合物与加氧酶接触以提供其中 R² 是 -CH(OH)CH₃ 的羟化化合物。

[0107] 在其中 R¹ 和 R² 都为氢的某些实施例中，所述方法包含使式 (I-a) 化合物与甲基转移酶（例如，卡特利链霉菌 ThnL、ThnP、ThnK 或其同工酶）接触以提供其中 R² 是烷基、例如 -CH₃（甲基，Me）或 -CH₂CH₃（乙基，Et）的化合物。

[0108] 在另一方面中，提供医药组合物，其包含通过本发明无细胞系统制备的化合物或其盐和任选地医药上可接受的赋形剂。

[0109] 在另一方面中，提供治疗细菌感染的方法，其包含向有需要的个体投与治疗有效量的通过本发明无细胞系统生成的化合物或其医药组合物。

[0110] 附图和实施方式中阐述本发明的一个或一个以上实施例的细节。可根据说明和权利要求书了解本发明的其它特征、目标和优点。

[0111] 定义

[0112] 下文更详细地阐述特定官能团和化学术语的定义。化学元素是根据元素周期表（CAS 版，化学与物理手册（Handbook of Chemistry and Physics），第 75 版，内封面）来

鉴别,且特定官能团一般是如其中所述来定义。另外,有机化学的一般原理以及特定官能部分和反应性阐述于以下文献中:有机化学 (Organic Chemistry),托马斯佐雷尔 (Thomas Sorrell),大学科学书籍 (University Science Books),索萨利托,1999;史密斯 (Smith) 和马奇 (March) 马奇的高级有机化学 (March's Advanced Organic Chemistry),第5版,约翰威利父子公司 (John Wiley & Sons, Inc.),纽约,2001;拉洛克 (Larock),综合有机转换 (Comprehensive Organic Transformations),VCH 出版公司 (VCH Publishers, Inc.),纽约,1989;和卡拉瑟斯 (Carruthers),一些现代有机合成方法 (Some Modern Methods of Organic Synthesis),第3版,剑桥大学出版社 (Cambridge University Press),剑桥,1987。

[0113] 本文所述化合物可包含一个或一个以上不对称中心,且因此可以各种异构形式 (例如对映异构体和 / 或非对映异构体) 存在。例如,本文所述化合物可呈个别对映异构体、非对映异构体或几何异构体形式,或可呈立体异构体混合物形式,包括外消旋混合物和富含一种或一种以上立体异构体的混合物。异构体可通过所属领域技术人员已知的方法从混合物分离,包括手性高压液相色谱 (HPLC) 以及手性盐的形成和结晶;或优选异构体可通过不对称合成来制备。例如,参见雅克 (Jacques) 等人,对映异构体、外消旋物和拆分 (Enantiomers, Racemates and Resolutions, 威利国际科学 (Wiley Interscience), 纽约, 1981); 维伦 (Wilensky) 等人,四面体 33:2725 (1977); 伊莱尔, E. L. (Eliel, E. L.) 碳化合物的立体化学 (Stereochemistry of Carbon Compounds) (麦格劳-希尔 (McGraw-Hill), 纽约, 1962); 和维伦 S. H. 拆分剂和光学拆分表格 (Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions), 第268页 (E. L. 伊莱尔编辑, 圣母大学出版社 (Univ. of Notre Dame Press), 圣母院, 印第安纳州 1972)。本发明另外涵盖呈实质上不含其它异构体的个别异构体形式且另一选择为呈各种异构体的混合物形式的化合物。

[0114] 在列示数值范围时,打算涵盖所述范围内的每一数值和子范围。例如,“C₁₋₆ 烷基”打算涵盖 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅、C₆、C₁₋₆、C₁₋₅、C₁₋₄、C₁₋₃、C₁₋₂、C₂₋₆、C₂₋₅、C₂₋₄、C₂₋₃、C₃₋₆、C₃₋₅、C₃₋₄、C₄₋₆、C₄₋₅ 和 C₅₋₆ 烷基。

[0115] 如本文所用的“烷基”是指具有1到10个碳原子的直链或具支链饱和烃基的基团 (“C₁₋₁₀ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到9个碳原子 (“C₁₋₉ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到8个碳原子 (“C₁₋₈ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到7个碳原子 (“C₁₋₇ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到6个碳原子 (“C₁₋₆ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到5个碳原子 (“C₁₋₅ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到4个碳原子 (“C₁₋₄ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到3个碳原子 (“C₁₋₃ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1到2个碳原子 (“C₁₋₂ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有1个碳原子 (“C₁ 烷基”)。在一些实施例中,烷基具有2到6个碳原子 (“C₂₋₆ 烷基”)。C₁₋₆ 烷基的实例包括甲基 (C₁)、乙基 (C₂)、正丙基 (C₃)、异丙基 (C₃)、正丁基 (C₄)、叔丁基 (C₄)、仲丁基 (C₄)、异丁基 (C₄)、正戊基 (n-pentyl, C₅)、3-戊烷基 (C₅)、戊基 (amyl, C₅)、新戊基 (C₅)、3-甲基-2-丁烷基 (C₅)、叔戊基 (amyl, C₅) 和正己基 (C₆)。烷基的其它实例包括正庚基 (C₇)、正辛基 (C₈) 等。除非另外指明,否则烷基在每一情况中独立地未经取代 (“未取代烷基”) 或经一个或一个以上取代基取代 (“经取代烷基”)。在某些实施例中,烷基是未取代 C₁₋₁₀ 烷基 (例如, -CH₃)。在某些实施例中,烷基是经取代 C₁₋₁₀ 烷基。

[0116] “全卤烷基”是如本文所定义的经取代烷基，其中所有氢原子都独立地经卤素（例如氟、溴、氯或碘）置换。在一些实施例中，烷基部分具有 1 到 8 个碳原子（“C₁₋₈ 全卤烷基”）。在一些实施例中，烷基部分具有 1 到 6 个碳原子（“C₁₋₆ 全卤烷基”）。在一些实施例中，烷基部分具有 1 到 4 个碳原子（“C₁₋₄ 全卤烷基”）。在一些实施例中，烷基部分具有 1 到 3 个碳原子（“C₁₋₃ 全卤烷基”）。在一些实施例中，烷基部分具有 1 到 2 个碳原子（“C₁₋₂ 全卤烷基”）。在一些实施例中，所有氢原子都经氟置换。在一些实施例中，所有氢原子都经氯置换。全卤烷基的实例包括 -CF₃、-CF₂CF₃、-CF₂CF₂CF₃、-CCl₃、-CFCl₂、-CF₂Cl 等。

[0117] 术语“杂烷基”是指如本文所定义的烷基，其中在烷基链的主链中、即在烷基链的一个或一个以上碳原子之间存在至少一个氧、氮或硫杂原子（例如，1-2、3-4、1-2、1-3、1-4、2-4、3-4 或 2-3 个杂原子，含端值）。在某些实施例中，杂烷基是未取代杂 C₁₋₁₀ 烷基。在某些实施例中，杂烷基是经取代杂 C₁₋₁₀ 烷基。

[0118] 如本文所用的“烯基”是指具有 2 到 10 个碳原子和一个或一个以上碳-碳双键（例如 1、2、3 或 4 个双键）且无碳-碳三键的直链或具支链不饱和烃基的基团（“C₂₋₁₀ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 9 个碳原子（“C₂₋₉ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 8 个碳原子（“C₂₋₈ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 7 个碳原子（“C₂₋₇ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 6 个碳原子（“C₂₋₆ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 5 个碳原子（“C₂₋₅ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 4 个碳原子（“C₂₋₄ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 到 3 个碳原子（“C₂₋₃ 烯基”）。在一些实施例中，烯基具有 2 个碳原子（“C₂ 烯基”）。一个或一个以上碳-碳双键可为内部（例如在 2-丁烯基中）或末端（例如在 1-丁烯基中）双键。C₂₋₄ 烯基的实例包括乙烯基（C₂）、1-丙烯基（C₃）、2-丙烯基（C₃）、1-丁烯基（C₄）、2-丁烯基（C₄）、丁二烯基（C₄）等。C₂₋₆ 烯基的实例包括上文所提到的 C₂₋₄ 烯基以及戊烯基（C₅）、戊二烯基（C₅）、己烯基（C₆）等。烯基的其它实例包括庚烯基（C₇）、辛烯基（C₈）、辛三烯基（C₈）等。除非另外指明，否则烯基在每一情况中独立地未经取代（“未取代烯基”）或经一个或一个以上取代基取代（“经取代烯基”）。在某些实施例中，烯基是未取代 C₂₋₁₀ 烯基。在某些实施例中，烯基是经取代 C₂₋₁₀ 烯基。

[0119] 术语“杂烯基”是指如本文所定义的烯基，其中在烯基链的主链中、即在烯基链的一个或一个以上碳原子之间存在至少一个氧、氮或硫杂原子（例如，1-2、3-4、1-2、1-3、1-4、2-4、3-4 或 2-3 个杂原子，含端值）。在某些实施例中，杂烯基是未取代杂 C₂₋₁₀ 烯基。在某些实施例中，杂烯基是经取代杂 C₂₋₁₀ 烯基。

[0120] 如本文所用的“炔基”是指具有 2 到 10 个碳原子、一个或一个以上碳-碳三键（例如 1、2、3 或 4 个三键）和任选地一个或一个以上碳-碳双键（例如 1、2、3 或 4 个双键）的直链或具支链不饱和烃基的基团（“C₂₋₁₀ 炔基”）。包括一个或一个以上双键的炔基还称为“烯-炔”。在一些实施例中，炔基具有 2 到 9 个碳原子（“C₂₋₉ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 8 个碳原子（“C₂₋₈ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 7 个碳原子（“C₂₋₇ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 6 个碳原子（“C₂₋₆ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 5 个碳原子（“C₂₋₅ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 4 个碳原子（“C₂₋₄ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 到 3 个碳原子（“C₂₋₃ 炔基”）。在一些实施例中，炔基具有 2 个碳原子（“C₂ 炔基”）。一个或一个以上碳-碳三键可为内部（例如在 2-丁炔基）或末端（例如在 1-丁炔基）三键。C₂₋₄ 炔基的实例包括（但不限于）乙炔

基 (C_2)、1-丙炔基 (C_3)、2-丙炔基 (C_3)、1-丁炔基 (C_4)、2-丁炔基 (C_4) 等。 C_{26} 烯基的实例包括上文所提到的 C_{2-4} 炔基以及戊炔基 (C_5)、己炔基 (C_6) 等。炔基的其它实例包括庚炔基 (C_7)、辛炔基 (C_8) 等。除非另外指明, 否则炔基在每一情况中独立地未经取代 (“未取代炔基”) 或经一个或一个以上取代基取代 (“经取代炔基”)。在某些实施例中, 炔基是未取代 C_{2-10} 炔基。在某些实施例中, 炔基是经取代 C_{2-10} 炔基。

[0121] 术语“杂炔基”是指如本文所定义的炔基, 其中在炔基链的主链中、即在炔基链的一个或一个以上碳原子之间存在至少一个氧、氮或硫杂原子 (例如, 1-2、3-4、1-2、1-3、1-4、2-4、3-4 或 2-3 个杂原子, 含端值)。在某些实施例中, 杂炔基是未取代杂 C_{2-10} 炔基。在某些实施例中, 杂炔基是经取代杂 C_{2-10} 炔基。

[0122] 如本文所用的“碳环基”是指在非芳香族环系统中具有 3 到 10 个环碳原子 (“ C_{3-10} 碳环基”) 和 0 个杂原子的非芳香族环烷基的基团。在一些实施例中, 碳环基具有 3 到 8 个环碳原子 (“ C_{3-8} 碳环基”)。在一些实施例中, 碳环基具有 3 到 6 个环碳原子 (“ C_{3-6} 碳环基”)。在一些实施例中, 碳环基具有 3 到 6 个环碳原子 (“ C_{3-6} 碳环基”)。在一些实施例中, 碳环基具有 5 到 10 个环碳原子 (“ C_{5-10} 碳环基”)。实例性 C_{3-6} 碳环基包括 (但不限于) 环丙基 (C_3)、环丙烯基 (C_3)、环丁基 (C_4)、环丁烯基 (C_4)、环戊基 (C_5)、环戊烯基 (C_5)、环己基 (C_6)、环己烯基 (C_6)、环己二烯基 (C_6) 等。实例性 C_{3-8} 碳环基包括 (但不限于) 上文所提到的 C_{3-6} 碳环基以及环庚基 (C_7)、环庚烯基 (C_7)、环庚二烯基 (C_7)、环庚三烯基 (C_7)、环辛基 (C_8)、环辛烯基 (C_8)、二环 [2.2.1] 庚烷基 (C_7)、二环 [2.2.2] 辛烷基 (C_8) 等。实例性 C_{3-10} 碳环基包括 (但不限于) 上文所提到的 C_{3-8} 碳环基以及环壬基 (C_9)、环壬烯基 (C_9)、环癸基 (C_{10})、环癸烯基 (C_{10})、八氢-1H-茚基 (C_9)、十氢萘基 (C_{10})、螺 [4.5] 癸烷基 (C_{10}) 等。如上述实例所述, 在某些实施例中, 碳环基是单环 (“单环碳环基”) 或多环 (例如, 含有稠合、桥接或螺环系统, 例如二环系统 (“二环碳环基”) 或三环系统 (“三环碳环基”)) 且可为饱和环或可含有一个或一个以上碳-碳双键或三键。“碳环基”还包括其中如上文所定义的碳环基环与一个或一个以上芳基或杂芳基稠合的环系统, 其中附接点在碳环基环上, 且在所述情况下, 碳数仍指明碳环系统中的碳数。除非另外指明, 否则碳环基在每一情况中独立地未经取代 (“未取代碳环基”) 或经一个或一个以上取代基取代 (“经取代碳环基”)。在某些实施例中, 碳环基是未取代 C_{3-10} 碳环基。在某些实施例中, 碳环基是经取代 C_{3-10} 碳环基。

[0123] 在一些实施例中, “碳环基”是具有 3 到 10 个环碳原子的单环饱和碳环基 (“ C_{3-10} 环烷基”)。在一些实施例中, 环烷基具有 3 到 8 个环碳原子 (“ C_{3-8} 环烷基”)。在一些实施例中, 环烷基具有 3 到 6 个环碳原子 (“ C_{3-6} 环烷基”)。在一些实施例中, 环烷基具有 5 到 6 个环碳原子 (“ C_{5-6} 环烷基”)。在一些实施例中, 环烷基具有 5 到 10 个环碳原子 (“ C_{5-10} 环烷基”)。 C_{5-6} 环烷基的实例包括环戊基 (C_5) 和环己基 (C_6)。 C_{3-6} 环烷基的实例包括上文所提到的 C_{5-6} 环烷基以及环丙基 (C_3) 和环丁基 (C_4)。 C_{3-8} 环烷基的实例包括上文所提到的 C_{3-6} 环烷基以及环庚基 (C_7) 和环辛基 (C_8)。除非另外指明, 否则环烷基在每一情况中独立地未经取代 (“未取代环烷基”) 或经一个或一个以上取代基取代 (“经取代环烷基”)。在某些实施例中, 环烷基是未取代 C_{3-10} 环烷基。在某些实施例中, 环烷基是经取代 C_{3-10} 环烷基。

[0124] 如本文所用的“杂环基”是指具有环碳原子和 1 到 4 个环杂原子的 3- 到 14 元非

芳香族环系统,其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫(“3-14 元杂环基”)。在含有一个或一个以上氮原子的杂环基中,如果化合价允许,附接点可为碳或氮原子。杂环基可为单环(“单环杂环基”)或多环(例如,稠合、桥接或螺环系统,例如二环系统(“二环杂环基”)或三环系统(“三环杂环基”),且可为饱和环或可含有一个或一个以上碳-碳双键或三键。杂环基多环系统可在一个或两个环中包括一个或一个以上杂原子。“杂环基”还包括其中如上文所定义的杂环基环与一个或一个以上碳环基稠合的环系统,其中附接点在碳环基或杂环基环上;或其中如上文所定义的杂环基环与一个或一个以上芳基或杂芳基稠合的环系统,其中附接点在杂环基环上,且在所述情况下,环成员数仍指明杂环基环系统中的环成员数。除非另外指明,否则杂环基在每一情况中独立地未经取代(“未取代杂环基”)或经一个或一个以上取代基取代(“经取代杂环基”)。在某些实施例中,杂环基是未取代 3-14 元杂环基。在某些实施例中,杂环基是经取代 3-14 元杂环基。

[0125] 在一些实施例中,杂环基是具有环碳原子和 1-4 环杂原子的 5-10 元非芳香族环系统,其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-10 元杂环基”)。在一些实施例中,杂环基是具有环碳原子和 1-4 环杂原子的 5-8 元非芳香族环系统,其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-8 元杂环基”)。在一些实施例中,杂环基是具有环碳原子和 1-4 环杂原子的 5-6 元非芳香族环系统,其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫(“5-6 元杂环基”)。在一些实施例中,5-6 元杂环基具有 1-3 个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6 元杂环基具有 1-2 个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施例中,5-6 元杂环基具有 1 个选自氮、氧和硫的环杂原子。

[0126] 含有 1 个杂原子的实例性 3 元杂环基包括(但不限于)氮杂环丙烯基、环氧乙烷基、环硫乙烷基。含有 1 个杂原子的实例性 4 元杂环基包括(但不限于)氮杂环丁烷基、环氧丙烷基和硫杂环丁基。含有 1 个杂原子的实例性 5 元杂环基包括(但不限于)四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢苯硫基、二氢苯硫基、吡咯烷基、二氢吡咯基和吡咯基-2,5-二酮。含有 2 个杂原子的实例性 5 元杂环基包括(但不限于)二氧戊环基、氧硫杂环戊烷基和二硫戊环基。含有 3 个杂原子的实例性 5 元杂环基包括(但不限于)三唑啉基、噁二唑啉基和噻二唑啉基。含有 1 个杂原子的实例性 6 元杂环基包括(但不限于)哌啶基、四氢吡喃基、二氢吡啶基和噻烷基。含有 2 个杂原子的实例性 6 元杂环基包括(但不限于)哌嗪基、吗啉基、二噻烷基、二噁烷基。含有 2 个杂原子的实例性 6 元杂环基包括(但不限于)三嗪基。含有 1 个杂原子的实例性 7 元杂环基包括(但不限于)氮杂环庚烷基、氧杂环庚烷基和硫杂环庚烷基。含有 1 个杂原子的实例性 8 元杂环基包括(但不限于)氮杂环辛烷基、氧杂环辛烷基和硫杂环辛烷基。实例性二环杂环基包括(但不限于)二氢吲哚基、异二氢吲哚基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并噻吩基、四氢苯并噻吩基、四氢苯并呋喃基、四氢吲哚基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、十氢异喹啉基、八氢色原烯基、八氢异色原烯基、十氢萘啶基、十氢-1,8-萘啶基、八氢吡咯并[3,2-b]吡咯、二氢吲哚基、邻苯二甲酰亚胺基、萘二甲酰亚胺基、色原烷基、色原烯基、1H-苯并[e][1,4]二氮杂卓基、1,4,5,7-四氢吡喃并[3,4-b]吡咯基、5,6-二氢-4H-呋喃并[3,2-b]吡咯基、6,7-二氢-5H-呋喃并[3,2-b]吡喃基、5,7-二氢-4H-噻吩并[2,3-c]吡喃基、2,3-二氢-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、2,3-二氢呋喃并[2,3-b]吡啶基、4,5,6,7-四氢-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶基、4,5,6,7-四氢呋喃并[3,2-c]吡啶基、4,5,6,7-四氢噻吩并[3,2-b]吡啶基、1,2,3,4-四氢-1,6-萘

啶基等。

[0127] 如本文所用的“芳基”是指芳香族环系统中提供有 6-14 个环碳原子和 0 个杂原子的单环或多环（例如，二环或三环） $4n+2$ 芳香族环系统（例如，具有 6、10 或 14 个在环阵列中共享的 π 电子）（“ C_{6-14} 芳基”）。在一些实施例中，芳基具有 6 个环碳原子（“ C_6 芳基”；例如苯基）。在一些实施例中，芳基具有 10 个环碳原子（“ C_{10} 芳基”；例如萘基，例如 1-萘基和 2-萘基）。在一些实施例中，芳基具有 14 个环碳原子（“ C_{14} 芳基”；例如蒽基）。“芳基”还包括其中如上文所定义的芳基环与一个或一个以上碳环基或杂环基稠合的环系统，其中附接基团或附接点在芳基环上，且在所述情况下，碳原子数仍指明芳基环系统中的碳原子数。除非另外指明，否则芳基在每一情况中独立地未经取代（“未取代芳基”）或经一个或一个以上取代基取代（“经取代芳基”）。在某些实施例中，芳基是未取代 C_{6-14} 芳基。在某些实施例中，芳基是经取代 C_{6-14} 芳基。

[0128] “芳烷基”是“烷基”亚组且是指经如本文所定义的芳基取代的如本文所定义的烷基，其中附接点在烷基部分上。

[0129] 如本文所用的“杂芳基”是指芳香族环系统中提供有环碳原子和 1-4 个环杂原子的 5-14 元单环或多环（例如，二环或三环） $4n+2$ 芳香族环系统（例如，具有 6、10 或 14 个在环阵列中共享的 π 电子）的基团，其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫（“5-14 元杂芳基”）。在含有一个或一个以上氮原子的杂芳基中，如果化合价允许，附接点可为碳或氮原子。杂芳基多环系统可在一个或两个环中包括一个或一个以上杂原子。“杂芳基”包括其中如上文所定义的杂芳基环与一个或一个以上碳环基或杂环基稠合的环系统，其中附接点在杂芳基环上，且在所述情况下，环成员数仍指明杂芳基环系统中的环成员数。“杂芳基”还包括其中如上文所定义的杂芳基环与一个或一个以上芳基稠合的环系统，其中附接点在芳基或杂芳基环上，且在所述情况下，环成员数指明稠合多环（芳基 / 杂芳基）环系统中的环成员数。在一个环不含杂原子的多环杂芳基（例如，吡啶基、喹啉基、咪唑基等）中，附接点可在任一环（即具有杂原子的环（例如，2-吡啶基）或不含杂原子的环（例如，5-吡啶基））上。

[0130] 在一些实施例中，杂芳基是芳香族环系统中提供有环碳原子和 1-4 个环杂原子的 5-10 元芳香族环系统，其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫（“5-10 元杂芳基”）。在一些实施例中，杂芳基是芳香族环系统中提供有环碳原子和 1-4 个环杂原子的 5-8 元芳香族环系统，其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫（“5-8 元杂芳基”）。在一些实施例中，杂芳基是芳香族环系统中提供有环碳原子和 1-4 个环杂原子的 5-6 元芳香族环系统，其中每一杂原子独立地选自氮、氧和硫（“5-6 元杂芳基”）。在一些实施例中，5-6 元杂芳基具有 1-3 个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施例中，5-6 元杂芳基具有 1-2 个选自氮、氧和硫的环杂原子。在一些实施例中，5-6 元杂芳基具有 1 个选自氮、氧和硫的环杂原子。除非另外指明，否则杂芳基在每一情况中独立地未经取代（“未取代杂芳基”）或经一个或一个以上取代基取代（“经取代杂芳基”）。在某些实施例中，杂芳基是未取代 5-14 元杂芳基。在某些实施例中，杂芳基是经取代 5-14 元杂芳基。

[0131] 含有 1 个杂原子的实例性 5 元杂芳基包括（但不限于）吡咯基、呋喃基和苯硫基。含有 2 个杂原子的实例性 5 元杂芳基包括（但不限于）咪唑基、吡唑基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基和异噻唑基。含有 3 个杂原子的实例性 5 元杂芳基包括（但不限于）三唑基、噁二

唑基和噻二唑基。含有 4 个杂原子的实例性 5 元杂芳基包括（但不限于）四唑基。含有 1 个杂原子的实例性 6 元杂芳基包括（但不限于）吡啶基。含有 2 个杂原子的实例性 6 元杂芳基包括（但不限于）哒嗪基、嘧啶基和吡嗪基。含有 3 或 4 个杂原子的实例性 6 元杂芳基分别包括（但不限于）三嗪基和四嗪基。含有 1 个杂原子的实例性 7 元杂芳基包括（但不限于）氮杂卓基、氧杂卓基 (oxepinyl) 和硫杂卓基 (thiepinyl)。实例性 5, 6- 二环杂芳基包括（但不限于）吡啶基、异吡啶基、吡唑基、苯并三唑基、苯并苯硫基、异苯并苯硫基、苯并呋喃基、苯并异呋喃基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噁二唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并噻二唑基、吡嗪基和嘌呤基。实例性 6, 6- 二环杂芳基包括（但不限于）萘啶基、蝶啶基、喹啉基、异喹啉基、噌啉基、喹噁啉基、酞嗪基和喹唑啉基。实例性三环杂芳基包括（但不限于）菲啶基、二苯并呋喃基、呋唑基、吡啶基、吩噻嗪基、吩噁嗪基和吩嗪基。

[0132] “杂芳烷基”是“烷基”亚组且是指经如本文所定义的杂芳基取代的如本文所定义的烷基，其中附接点在烷基部分上。

[0133] 如本文所用术语“部分不饱和”是指包括至少一个双键或三键的环部分。术语“部分不饱和”打算涵盖具有多个不饱和位点的环，但不打算包括如本文所定义的芳香族基团（例如，芳基或杂芳基部分）。

[0134] 如本文所定义的烷基、烯基、炔基、杂烷基、杂烯基、杂炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基任选地经取代（即，经取代或未经取代）。一般来说，无论前面是否有术语“任选地”，术语“经取代”都意指至少一个存于基团（例如，碳或氮原子）上的氢经允许取代基（例如在取代后产生稳定化合物（例如不会通过例如重排、环化、消除或其它反应自发经受转换的化合物）的取代基）置换。除非另外指明，否则“经取代”基团在基团的一个或一个以上经取代位置具有取代基，且在任一给定结构中的一个以上位置经取代时，每一位置的取代基相同或不同。本发明预期任一和所有所述组合以获得稳定化合物。出于本发明的目的，诸如氮等杂原子可具有氢取代基和 / 或如本文所述的任何适宜取代基，其满足杂原子的化合价且导致形成稳定部分。

[0135] 实例性碳原子取代基包括（但不限于）卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{ON}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_3^+\text{X}^-$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^{\text{cc}})\text{R}^{\text{bb}}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SSR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{bb}})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OS}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{OSi}(\text{R}^{\text{aa}})_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{SR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{bb}}\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{bb}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{OP}(\text{R}^{\text{cc}})_3$ 、 $-\text{B}(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{B}(\text{OR}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{BR}^{\text{aa}}(\text{OR}^{\text{cc}})$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

[0136] 或碳原子上的两个成对氢经基团 $=\text{O}$ 、 $=\text{S}$ 、 $=\text{NN}(\text{R}^{\text{bb}})_2$ 、 $=\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $=$

$\text{NNR}^{\text{bb}}\text{C}(=\text{O})\text{OR}^{\text{aa}} = \text{NNR}^{\text{bb}}\text{S}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}} = \text{NR}^{\text{bb}}$ 或 $= \text{NOR}^{\text{cc}}$ 置换；

[0137] R^{aa} 在每一情况中独立地选自 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，或两个 R^{aa} 基团接合形成 3-14 元杂环基或 5-14 元杂芳基环，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

[0138] R^{bb} 在每一情况中独立地选自氢、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{OR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{cc}})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{SOR}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{cc}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{aa}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{aa}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{N}(\text{R}^{\text{cc}})_2$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{NR}^{\text{cc}})_2$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，或两个 R^{bb} 基团接合形成 3-14 元杂环基或 5-14 元杂芳基环，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

[0139] R^{cc} 在每一情况中独立地选自氢、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，或两个 R^{cc} 基团接合形成 3-14 元杂环基或 5-14 元杂芳基环，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代；

[0140] R^{dd} 在每一情况中独立地选自卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{ON}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_3\text{X}^-$ 、 $-\text{N}(\text{OR}^{\text{ee}})\text{R}^{\text{ff}}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{SSR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{OCO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{ff}}\text{C}(=\text{O})\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{ff}}\text{CO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{NR}^{\text{ff}}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{OR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{OR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{ff}}\text{C}(=\text{NR}^{\text{ff}})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{NR}^{\text{ff}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{SO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{SO}_2\text{OR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{OSO}_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{S}(=\text{O})\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{Si}(\text{R}^{\text{ee}})_3$ 、 $-\text{OSi}(\text{R}^{\text{ee}})_3$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{N}(\text{R}^{\text{ff}})_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{SR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{C}(=\text{S})\text{SR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{SC}(=\text{S})\text{SR}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})_2\text{R}^{\text{ee}}$ 、 $-\text{P}(=\text{O})(\text{R}^{\text{ee}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{R}^{\text{ee}})_2$ 、 $-\text{OP}(=\text{O})(\text{OR}^{\text{ee}})_2$ 、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 全卤烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-10 元杂环基、 C_{6-10} 芳基、5-10 元杂芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{gg} 基团取代，或两个成对 R^{dd} 取代基可接合形成 $=\text{O}$ 或 $=\text{S}$ ；

[0141] R^{ee} 在每一情况中独立地选自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 全卤烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、 C_{6-10} 芳基、3-10 元杂环基和 3-10 元杂芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{gg} 基团取代；

[0142] R^{ff} 在每一情况中独立地选自氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 全卤烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-10 元杂环基、 C_{6-10} 芳基和 5-10 元杂芳基，或两个 R^{ff} 基团接合形成 3-14 元杂环基或 5-14 元杂芳基环，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{gg} 基团取代；且

[0143] R^{gg} 在每一情况中独立地为卤素、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{SO}_2\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{ON}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})_3\text{X}^-$ 、 $-\text{NH}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})_2\text{X}^-$ 、 $-\text{NH}_2(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})\text{X}^-$ 、 $-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{N}(\text{OC}_{1-6} \text{ 烷基})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{OH})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{NH}(\text{OH})$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SC}_{1-6}$ 烷基、 $-\text{SS}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{CO}_2(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{OCO}_2(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})_2$ 、 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NH}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{N}(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})\text{C}(=\text{O})(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHCO}_2(\text{C}_{1-6} \text{ 烷基})$ 、 $-\text{NHC}(=$

O)(C₁₋₆ 烷基)₂、-NHC(=O)NH(C₁₋₆ 烷基)、-NHC(=O)NH₂、-C(=NH)O(C₁₋₆ 烷基)、-OC(=NH)(C₁₋₆ 烷基)、-OC(=NH)OC₁₋₆ 烷基、-C(=NH)N(C₁₋₆ 烷基)₂、-C(=NH)NH(C₁₋₆ 烷基)、-C(=NH)NH₂、-OC(=NH)N(C₁₋₆ 烷基)₂、-OC(NH)NH(C₁₋₆ 烷基)、-OC(NH)NH₂、-NHC(NH)N(C₁₋₆ 烷基)₂、-NHC(=NH)NH₂、-NHSO₂(C₁₋₆ 烷基)、-SO₂N(C₁₋₆ 烷基)₂、-SO₂NH(C₁₋₆ 烷基)、-SO₂NH₂、-SO₂C₁₋₆ 烷基、-SO₂OC₁₋₆ 烷基、-OSO₂C₁₋₆ 烷基、-SOC₁₋₆ 烷基、-Si(C₁₋₆ 烷基)₃、-OSi(C₁₋₆ 烷基)₃-C(=S)N(C₁₋₆ 烷基)₂、C(=S)NH(C₁₋₆ 烷基)、C(=S)NH₂、-C(=O)S(C₁₋₆ 烷基)、-C(=S)SC₁₋₆ 烷基、-SC(=S)SC₁₋₆ 烷基、-P(=O)₂(C₁₋₆ 烷基)、-P(=O)(C₁₋₆ 烷基)₂、-OP(=O)(C₁₋₆ 烷基)₂、-OP(=O)(OC₁₋₆ 烷基)₂、C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 全卤烷基、C₂₋₆ 烯基、C₂₋₆ 炔基、C₃₋₁₀ 碳环基、C₆₋₁₀ 芳基、3-10 元杂环基、5-10 元杂芳基；或两个成对 R^{gg} 取代基可接合形成=O或=S；

[0144] 其中 X⁻ 是抗衡离子。

[0145] 如本文所用术语“羟基(hydroxyl)”或“羟基(hydroxy)”是指基团-OH。广义来说，术语“经取代羟基(substituted hydroxyl)”或“经取代羟基(substituted hydroxy)”是指其中直接附接到母体分子的氧原子经除氢以外的基团取代的羟基，且包括选自以下的基团：-OR^{aa}、-ON(R^{bb})₂、-OC(=O)SR^{aa}、-OC(=O)R^{aa}、-OCO₂R^{aa}、-OC(=O)N(R^{bb})₂、-OC(=NR^{bb})R^{aa}、-OC(=NR^{bb})OR^{aa}、-OC(=NR^{bb})N(R^{bb})₂、-OS(=O)R^{aa}、-OSO₂R^{aa}、-OSi(R^{aa})₃、-OP(R^{cc})₂、-OP(R^{cc})₃、-OP(=O)₂R^{aa}、-OP(=O)(R^{aa})₂、-OP(=O)(OR^{cc})₂、-OP(=O)₂N(R^{bb})₂ 和 -OP(=O)(NR^{bb})₂，其中 R^{aa}、R^{bb} 和 R^{cc} 如本文中所定义。

[0146] 如本文所用术语“硫醇基”或“硫醇”是指基团-SH。广义来说，术语“经取代硫醇基”或“经取代硫醇”是指其中直接附接到母体分子的硫原子经除氢以外的基团取代的硫醇基，且包括选自以下的基团：-SR^{aa}、-S=SR^{cc}、-SC(=S)SR^{aa}、-SC(=O)SR^{aa}、-SC(=O)OR^{aa} 和 -SC(=O)R^{aa}，其中 R^{aa} 和 R^{cc} 如本文中所定义。

[0147] 如本文所用术语“氨基”是指基团-NH₂。广义来说，术语“经取代氨基”是指如本文所定义的单取代氨基、双取代氨基或三取代氨基。在某些实施例中，“经取代氨基”是单取代氨基或双取代氨基。

[0148] 如本文所用术语“单取代氨基”是指其中直接附接到母体分子的氮原子经一个氢和一个除氢以外的基团取代的氨基，且包括选自以下的基团：-NH(R^{bb})、-NHC(=O)R^{aa}、-NHCO₂R^{aa}、-NHC(=O)N(R^{bb})₂、-NHC(=NR^{bb})N(R^{bb})₂、-NHSO₂R^{aa}、-NHP(=O)(OR^{cc})₂ 和 -NHP(=O)(NR^{bb})₂，其中 R^{aa}、R^{bb} 和 R^{cc} 如本文中所定义，且其中基团-NH(R^{bb})的 R^{bb} 不是氢。

[0149] 如本文所用术语“双取代氨基”是指其中直接附接到母体分子的氮原子经两个除氢以外的基团取代的氨基，且包括选自以下的基团：-N(R^{bb})₂、-NR^{bb}C(=O)R^{aa}、-NR^{bb}CO₂R^{aa}、-NR^{bb}C(=O)N(R^{bb})₂、-NR^{bb}C(=NR^{bb})N(R^{bb})₂、-NR^{bb}SO₂R^{aa}、-NR^{bb}p(=O)(OR^{cc})₂ 和 -NR^{bb}p(=O)(NR^{bb})₂，其中 R^{aa}、R^{bb} 和 R^{cc} 如本文中所定义前提是直接附接到母体分子的氮原子不经氢取代。

[0150] 如本文所用术语“三取代氨基”是指其中直接附接到母体分子的氮原子经三个基团取代的氨基，且包括选自以下的基团：-N(R^{bb})₃ 和 -N(R^{bb})₃⁺X⁻，其中 R^{bb} 和 X⁻如本文中所定义。

[0151] 如本文所用术语“氧代基”是指基团=O，且术语“硫代基(thiooxo)”是指基团=

S。

[0152] 如本文所用的“抗衡离子”是与带正电荷的季胺相连以维持电中性的带负电荷的基团。实例性抗衡离子包括卤离子（例如， F^- 、 Cl^- 、 Br^- 、 I^- ）、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 OH^- 、 $H_2PO_4^-$ 、 HSO_4^- 、磺酸根离子（例如，甲烷磺酸根、三氟甲烷磺酸根、对甲苯磺酸根、苯磺酸根、10-樟脑磺酸根、萘-2-磺酸根、萘-1-磺酸-5-磺酸根、乙烷-1-磺酸-2-磺酸根等）和羧酸根离子（例如，乙酸根、醋酸根、丙酸根、苯甲酸根、甘油酸根、乳酸根、酒石酸根、羟乙酸根等）。

[0153] 如果化合价允许，氮原子可经取代或未经取代，且包括伯氮、仲氮、叔氮和季氮原子。实例性氮原子取代基包括（但不限于）氢、 $-OH$ 、 $-OR^{aa}$ 、 $-N(R^{cc})_2$ 、 $-CN$ 、 $-C(=O)R^{aa}$ 、 $-C(=O)N(R^{cc})_2$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{bb})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2R^{cc}$ 、 $-SO_2OR^{cc}$ 、 $-SOR^{aa}$ 、 $-C(=S)N(R^{cc})_2$ 、 $-C(=O)SR^{cc}$ 、 $-C(=S)SR^{cc}$ 、 $-P(=O)_2R^{aa}$ 、 $-P(=O)(R^{aa})_2$ 、 $-P(=O)_2N(R^{cc})_2$ 、 $-p(=O)(NR^{cc})_2$ 、 C_{1-10} 烷基、 C_{1-10} 全卤烷基、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，或两个附接到 N 原子的 R^{cc} 基团接合形成 3-14 元杂环基或 5-14 元杂芳基环，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代，且其中 R^{aa} 、 R^{bb} 、 R^{cc} 和 R^{dd} 如上文所定义。

[0154] 在某些实施例中，存于氮原子上的取代基是氨基保护基团。氨基保护基团包括（但不限于） $-OH$ 、 $-OR^{aa}$ 、 $-N(R^{cc})_2$ 、 $-C(=O)R^{cc}$ 、 $-C(=O)N(R^{cc})_2$ 、 $-CO_2R^{aa}$ 、 $-SO_2R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})R^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})OR^{aa}$ 、 $-C(=NR^{cc})N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2N(R^{cc})_2$ 、 $-SO_2R^{cc}$ 、 $-SO_2OR^{cc}$ 、 $-SOR^{aa}$ 、 $-C(=S)N(R^{cc})_2$ 、 $-C(=O)SR^{cc}$ 、 $-C(=S)SR^{cc}$ 、 C_{1-10} 烷基（例如，芳烷基、杂芳烷基）、 C_{2-10} 烯基、 C_{2-10} 炔基、 C_{3-10} 碳环基、3-14 元杂环基、 C_{6-14} 芳基和 5-14 元杂芳基，其中每一烷基、烯基、炔基、碳环基、杂环基、芳烷基、芳基和杂芳基独立地经 0、1、2、3、4 或 5 个 R^{dd} 基团取代，且其中 R^{aa} 、 R^{bb} 、 R^{cc} 和 R^{dd} 如本文中所定义。氨基保护基团为业内所熟知且包括那些在以下文献中详细阐述者：有机合成中的保护基团 (Protecting Groups in Organic Synthesis)，T. W. 格林 (T. W. Greene) 和 P. G. M. 伍兹 (P. G. M. Wuts)，第 3 版，约翰威利父子公司，1999，其是以引用方式并入本文中。

[0155] 这些和其它实例性取代基更详细地阐述于实施方式、实例和权利要求书中。上述实例性取代基列表不打算以任何方式限制本发明。

[0156] 如本文所用术语“盐”或“医药上可接受的盐”是指那些在正确医学判断范畴内适用于与人类和低等动物的组织接触而不会产生过度毒性、刺激、过敏反应等且与合理的效益/风险比相称的盐。医药上可接受的盐为业内所熟知。例如，S. M. 伯奇 (S. M. Berge) 等人在医药科学杂志 (J. Pharmaceutical Sciences)，1977，66，1-19 中详细阐述医药上可接受的盐。本发明化合物的医药上可接受的盐包括那些从适宜的无机和有机酸和碱衍生的盐。医药上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸（例如，盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸及高氯酸）或与有机酸（例如，乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸）或通过使用业内所用的其它方法（例如，离子交换）形成的盐。其它医药上可接受的盐包括己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双

羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3- 苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。从适当碱衍生的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐和 $N^+(C_{1-4} \text{ 烷基})_4$ 盐。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等。在适宜时,其它医药上可接受的盐包括使用诸如以下等抗衡离子形成的无毒铵、季铵和胺阳离子:卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低碳烷基磺酸根和芳基磺酸根。

[0157] 如本文所用术语“前药”是指母体化合物的衍生物,其需要在体内转换以释放母体化合物。在某些情形中,前药具有相对于母体化合物改良的物理和 / 或递送性质。前药通常经设计以增强与母体化合物相关的医药和 / 或药物代谢动力学性质。前药的优点可在于其物理性质,例如在生理 pH 下对于非经肠投与与母体化合物相比增强的水溶性,或其促进从消化道吸收,或其可增强用于长期储存的药物稳定性。

[0158] 如本文所用术语“互变异构体”是指化合物的具体异构体,其中氢和双键已相对于分子中的其它原子改变位置。对于一对要存在的互变异构体,其必须有互变机制。互变异构体的实例包括酮-烯醇形式、亚胺-烯胺形式、酰胺-亚胺醇形式、脒-胺啶形式、亚硝基-肟形式、硫酮-烯硫醇形式、N-亚硝基-羟基偶氮形式、硝基-酸式硝基形式和吡啶酮-羟基吡啶形式。

[0159] 如本文所用的“无细胞”是指实质上不含完整细胞的组合物。所属领域技术人员可理解,在裂解后一定比例的细胞可能是完整的,例如小于 10%、小于 5%、小于 2%、小于 1% 或小于 0.5%。

[0160] 如本文所用的“蛋白质”包含通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。如本文所使用的所述术语是指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。通常,蛋白质长为至少三个氨基酸。蛋白质可是指个别蛋白质或蛋白质的集合。本发明蛋白质优选地只含有天然氨基酸,但可以替代方式采用业内已知的非天然氨基酸(即,自然界中不存在但可纳入多肽链中的化合物)和 / 或氨基酸类似物。同样,本发明蛋白质中的一个或一个以上氨基酸可通过(例如)添加诸如以下等化学实体来修饰:碳水化合物基团、羟基、磷酸酯基、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、用于偶联、官能化或其它修饰的连接体等。蛋白质还可为单一分子或可为多分子复合体。蛋白质可仅为天然蛋白质或肽的片段。蛋白质可为天然、重组或合成蛋白质或其任一组合。

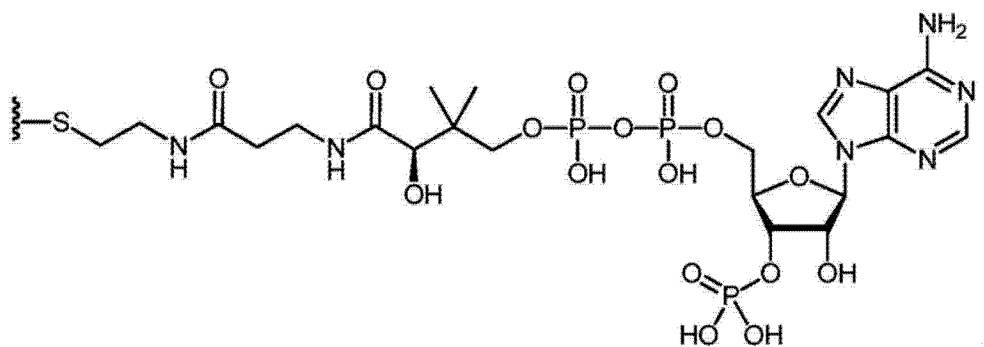
[0161] 如本文所用的“核酸”是指核苷酸聚合物。所述聚合物可包括天然核苷(即,腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)、核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤、4-乙酰基胞苷、5-(羧基羟甲基)尿苷、二氢尿苷、甲基假尿苷、1-甲基腺苷、1-甲基鸟苷、N6-甲基腺苷和 2-硫代胞苷)、经化学修饰的碱基、经生物修饰的碱基(例如,甲基化碱基)、嵌入碱基、经修饰糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、2'-O-甲基胞苷、阿拉伯糖和己糖)或经修饰磷酸酯基(例如,硫代磷酸酯键联和 5'-N-亚林酰胺键联)。

[0162] 如本文所用的“同工酶”是指氨基酸序列不同但催化相同化学反应或从起始材料产生相同反应产物的酶。

[0163] 如本文所用的“离去基团”是业内已知术语,其是指在异裂键裂解中带着一对电子离去的分子片段,其中所述分子片段是阴离子或中性分子。例如,参见史密斯、马奇,高级有机化学 (Advanced Organic Chemistry),第 6 版 (501-502)。实例性离去基团包括(但不限于)卤基(例如,氯、溴、碘)和经磺酰基取代的羟基(例如,甲苯磺酰基、甲磺酰基、苯磺酰基)。

[0164] “辅酶 A 单价基团”(-S-CoA) 是指具有下式的基团:

[0165]



[0166] 或其盐。

附图说明

[0167] 图 1 绘示本发明无细胞工艺的一般示意图:使酶在大肠杆菌细胞中过表达(活体内步骤);裂解大肠杆菌细胞以提供细胞裂解物;和使用细胞裂解物产生碳青霉烯(离体步骤)。

[0168] 图 2A 绘示所提出的从任选地经取代的谷氨酸(“谷氨酸化合物”)酶促产生任选地经取代的谷氨酸半醛(“谷氨酸半醛化合物”)(步骤 a-b,表 1)。谷氨酸半醛化合物可自发原位环化形成吡咯化合物。

[0169] 图 2B 绘示可遵循图 2A 中所绘示的方法产生的实例性谷氨酸半醛化合物和吡咯化合物。

[0170] 图 3 绘示两个用于酶促产生 3-羟基-谷氨酸半醛的替代性途径(步骤 a、b、c、g、h、i 和/或 j)。

[0171] 图 4 绘示从葡萄糖酶促产生任选地经取代的 CoA 化合物(步骤 c-f)。

[0172] 图 5A 和 5B 绘示从谷氨酸半醛化合物和辅酶 A (CoA) 化合物酶促产生碳青霉烯。所述工艺利用来自噻烯霉素和/或碳青霉烯生物合成路径二者的酶(步骤 1-3)。大肠杆菌可经改造以在大肠杆菌的壁膜间隙中产生关键入口酶羧甲基-Pro 合酶(CarB、ThnE 或其同工酶)。

[0173] 图 6A 绘示 C6 侧链的酶促衔接,和后续的 C6 乙基的酶促羟基化以提供实例性碳青霉烯。

[0174] 图 6B 绘示 C2 侧链的酶促衔接,和后续的 C6 乙基的可选酶促羟基化以提供实例性碳青霉烯(步骤 4-5)。

[0175] 图 7 绘示在 R⁵ 是 -OH 时式 (I) 的烯醇-酮互变异构,和后续的 C6 乙基的可选酶促羟基化以提供实例性碳青霉烯(步骤 5)。

[0176] 图 8 绘示通过捕获烯醇形式化学附接 C2 侧链,之后用 SHR⁸ 处理以通过串联迈克尔 (Michael) 加成-消除反应来提供碳青霉烯。

[0177] 图 9A-9H 绘示遵循本发明方法从(例如)以下物质产生碳青霉烯骨架:谷氨酸半醛和丙二酰基-CoA(图 9A)或乙基丙二酰基-CoA(图 9B)、4-甲基谷氨酸半醛和乙基丙二酰基-CoA(图 9C)或丙二酰基-CoA(图 9F)、3-羟基谷氨酸半醛和乙基丙二酰基-CoA(图 9D)或丙二酰基-CoA(图 9G)、3-羟基-4-甲基-谷氨酸半醛和乙基丙二酰基-CoA(图 9E)或丙二酰基-CoA(图 9H)。谷氨酸半醛化合物可自发原位环化形成吡咯化合物(未显示)。

[0178] 图 10 绘示从裂解物中的经取代谷氨酸和乙基丙二酰基-CoA 产生经取代羧甲基脯氨酸 (CMP),所述产生含有 ProB、ProA 和 CarB 活性 (A) 以及 LC/MS/MS 表征 (B)。

[0179] 图 11 绘示从裂解物中的经取代谷氨酸和丙二酰基-CoA 产生经取代碳青霉烯,所述产生含有 ProB、ProA、CarB 和 CarA 活性 (A) 以及 LC/MS/MS 表征 (B)。

[0180] 图 12 绘示从裂解物中的经取代谷氨酸和丙二酰基-CoA 产生经取代碳青霉烯,所述产生含有 ProB、ProA、CarB、CarA 和 CarC 活性 (A) 以及 LC/MS/MS 表征 (B)。

[0181] 图 13A 绘示从脯氨酸化合物通过与脯氨酸 3-羟化酶(步骤 k)和/或脯氨酸氧化酶(步骤 m)接触产生吡咯 CarB 底物。

[0182] 图 13B 绘示实例性吡咯化合物,其可遵循图 13A 中绘示的方法从脯氨酸化合物产生。

[0183] 图 13C 绘示从 (S)-和 (R)-脯氨酸通过与脯氨酸 3-羟化酶(步骤 k)和脯氨酸氧化酶(步骤 m)接触酶促合成顺式和反式 3-羟基-3,4-二氢-2H-吡咯-2-甲酸。

[0184] 图 13D 绘示从吡咯化合物和辅酶 A 化合物酶促产生碳青霉烯。所述工艺利用来自噻烯霉素和/或碳青霉烯生物合成路径二者的酶(步骤 1-3)。大肠杆菌可经改造以在大肠杆菌的壁膜间隙中产生关键入口酶羧甲基-Pro 合酶 (CarB、ThnE 或其同工酶)。

[0185] 图 14 绘示从裂解物中的顺式-或反式-3-羟基-脯氨酸和丙二酰基-CoA 产生羟化羧甲基脯氨酸 (CMP) 化合物,所述产生含有各种量的脯氨酸氧化酶 PutA(大肠杆菌)和 CarB(胡萝卜果胶杆菌 (*P. carotovorum*))。

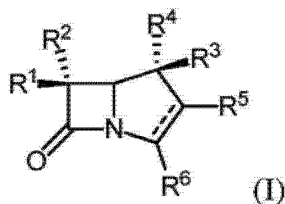
具体实施方式

[0186] 历史上,无细胞系统已提供利用复杂生物系统的天然能力的有用工具。已显示无细胞蛋白质合成系统 (CFPS) 可提供有前景的用于合成在活体内难以制备的蛋白质的平台,所述蛋白质包括患者特异性候选疫苗和医药蛋白质。例如,参见杨 (Yang) 等人,生物技术与生物工程 (Biotechnol. Bioeng.) (2005) 89:503-511;和格克 (Goerke) 等人,生物技术与生物工程 (2008) 99:351-367。尽管有这些有前景的应用,但 CFPS 因其不能生成蛋白质合成所需的能量而受限,且需要昂贵能量底物的连续进料。已使用通过磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 和类似化合物驱动的一步式磷酸化反应来供应长寿蛋白质合成所需的能量,但此工艺因仅生成用于有限持续时间的猝发 ATP 同时生成抑制性磷酸盐而不是很有效。例如,参见斯瓦茨 (Swartz),工业分子生物学与生物技术杂志 (J. Ind. Microbiol. Biotechnol.) (2006) 33:476-485。最近,研究者已用稳定氨基酸供应并活化中间代谢以及氧化磷酸化以显著降低底物成本并简化无细胞按比例增加的无细胞系统解决了这些问题。例如,参见卡尔霍恩 (Calhoun) 等人,生物技术杂志 (J. Biotechnol.) (2006) 123:193-203;米歇尔-雷

代莱 (Michel-Reydellet) 等人, 代谢工程 (Metabolic Engineering) (2004) 6 :197-203 ; 朱伊特 (Jewett) 等人, 分子系统生物学 (Mol. Syst. Biol.) (2008) 4 :220 ; 和卡尔霍恩等人, 生物技术与生物工程 (Biotechnology and Bioengineering) (2005) 90 :606-613。这些系统适于无细胞产生诸如莽草酸等小有机分子。例如, 参见 PCT 公开案 W02010/074760。无细胞合成利用无细胞反应的开放性且相对于基于化学合成与发酵的化学产生方法二者具有显著优点, 包括 : i) 能产生具有高度细胞毒性的化学物质, 例如抗生素 ; ii) 能将所有碳分流到目标化学产物, 从而提高生产率 ; iii) 能更有效地控制还原当量和电子载体再循环的通量 ; iv) 能直接添加生物合成底物 ; 和 / 或 v) 用于更有效地收获产物和快速按比例增加的潜力。无细胞系统可将细胞的大部分 (如果不是全部) 代谢资源引导到一个路径的专有产生中。此外, 缺少活体外细胞壁由于容许控制合成环境而是有利的。由于不用考虑细胞生长或活力, 还可以大于活体内的灵活性改变氧化还原电位、pH 或离子强度。此外, 可更易于直接回收产物。

[0187] 本发明寻求从这些尝试性努力构建用于生成式 (I) 化合物,

[0188]



[0189] 或其盐或互变异构体, 或其组合的方法 ;

[0190] 其中 :

[0191] R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组 : 氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基 ;

[0192] R^5 选自由以下组成的群组 : 氢、 $-OR^8$ 、 $-SR^8$ 、 $-S(=O)R^8$ 、 $-S(=O)_2R^8$ 和 $-N(R^8)_2$, 其中 R^8 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组 : 氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基、 $-C(=O)R^{8a}$ 、 $-C(=O)OR^{8a}$ 、 $-C(=O)SR^{8a}$ 、 $-C(=O)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=NR^{8b})R^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})OR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})SR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=S)R^{8a}$ 、 $-C(=S)OR^{8a}$ 、 $-C(=S)SR^{8a}$ 、 $-C(=S)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=O)NR^{8b}SO_2R^{8a}$ 、 $-S(=O)R^{8a}$ 、 $-SO_2R^{8a}$ 、 $-SO_2N(R^{8a})_2$ 、 $-Si(R^{8a})_3$ 、 $-P(=O)(R^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{8a})_2$ 、 $-p(=O)(R^{8a})(OR^{8a})$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(N(R^{8b})_2)$ 、 $-P(=O)(N(R^{8b})_2)_2$ 、 $-P(=O)_2R^{8a}$ 、 $-P(=O)_2OR^{8a}$ 、 $-P(=O)_2N(R^{8b})_2$ 、 $-B(R^{8a})_2$ 、 $-B(OR^{8a})_2$ 和 $-BR^{8a}(OR^{8a})$, 其中如果氧保护基团附接到氧原子, 且如果硫保护基团附接到硫原子, 那么 R^{8a} 选自由以下组成的群组 : 任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基, 或两个 R^{8a} 基团或 R^{8a} 与 R^{8b} 基团接合形成任选地经取代的杂环 ; 且 R^{8b} 在每一情况中独立地选自由以下组成的

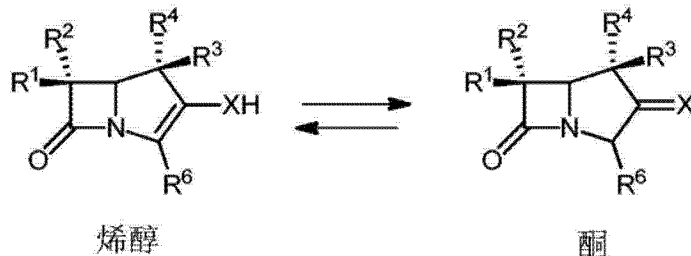
群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团，或两个 R^{8b} 接合形成任选地经取代的杂环；

[0193] R^6 选自由以下组成的群组：任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和 $-C(=O)R^7$ ，其中 R^7 在每一情况中选自氢、 $-OR^{7a}$ 、 $-SR^{7a}$ 或 $-N(R^{7b})_2$ ，其中如果氧保护基团附接到氧原子，且如果硫保护基团附接到硫原子，那么 R^{7a} 选自由以下组成的群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基；且 R^{7b} 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组：氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团，或两个 R^{7b} 接合形成任选地经取代的杂环；且

[0194] $\equiv$ 代表单键或双键。

[0195] 应理解，在 $\equiv$ 代表双键且 R^5 是 OH、SH 或 NHR^8 时，式 (I) 化合物可以至少两种互变异构体（即，烯醇和酮形式）的混合物形式存在：

[0196]



[0197] 其中 X 是 O、S 或 NR^8 。

[0198] 在一个方面中，所述方法包含提供经改造以表达一种或一种以上能从葡萄糖、甘氨酸和 / 或式 (i) 化合物的组合生成本发明碳青霉烯的酶的细胞或细胞群组。在某些实施例中，这些酶中的一个或一个以上是在细胞裂解前在细胞质中发现。在某些实施例中，这些酶中的一个或一个以上在细胞裂解前隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中，裂解细胞或细胞群组以提供细胞裂解物，其包含从细胞质和任选地壁膜间隙释放的酶的混合物。在某些实施例中，随后向含酶细胞裂解物“进给”葡萄糖、甘氨酸和 / 或式 (i) 化合物以生成如本文所述的碳青霉烯。在某些实施例中，所述工艺进一步涵盖一个或一个以上其它化学和 / 或酶促步骤以提供众多种碳青霉烯，例如由式 (I) 涵盖的化合物。

[0199] 在另一方面中，所述方法包含提供经改造以表达一种或一种以上能从葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物的组合生成如本文所述的碳青霉烯的酶的细胞或细胞群组。在某些实施例中，这些酶中的一个或一个以上是在裂解间隙前在细胞质中发现。在某些实施例中，这些酶中的一个或一个以上隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中，裂解细胞或细胞群组以提供

细胞裂解物,其包含从细胞质和任选地壁膜间隙释放的酶的混合物。在某些实施例中,随后向含酶细胞裂解物“进给”葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物以生成如本文所述的碳青霉烯。在某些实施例中,所述工艺进一步涵盖一个或一个以上其它化学和 / 或酶促步骤以提供众多碳青霉烯,例如由式 (I) 涵盖的化合物。

[0200] 在表 1 和 2 中提供与本发明的各个方面相关的代表性酶。在一些实施例中,表 1 中提供的一种或一种以上酶是在生物体中表达。在一些实施例中,表 2 中提供的一种或一种以上酶是在生物体中表达。表 1 和 2 打算可用于执行本发明的一个或一个以上步骤的酶的非限制性实例。还预期能引发相同反应或从起始材料产生相同反应产物的其它酶(例如其同工酶)以用于执行本发明的一种或一种以上方法。

[0201]

表 1.						
Rxn	说明	生物体	EC	基因库 (GenBank)	Uniprot	酶
a	激酶	大肠杆菌	2.7.2.11	AAC73346.1	P0A7B5	ProB
b	脱氢酶	大肠杆菌	1.2.1.41	AAC73347.1	P07004	ProA
						γ -谷氨酰基 激酶-GP-还 原酶多酶复 合体(ProB + ProA)
c	糖酵解; 乙酰基	大肠杆菌	2.7.1.2	AAC75447.1	P0A6V8	Glk

[0202]

表 1.

Rxn	说明	生物体	EC	基因库 (GenBank)	Uniprot	酶
	-CoA 生物合成 多酶		5.3.1.9	AAC76995.1	P0A6T1	Pgi
			2.7.1.11	AAC76898.1	P0A796	PfkA
			4.1.2.13	AAC75962.1	P0AB71	Fba
			5.3.1.1	AAC76901.1	P0A858	TpiA
			1.2.1.12	AAC74849.1	P0A9B2	GapA
			2.7.2.3	AAC75963.1	P0A799	Pgk
			5.4.2.1	AAC73842.1	P62707	GpmA
			4.2.1.11	AAC75821.1	P0A6P9	Eno
			2.7.1.40	AAC74924.1	P21599	PykA
			2.7.1.40	AAC74746.1	P0AD61	PykF
			1.2.4.1	AAC73225.1	P0AFG8	AceE
			2.3.1.12	AAC73226.1	P06959	AceF
d	乙酰基-CoA 乙 酰基-转移酶	球形红杆菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>), 在大肠杆菌中 表达/具有活性 (生物科学与生 物工程杂志(<i>J. Biosci. Bioeng.</i>) (2007) 103:38).	2.3.1.9	ABA79923.1	Q3IZW1	PhaA
e	β -氧化多酶(S- 水合酶和 3-羟 基酰基-CoA 脱 氢酶活性)	大肠杆菌		AAC76849.1	P21177	FadB

[0203]

表 1.

Rxn	说明	生物体	EC	基因库 (GenBank)	Uniprot	酶
f	巴豆酰基-CoA 还原酶	球形红杆菌, 在大肠杆菌中 表达/具有活性 (美国国家科学 院院刊(<i>PNAS</i>) (2007) 104:10631).	1.3.1.85	ACJ71669.1	B8XVS5	Ccr
g	乙酰基-CoA 羧 化酶	大肠杆菌	6.4.1.2	AAC73296.1	POABD5 POABD8 P24182 POA9Q5	AccA、AccB、 AccC、AccD ("AccABCD" 复合体)
h	丙二酰基-CoA 还原酶	超嗜热古菌 (<i>Sulfolobus tokodaii</i>), 在大 肠杆菌中表达 (细菌学杂志(<i>J. Bacteriol.</i>) (2006) 188:8551).	1.2.1.75	BAB67276.1	Q96YK1	Mcr
i	苏氨酸醛缩酶	大肠杆菌, 对 琥珀酸半醛具 有活性(四面体 (2008) 64:5079).	4.1.2.	AAC73957.1	P75823	LtaE
j	β -丙氨酸转氨 酶	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>),	2.6.1.18		P28269	β -丙氨酸转 氨酶

[0204]

表 1.

Rxn	说明	生物体	EC	基因库 (GenBank)	Uniprot	酶
k	脯氨酸 3-羟化酶	链霉菌 (<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i>)	1.14.11.28	BAA22406.1	P96010	P3H1
m	脯氨酸氧化酶	大肠杆菌	1.5.99.8	AAB59985.1	P09546	PutA

[0205] * 替代性酶

[0206]

表 2.

Rxn	说明	生物体	基因库	Uniprot	酶
1	CMP 合酶	胡萝卜果胶杆菌; (例如, 参见哈密德(Hamed)等人, 化学与生物化学 (<i>Chembiochem</i>) (2009) 10:246–250); 在大肠杆菌中表达(例如, 参见斯利曼(Sleeman)等人, 生物化学杂志(<i>J. Biol. Chem.</i>) (2004) 279:6730–6736)	AAD38230.1	Q9XB60	CarB
1*	CMP 合酶*	卡特利链霉菌; 在大肠杆菌中表达(例如, 参见哈密德等人, 化学与生物化学 (2009) 10:246–250)	CAD18973.1	Q83XP9	ThnE*
2	碳青霉烷合成酶	胡萝卜果胶杆菌 在大肠杆菌中表达(例如, 参见斯利曼等人, 生物化学杂志 (2004) 279:6730–6736)	AAD38229.1	Q9XB61	CarA

[0207]

表 2.

Rxn	说明	生物体	基因库	Uniprot	酶
2*	β -内酰胺合成酶*	卡特利链霉菌 ThnM， 与棒状链霉菌(<i>S. clavuligerus</i>) β -内酰胺合成酶 53%相似(化学与生物学(<i>Chem & Biol.</i>) (2003) 10:301)	CAD18981.1	Q83XP1	ThnM*
3	碳青霉烯合酶	胡萝卜果胶杆菌； (例如，参见赖德尔等人，四面体通讯(1982) 23:2293-2296)；在大肠杆菌中表达(例如，参见斯德潘(Stapon)等人，美国化学学会会志(2003) 125:15746-15747)	AAD38231.1	Q9XB59	CarC
3*	碳青霉烯合酶*	卡特利链霉菌；在大肠杆菌中表达(例如，参见博德纳(<i>Bodner</i>)等人， <i>JACS</i> (2009) 131:14345-14354)	CAD18975.1	Q83XP7	ThnG*
4	假想转移酶	卡特利链霉菌；与大肠杆菌谷胱甘肽转移酶 54%相似(例如，参见努涅斯(<i>Nunez</i>)等人，化学与生物学(<i>Chem. Biol.</i>) (2003) 10:301-311)	CAD18990.1	Q83XN2	ThnV

[0208]

表 2.

Rxn	说明	生物体	基因库	Uniprot	酶
5	加氧酶	卡特利链霉菌(ThnQ); 加氧酶还可与步骤 2 或 3 的一种产物反应(例 如, 参见博德纳等人, 美国化学学会会志 (2010) 132:12-13); 在大 肠杆菌中表达(例如, 参 见博德纳等人, <i>JACS</i> (2009) 131:14345-14354)	CAD18985.1	Q83XN7	ThnQ
5*	加氧酶*				2-酮戊二酸 和 Fe(II)-依 赖性加氧酶 超家族的酶*
6	假想甲基转移 酶	卡特利链霉菌	AEW99097.1	F8JNE0	ThnL
6*	假想甲基转移 酶*	卡特利链霉菌	AEW99093.1	F8JNE4	ThnP*
6*	假想甲基转移 酶*	卡特利链霉菌	AEW99098.1	F8JND9	ThnK*

[0209] * 替代性酶

[0210] 如本文所用的“糖酵解 / 乙酰基 -CoA 生物合成多酶”是指一组选自以下组成的群组的酶: Glk、Pgi、PfkA、Fba、Tpi、GabP、Pgk、GpmA、Eno、PykA、PykF、AceE、AceF 和其亚组。这些酶中任一者的同工酶也涵盖在“糖酵解 / 乙酰基 -CoA 生物合成多酶”的范围内。应理解, 这个具体酶列表是一组可用于执行步骤 (c) 的酶的非限制性实例。其它组酶可用于执行这个具体步骤且预期涵盖在“糖酵解 / 乙酰基 -CoA 生物合成多酶”的范围内。

[0211] 在某些实施例中, 一种或一种以上酶是在细胞的细胞质中表达且在裂解前任选地隔离在细胞质中。在某些实施例中, 一种或一种以上酶是在壁膜间隙中表达且任选地隔离在壁膜间隙中。列示于表 1 和 2 中的实例性酶可在表达后被隔离在细胞质或壁膜间隙中, 或可被隔离在其它地方。在某些实施例中, 表 2 中提供的至少一种酶被隔离在壁膜间隙中。

酶在壁膜间隙中的隔离为业内已知,例如,参见 PCT 申请案第 PCT/US2011/035639 号,其是以引用方式并入本文中。在裂解细胞以提供细胞裂解物后,所隔离可自由地与一种或一种以上同样存于所述裂解物或不同裂解物中的底物反应。

[0212] 在某些实施例中,表 1 中提供的一种或一种以上酶是在细胞质中表达且任选地隔离在细胞质中。在某些实施例中,一种或一种以上选自以下组成的群组的酶是在细胞质中表达且在裂解细胞之前任选地隔离在细胞质中:激酶(例如, γ -谷氨酰基激酶,例如来自大肠杆菌脯氨酸生物合成(ProB)或其同工酶)、脱氢酶(例如,Glu-5-P 脱氢酶,例如来自大肠杆菌脯氨酸生物合成(ProA)或其同工酶);糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶(例如,Glk、Pgi、PfkA、Fba、Tpi、GabP、Pgk、GpmA、Eno、PykA、PykF、AceE 和/或 AceF 或其同工酶);乙酰基-CoA 乙酰基转移酶(例如,来自球形红杆菌(PhaA)或其同工酶); β -氧化多酶(例如,来自大肠杆菌(FadB)或其同工酶);巴豆酰基-CoA 还原酶(例如,来自球形红杆菌(Ccr)或其同工酶);乙酰基-CoA 羧化酶(例如,来自大肠杆菌(AccABCD)或其同工酶);丙二酰基-CoA 还原酶(例如,来自超嗜热古菌,在大肠杆菌中表达(Mcr)或其同工酶);苏氨酸醛缩酶(例如,在大肠杆菌中表达(LtaE)或其同工酶); β -丙氨酸转移酶;脯氨酸 3-羟化酶(例如,P3H1 或其同工酶);脯氨酸氧化酶(例如,PutA 或其同工酶);和其同工酶。在某些实施例中,裂解细胞以提供细胞裂解物。

[0213] 在某些实施例中,表 2 中提供的一种或一种以上酶是在壁膜间隙中表达且任选地隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,一种或一种以上选自以下组成的群组的酶是在壁膜间隙中表达且在细胞裂解前任选地隔离在壁膜间隙中:羧甲基-Pro 合酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)(CarB)和/或来自卡特利链霉菌(ThnE)或其同工酶);碳青霉烷合成酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(CarA)或其同工酶); β -内酰胺合成酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnM)或其同工酶);碳青霉烯合酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(CarC)和/或来自卡特利链霉菌(ThnG)或其同工酶);转移酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnV)或其同工酶);加氧酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnQ)或其同工酶;或 2-酮戊二酸和/或 Fe(II)-依赖性加氧酶超家族的酶或其同工酶);和甲基转移酶(例如,ThnL、ThnP、ThnK 或其同工酶);和其同工酶。例如,在某些实施例中,羧甲基-Pro 合酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(CarB)和/或来自卡特利链霉菌(ThnE))或其同工酶被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,碳青霉烷合成酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(CarA))或其同工酶被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中, β -内酰胺合成酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnM))或其同工酶被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,碳青霉烯合酶(例如,来自胡萝卜果胶杆菌(CarC)和/或来自卡特利链霉菌(ThnG))或其同工酶被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,转移酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnV)或其同工酶)被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,加氧酶(例如,来自卡特利链霉菌(ThnQ);或 2-酮戊二酸和/或 Fe(II)-依赖性加氧酶超家族的酶或其同工酶)被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,甲基转移酶(例如,ThnL、ThnP、ThnK 或其同工酶)被隔离在壁膜间隙中。

[0214] 与本发明相关的方法涵盖来自任一类型细胞(例如原核细胞和真核细胞)的裂解物。在一些实施例中,所述细胞是细菌细胞,例如埃希氏菌(*Escherichia* spp.)、链霉菌、发酵单胞菌(*Zyomonas* spp.)、醋杆菌(*Acetobacter* spp.)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter* spp.)、集胞藻(*Synechocystis* spp.)、根瘤菌(*Rhizobium* spp.)、梭菌(*Clostridium*

spp.)、棒杆菌 (*Corynebacterium* spp.)、链球菌 (*Streptococcus* spp.)、黄单胞菌 (*Xanthomonas* spp.)、乳杆菌 (*Lactobacillus* spp.)、乳球菌 (*Lactococcus* spp.)、芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、产碱菌 (*Alcaligenes* spp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.)、气单胞菌 (*Aeromonas* spp.)、固氮菌 (*Azotobacter* spp.)、丛毛平胞菌 (*Comamonas* spp.)、分枝杆菌 (*Mycobacterium* spp.)、红球菌 (*Rhodococcus* spp.)、葡萄糖菌 (*Gluconobacter* spp.)、罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia* spp.)、酸硫杆菌 (*Acidithiobacillus* spp.)、小月菌 (*Microthrix* spp.)、地杆菌 (*Geobacter* spp.)、土芽孢杆菌 (*Geobacillus* spp.)、节杆菌 (*Arthrobacter* spp.)、黄杆菌 (*Flavobacterium* spp.)、沙雷菌 (*Serratia* spp.)、糖多孢菌 (*Saccharopolyspora* spp.)、栖热菌 (*Thermus* spp.)、狭长平胞菌 (*Stenotrophomonas* spp.)、色杆菌 (*Chromobacterium* spp.)、大豆根瘤菌 (*Sinorhizobium* spp.)、糖多孢菌、土壤杆菌 (*Agrobacterium* spp.) 和成团泛菌 (*Pantoea* spp.)。细菌细胞可为革兰氏阴性细胞,例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 细胞或革兰氏阳性细胞,例如芽孢杆菌。在其它实施例中,所述细胞是真菌细胞,例如酵母细胞,例如酵母 (*Saccharomyces* spp.)、裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces* spp.)、毕赤氏酵母 (*Pichia* spp.)、法夫酵母 (*Paffia* spp.)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces* spp.)、假丝酵母 (*Candida* spp.)、踝节菌 (*Talaromyces* spp.)、酒香酵母 (*Brettanomyces* spp.)、管囊酵母 (*Pachysolen* spp.)、德巴利酵母 (*Debaryomyces* spp.)、子囊菌酵母 (*Yarrowia* spp.) 和工业多倍体酵母株系。真菌的其它非限制性实例包括曲霉菌 (*Aspergillus* spp.)、青霉菌 (*Penicillium* spp.)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.)、根霉菌 (*Rhizopus* spp.)、支顶孢菌 (*Acremonium* spp.)、链孢霉菌 (*Neurospora* spp.)、粪壳菌 (*Sordaria* spp.)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe* spp.)、异水霉菌 (*Allomyces* spp.)、黑粉菌 (*Ustilago* spp.)、葡萄孢菌 (*Botrytis* spp.)、果胶杆菌 (*Pectobacterium* spp.) 和木霉菌 (*Trichoderma* spp.)。在其它实施例中,所述细胞是藻细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。应了解,与本发明相容的一些细胞可表达一种或一种以上与本发明相关的基因的内源拷贝以及重组拷贝。

[0215] 在某些实施例中,细胞裂解物是经改造以过表达一种或一种以上本文所述的酶的大肠杆菌细胞的裂解物。在某些实施例中,细胞裂解物是经改造以过表达一组酶(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或 20 种以上酶)的大肠杆菌细胞的裂解物。在某些实施例中,细胞裂解物是从 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 10 种以上各自经改造以过表达一种或一种以上酶的不同细胞(例如来自不同生物体)获得的不同细胞裂解物的组合(例如 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 10 种以上不同细胞裂解物的组合)。在一些实施例中,组合来自不同生物体的裂解物。例如,可将来自经改造大肠杆菌株系的裂解物与来自不同细菌株系(例如胡萝卜果胶杆菌(*CarABC* 基因的来源)株系)的裂解物和/或来自卡特利链霉菌(天然噻烯霉素产生者)的裂解物组合。在某些实施例中,组合不同经改造大肠杆菌株系(例如,过表达不同产生途径蛋白质)以优化酶水平,之后产生具有所有过表达蛋白质的单一经改造株系。

[0216] 另外预期一种或一种以上不同裂解物的组合,其包含如上文表 1 和 2 中所述的不同酶的表达或两种或两种以上酶的不同组合的表达。在某些实施例中,细胞裂解物是经改造以过表达一种或一种以上选自以下组成的群组的酶的细胞的裂解物:激酶(例如, γ -谷氨酰基激酶)、脱氢酶(例如,Glu-5-P 脱氢酶)、糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、

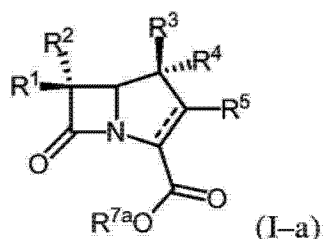
乙酰基 -CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基 -CoA 还原酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶、羧甲基 -Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶。在某些实施例中，一种或一种以上选自以下组成的群组的酶在裂解前存在于细胞质中：激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）、糖酵解 / 乙酰基 -CoA 生物合成多酶、乙酰基 -CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基 -CoA 还原酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、丙二酰基 -CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶和其同工酶。在某些实施例中，一种或一种以上选自以下组成的群组的酶在裂解前被隔离在细胞的壁膜间隙中：羧甲基 -Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶。

[0217] 用于生成碳青霉烯的无细胞系统

[0218] 如上文大概阐述，本发明提供通过以下方式生成众多种碳青霉烯的工艺：利用无细胞条件生成碳青霉烯，其可任选地进一步经酶促和 / 或化学处理以提供式 (I) 化合物。

[0219] 例如，在一个方面中，提供细胞裂解物，其包含一组能生成式 (I-a) 化合物的酶：

[0220]



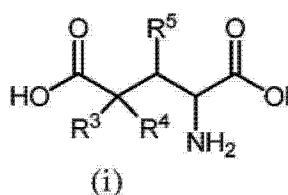
[0221] 或其盐或互变异构体或其组合；

[0222] 其是从以下物质生成：

[0223] (1) 葡萄糖和甘氨酸或其盐；和 / 或

[0224] (2) 葡萄糖和式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸：

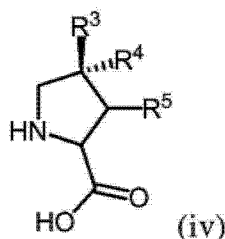
[0225]



[0226] 或其盐；和 / 或

[0227] (3) 葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物：

[0228]

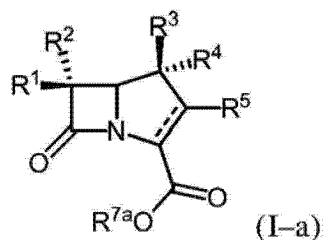


[0229] 其中 R^{7a} 是氢； R^5 选自以下组成的群组：氢、 $-OR^8$ 、 $-SR^8$ 和 $-N(R^8)_2$ ；====代表单键

或双键；且 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 如本文中所定义。

[0230] 在另一方面中，提供生成式 (I-a) 化合物的方法：

[0231]



[0232] 或其盐或互变异构体或其组合；

[0233] 所述方法包含：

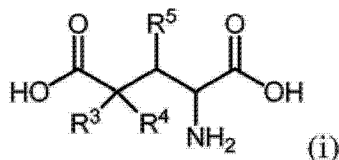
[0234] 提供包含一种或一种以上酶的细胞裂解物，其中所述酶选自以下组成的群组：激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）；糖酵解 / 乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶、羧甲基-Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶；

[0235] 其中使所述一种或一种以上细胞裂解物与以下物质接触：

[0236] (1) 葡萄糖和甘氨酸或其盐；和 / 或

[0237] (2) 葡萄糖和式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸：

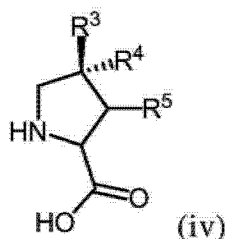
[0238]



[0239] 或其盐，和 / 或

[0240] (3) 葡萄糖和式 (iv) 脯氨酸化合物：

[0241]



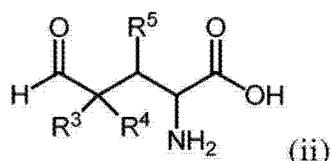
[0242] 和其盐；其中 R^{7a} 是氢； R^5 选自以下组成的群组：氢、 $-OR^8$ 、 $-SR^8$ 和 $-N(R^8)_2$ ；且 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 如本文中所定义。

[0243] 在某些实施例中，一种或一种以上选自以下组成的群组的酶在裂解前存于细胞的细胞质中：激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）、糖酵解 / 乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、 β -丙氨酸转移酶、脯氨酸 3-羟化酶、脯氨酸氧化酶和其同工酶。在某些实施例中，一种或一种以上选自以下组成

的群组的酶在裂解前被隔离在壁膜间隙中：羧甲基-Pro 合酶、碳青霉烷合成酶、 β -内酰胺合成酶、碳青霉烯合酶、转移酶、加氧酶、甲基转移酶和其同工酶。在某些实施例中，一种或一种以上细胞经遗传改造以表达上文所列示一种或一种以上酶中的任一者。在某些实施例中，上文所列示一种或一种以上酶中的任一者过表达，即以超过在未改造野生型细胞中发现的浓度水平表达。

[0244] 在某些实施例中，葡萄糖和甘氨酸在与一种或一种以上选自自由糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）和其同工酶组成的群组的酶接触后被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛：

[0245]

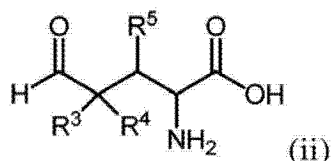


[0246] 或其盐（例如，3-羟基-谷氨酸半醛）。在某些实施例中，表达每一选自自由以下组成的群组的酶：糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 羧化酶、丙二酰基-CoA 还原酶、苏氨酸醛缩酶、激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）和脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）。

[0247] 或者，葡萄糖和甘氨酸在与一种或一种以上选自自由以下组成的群组的酶接触后被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛（例如，3-羟基-谷氨酸半醛）：糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、 β -丙氨酸转氨酶、苏氨酸醛缩酶、激酶（ γ -谷氨酰基激酶）、脱氢酶（Glu-5-P 脱氢酶）和其同工酶。例如，参见图 3。

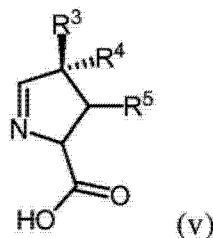
[0248] 在某些实施例中，式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛化合物：

[0249]



[0250] 或其盐环化形成式 (v) 吡咯化合物：

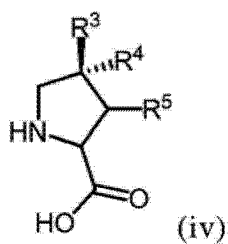
[0251]



[0252] 或其盐。水是这个反应的副产物。在某些实施例中，反应是在没有酶催化的情况下进行。

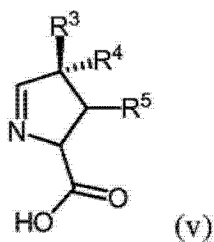
[0253] 在某些实施例中，式 (iv) 脯氨酸化合物：

[0254]



[0255] 或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为式 (v) 吡咯化合物：

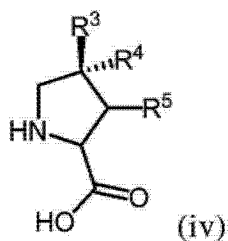
[0256]



[0257] 或其盐。

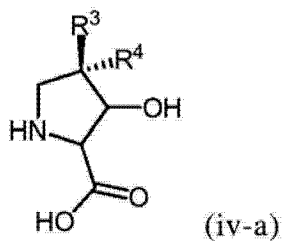
[0258] 在某些实施例中，式 (iv) 脯氨酸化合物：

[0259]



[0260] 或其盐，其中 R⁵ 为氢；在与脯氨酸-3-羟化酶接触后被酶促转化为下式的 3-羟化脯氨酸化合物：

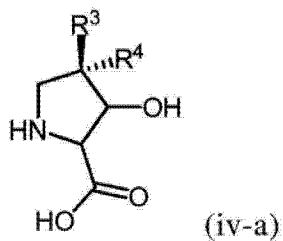
[0261]



[0262] 或其盐。

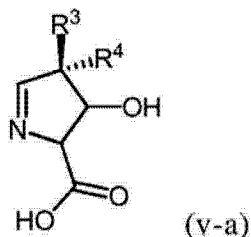
[0263] 在某些实施例中，下式的 3-羟化脯氨酸化合物：

[0264]



[0265] 或其盐在与脯氨酸氧化酶接触后被酶促转化为下式的 3-羟化吡咯化合物：

[0266]

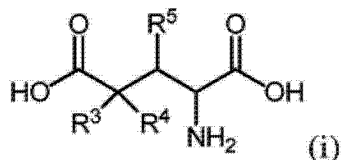


[0267] 或其盐。

[0268] 在某些实施例中,脯氨酸化合物选自由以下组成的群组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-甲基脯氨酸、3-羟基-4-甲基脯氨酸和其盐。在某些实施例中,吡咯化合物选自由以下组成的群组:3,4-二氢-2H-吡咯-2-甲酸、3-羟基-3,4-二氢-2H-吡咯-2-甲酸、4-甲基-3,4-二氢-2H-吡咯-2-甲酸、3-羟基-4-甲基-3,4-二氢-2H-吡咯-2-甲酸和其盐。在某些实施例中,脯氨酸化合物和吡咯化合物二者都是 L 异构体。

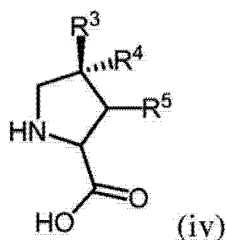
[0269] 在某些实施例中,式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸:

[0270]



[0271] 或其盐在与 γ -谷氨酰基激酶-GP-还原酶多酶复合体(例如,大肠杆菌 ProB 和 ProA)接触后被酶促转化为式 (iv) 脯氨酸化合物:

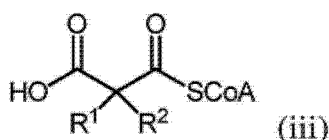
[0272]



[0273] 或其盐。

[0274] 在某些实施例中,葡萄糖被酶促转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物:

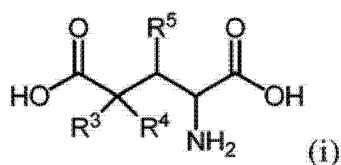
[0275]



[0276] 或其盐;其中 -SCoA 是辅酶 A 单价基团 ($-\text{SC}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{16}\text{P}_3$)。例如,参见图 4。在某些实施例中,葡萄糖在与一种或一种以上选自由以下组成的群组的酶接触后被转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物:糖酵解/乙酰基-CoA 生物合成多酶、乙酰基-CoA 乙酰基转移酶、 β -氧化多酶、巴豆酰基-CoA 还原酶和其同工酶。

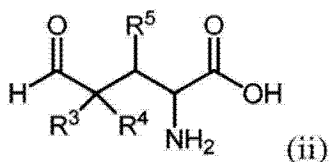
[0277] 在某些实施例中,式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸:

[0278]



[0279] 或其盐被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛：

[0280]



[0281] 或其盐。在某些实施例中，式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸在与一种或一种以上选自自由以下组成的群组的酶接触后被酶促转化为式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛：激酶（例如， γ -谷氨酰基激酶）和脱氢酶（例如，Glu-5-P 脱氢酶）；例如，参见图 2A。在某些实施例中，式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸选自自由以下组成的群组：谷氨酸、3-羟基-谷氨酸、4-甲基谷氨酸和 3-羟基-4-甲基-谷氨酸，且相应的式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛选自自由以下组成的群组：谷氨酸半醛、3-羟基-谷氨酸半醛、4-甲基谷氨酸半醛和 3-羟基-4-甲基-谷氨酸半醛；例如，参见图 2B。在某些实施例中，谷氨酸化合物和谷氨酸半醛二者都是 L 异构体。

[0282] 在某些实施例中，细胞裂解物将葡萄糖与甘氨酸或其盐的组合、或葡萄糖与式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸或其盐的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物和式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛：

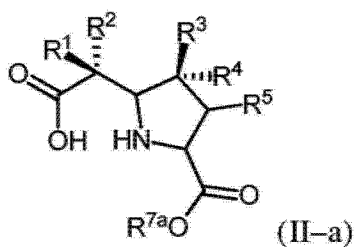
[0283]



[0284] 或其盐。在某些实施例中，式 (iii) 和式 (ii) 化合物或其盐在（例如）与一种或一种以上从壁膜间隙释放的酶接触后被转化为式 (I-a) 化合物或其盐。

[0285] 在某些实施例中，式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛和式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物：

[0286]

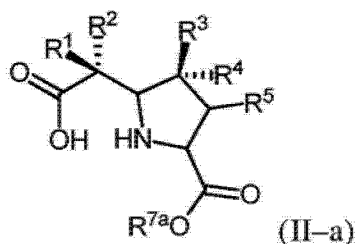


[0287] 或其盐，其中 R^{7a} 为氢。

[0288] 在某些实施例中，式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛和式 (iii) 的任选地经

取代的 CoA 化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物：

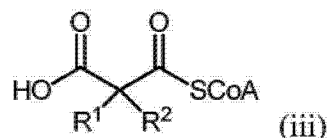
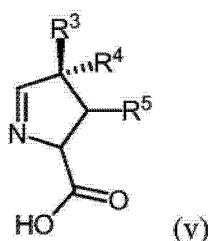
[0289]



[0290] 或其盐, 其中 R^{7a} 为氢。

[0291] 在某些实施例中, 含酶细胞裂解物将葡萄糖与式 (iv) 脯氨酸化合物的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物或其盐以及式 (v) 吡咯化合物或其盐：

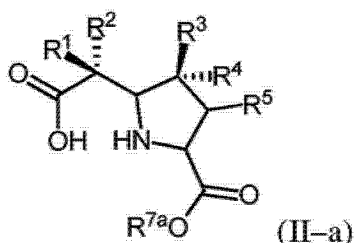
[0292]



[0293] 其中 $-SCoA$ 是辅酶 A 单价基团。

[0294] 在某些实施例中, 式 (v) 吡咯化合物或其盐和式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物在与任选地从壁膜间隙释放的酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物：

[0295]



[0296] 或其盐, 其中 R^{7a} 为氢。

[0297] 在某些实施例中, --- 代表单键。在某些实施例中, = 代表双键。

[0298] 在某些实施例中, R^1 为氢。在某些实施例中, R^1 为任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^1 为任选地经取代的 C_{1-6} 烷基。在某些实施例中, R^1 为任选地经取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^1 为任选地经取代的 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^1 为任选地经取代的 C_{1-2} 烷基。在某些实施例中, R^1 为 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^1 选自氢和 $-CH_3$ 。

[0299] 在某些实施例中, R^2 为氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基或任选地经取代的杂烷基。在某些实施例中, R^2 为氢、任选地经取代的烷基或任选地经取代的杂烷基。在某些实施例中, R^2 为氢或任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^2 为氢。在某些实施例中, R^2 为任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^2 为任选地经取代的 C_{16} 烷基。在某些实施例中, R^2 为任选地经取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^2 为任选地经取代的 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^2 为任选地经取代的 C_{1-2} 烷基。在某些实施

例中, R^2 为任选地经取代的 C_1 烷基。在某些实施例中, R^2 为 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^2 选自氢、 $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 或 $-CH(OH)CH_3$ 。

[0300] 在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 为氢或任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 为氢或任选地经取代的 C_{1-6} 烷基 (例如, $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 或 $-CH(OH)CH_3$)。在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 为氢。在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 是 $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 或 $-CH(OH)CH_3$ 。在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 是 $-CH_3$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在某些实施例中, R^1 为氢, 且 R^2 是 $-CH(OH)CH_3$ 。

[0301] 在某些实施例中, R^3 为氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基或任选地经取代的杂烷基。在某些实施例中, R^3 为氢、任选地经取代的烷基或任选地经取代的杂烷基。在某些实施例中, R^3 为氢或任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^3 为氢。在某些实施例中, R^3 为任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^3 为任选地经取代的 C_{1-6} 烷基。在某些实施例中, R^3 为任选地经取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^3 为任选地经取代的 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^3 为任选地经取代的 C_{1-2} 烷基。在某些实施例中, R^3 为 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^3 为氢或 $-CH_3$ 。

[0302] 在某些实施例中, R^4 为氢。在某些实施例中, R^4 为任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^4 为任选地经取代的 C_{1-6} 烷基。在某些实施例中, R^4 为任选地经取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^4 为任选地经取代的 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^4 为任选地经取代的 C_{1-2} 烷基。在某些实施例中, R^4 为 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^4 选自氢和 $-CH_3$ 。

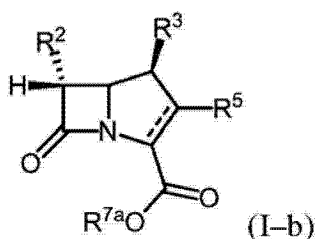
[0303] 在某些实施例中, R^4 为氢, 且 R^3 为氢。在某些实施例中, R^4 为氢, 且 R^3 是任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^4 为氢, 且 R^3 是任选地经取代的 C_{1-6} 烷基 (例如, $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$)。在某些实施例中, R^4 为氢, 且 R^3 是 $-CH_3$ 。

[0304] 在某些实施例中, R^5 为氢。在某些实施例中, R^5 为 $-OR^8$, 其中 R^8 如本文所定义。在某些实施例中, R^5 为 $-OH$ 。在某些实施例中, R^5 为 $-SR^8$, 其中 R^8 如本文所定义。在某些实施例中, R^5 为 $-SH$ 。在某些实施例中, R^5 为 $-N(R^8)_2$, 其中 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^5 为 $-NHR^8$ 。在某些实施例中, R^5 为 $-NH_2$ 。在某些实施例中, R^5 为氢或 $-OH$ 。

[0305] 在某些实施例中, R^1 是氢; R^2 为氢、 $-CH_2$ 或 $-CH_2CH_3$; R^2 为氢或 $-CH_3$; R^4 是氢; 且 R^5 为氢或 $-OH$ 。

[0306] 例如, 在某些实施例中, 在 R^1 和 R^4 为氢时, 式 (I-a) 化合物具有式 (I-b) :

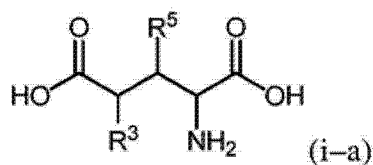
[0307]



[0308] 或其盐或互变异构体或其组合;

[0309] 式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸具有式 (i-a) :

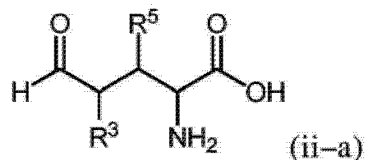
[0310]



[0311] 或其盐；

[0312] 任选地经取代的谷氨酸半醛具有式 (ii-a)：

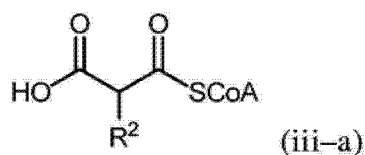
[0313]



[0314] 或其盐；

[0315] 任选地经取代的 CoA 化合物具有式 (iii-a)：

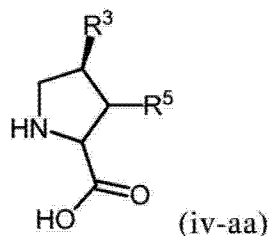
[0316]



[0317] 或其盐；

[0318] 脯氨酸化合物具有式 (iv-aa)：

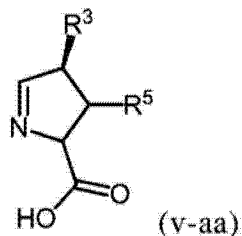
[0319]



[0320] 或其盐；

[0321] 且吡咯化合物具有式 (v-aa)：

[0322]

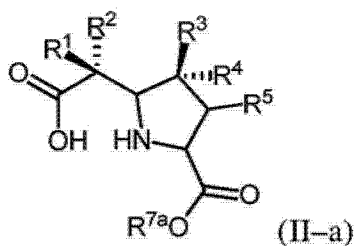


[0323] 或其盐；其中 R^{7a} 为氢，且 R²、R² 和 R⁵ 如本文中所定义。

[0324] 如上文大概阐述，在某些实施例中，细胞裂解物将葡萄糖与甘氨酸的组合、或葡萄糖与式 (i) 的任选地经取代的谷氨酸的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物和式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛。在某些实施例中，式 (ii) 的任选地经取代的谷氨酸半醛和式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物在与羧甲基-Pro 合酶（例如，CarB、

ThnE) 或其同工酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物 :

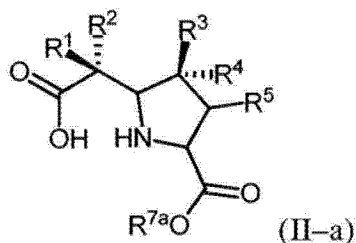
[0325]



[0326] 或其盐。在某些实施例中, R¹ 为氢。在某些实施例中, R² 为氢、-CH₂ 或 -CH₂CH₃。在某些实施例中, R² 为氢或 -CH₃。在某些实施例中, R⁴ 为氢。在某些实施例中, R⁵ 为氢或 -OH。

[0327] 如上文大概阐述, 在其它实施例中, 细胞裂解物将葡萄糖和式 (iv) 的任选地经取代的脯氨酸的组合转化为式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物和式 (v) 吡咯化合物。在某些实施例中, 式 (iii) 的任选地经取代的 CoA 化合物和式 (v) 吡咯化合物在与羧甲基-Pro 合酶 (例如, CarB、ThnE) 或其同工酶接触后生成式 (II-a) 的吡咯烷基化合物 :

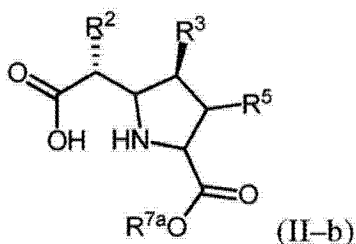
[0328]



[0329] 或其盐。在某些实施例中, R¹ 为氢。在某些实施例中, R² 为氢、-CH₂ 或 -CH₂CH₃。在某些实施例中, R² 为氢或 -CH₃。在某些实施例中, R⁴ 为氢。在某些实施例中, R⁵ 为氢或 -OH。

[0330] 在其中 R¹ 和 R⁴ 为氢的某些实施例中, 吡咯烷基化合物 (II-a) 具有式 (II-b) :

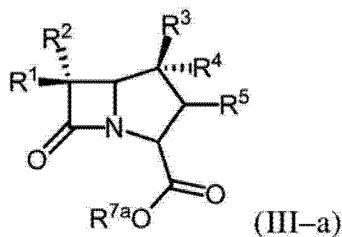
[0331]



[0332] 或其盐。

[0333] 在另外某些实施例中, 吡咯烷基化合物 (II-a) 在与碳青霉烷合成酶 (例如, CarA 或其同工酶) 或 β -内酰胺合成酶 (例如, ThnM 或其同工酶) 或其同工酶接触后生成式 (III-a) 的 β -内酰胺化合物 :

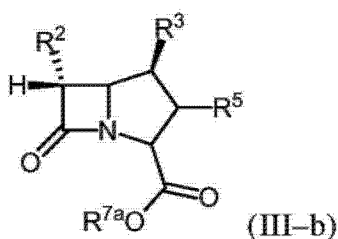
[0334]



[0335] 或其盐。在某些实施例中, R¹ 为氢。在某些实施例中, R² 为氢、-CH₂ 或 -CH₂CH₃。在某些实施例中, R² 为氢或 -CH₃。在某些实施例中, R⁴ 为氢。在某些实施例中, R⁵ 为氢或 -OH。

[0336] 在其中 R¹ 和 R⁴ 为氢的某些实施例中, 式 (III-a) 化合物具有式 (III-b) :

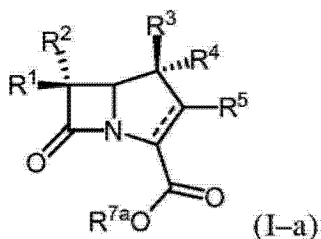
[0337]



[0338] 或其盐。

[0339] 在另外某些实施例中, 式 (III-a) 的 β-内酰胺化合物在与碳青霉烯合酶 (例如, CarC 或 ThnG) 或其同工酶接触后生成式 (I-a) 化合物 :

[0340]



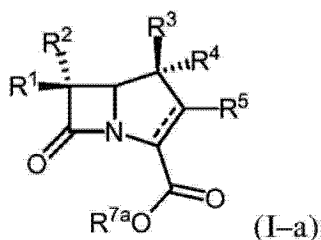
[0341] 或其盐, 其中 $\text{C}=\text{C}$ 是双键。在某些实施例中, R¹ 为氢。在某些实施例中, R² 为氢、-CH₂ 或 -CH₂CH₃。在某些实施例中, R² 为氢或 -CH₃。在某些实施例中, R⁴ 为氢。在某些实施例中, R⁵ 为氢或 -OH。

[0342] 在某些实施例中, 所述方法进一步包含一个或一个以上其它酶促和 / 或化学步骤以提供由式 (I) 涵盖的官能化碳青霉烯。例如, 预期式 (I-a) 碳青霉烯骨架上的一个或一个以上位置可进一步使用酶促和 / 或化学方法官能化。在某些实施例中, 一个或一个以上预期的其它酶促步骤可利用无细胞系统来执行。例如, 所述细胞在裂解前可包含一种或一种以上可用于碳青霉烯骨架在无细胞反应中的进一步官能化的其它酶的表达。

[0343] C2 侧链的衔接

[0344] 在某些实施例中, 通过酶促方法将 C2 侧链安装在碳青霉烯骨架上。例如, 在其中 R⁵ 为氢的某些实施例中, 所述方法进一步包含使式 (I-a) 化合物 :

[0345]



[0346] 或其盐；其中 --- 代表双键，

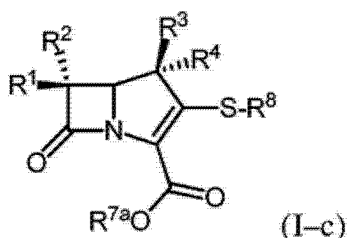
[0347] 与转移酶和下式的化合物接触：

[0348] HS-R^8

[0349] 其中 R^8 选自由以下组成的群组：任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基；

[0350] 以提供式 (I-c) 含硫醇化合物：

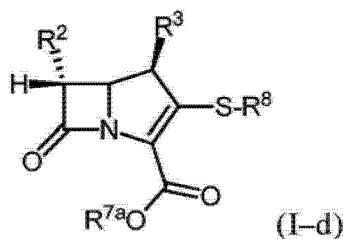
[0351]



[0352] 或其盐。在某些实施例中， R^1 为氢。在某些实施例中， R^2 为氢、 $-\text{CH}_2$ 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 。在某些实施例中， R^2 为氢或 $-\text{CH}_3$ 。在某些实施例中， R^4 为氢。

[0353] 在其中 R^1 和 R^4 为氢的某些实施例中，式 (I-c) 含硫醇化合物是式 (I-d) 化合物：

[0354]



[0355] 或其盐。

[0356] 在某些实施例中，转移酶是由细胞表达的酶。在某些实施例中，转移酶是由细胞表达且被隔离在壁膜间隙中的酶。在裂解细胞后，所述酶与式 HS-R^8 化合物组合自由地与式 (I-a) 化合物反应。然而，在某些实施例中，转移酶不是由细胞表达并隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中，在裂解细胞后、例如在无细胞产生所述化合物后，使转移酶与 HS-R^8 二者与式 (I-a) 化合物接触。在某些实施例中，转移酶是努涅斯等人，化学与生物学 (Chemistry and Biology) (2003) 10:301 (例如，参见努涅斯的表 1，其是以引用方式并入本文中) 中阐述的酶。在某些实施例中，转移酶是卡特利链霉菌转移酶。在某些实施例中，卡特利链霉菌转移酶选自由以下组成的群组：ThnV、ThnE、ThnF、ThnH、ThnR、ThnT、ThnI、ThnU、ThnG、ThnQ、ThnK、ThnL、ThnP、ThnN 和其同工酶。在某些实施例中，卡特利链霉菌转移酶是 ThnV。

[0357] 在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。

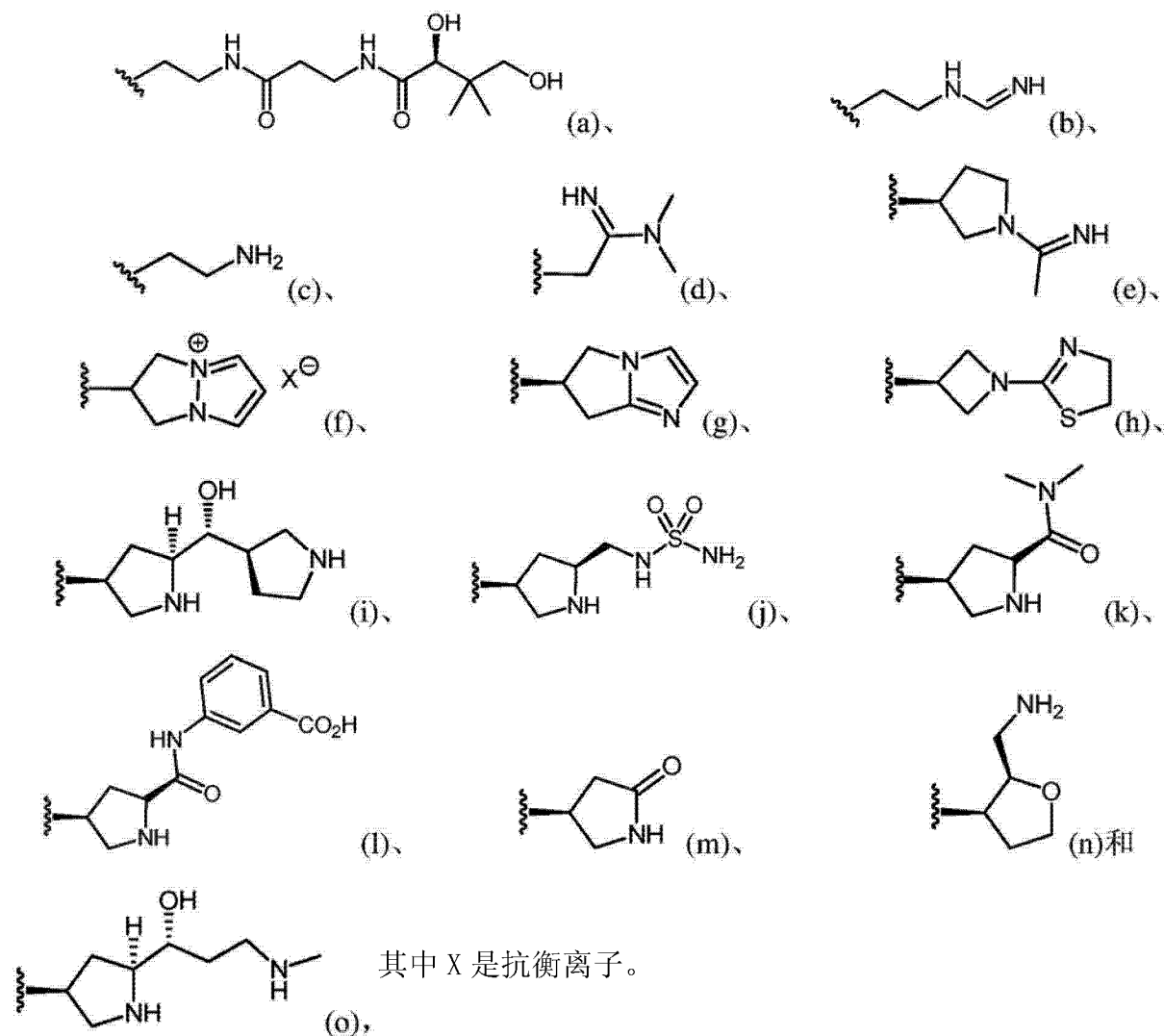
[0358] 在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的 C_{1-6} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的 C_{1-2} 烷基。

[0359] 在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂 C_{1-6} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂 C_{1-4} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂 C_{1-3} 烷基。在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂 C_{1-2} 烷基。

[0360] 在某些实施例中, R^8 为任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的 5-6 元杂环基。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的 5 元杂环基 (例如, 吡咯烷基、吡唑烷基)。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的二环杂环基 (例如, 吡咯并 [1,2-c] 咪唑基)。

[0361] 实例性 R^8 化合物包括但不限于

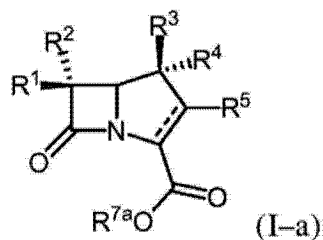
[0362]



[0363] 在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 的基团。在某些实施例中, R^8 是式 (a) 基团。在某些实施例中, R^8 是式 (b) 基团。在某些实施例中, R^8 是式 (c) 基团。

[0364] 或者,在某些实施例中,通过化学方法安装 C2 侧链。例如,在其中 R^5 是 -OH 的某些实施例中,所述方法包含使式 (I-a) 化合物:

[0365]



[0366] 或其盐或互变异构体或其组合;其中 --- 代表双键,

[0367] 与下式化合物接触:

[0368] $R^{8'}-X$

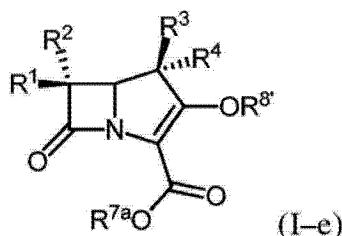
[0369] 其中:

[0370] X 是离去基团;且

[0371] $R^{8'}$ 选自由以下组成的群组: $-C(=O)R^{8a}$ 、 $-C(=O)OR^{8a}$ 、 $-C(=O)SR^{8a}$ 、 $-C(=O)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=NR^{8b})R^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})OR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})SR^{8a}$ 、 $-C(=NR^{8b})N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=S)R^{8a}$ 、 $-C(=S)OR^{8a}$ 、 $-C(=S)SR^{8a}$ 、 $-C(=S)N(R^{8b})_2$ 、 $-C(=O)NR^{8b}SO_2R^{8a}$ 、 $-S(=O)R^{8a}$ 、 $-SO_2R^{8a}$ 、 $-SO_2N(R^{8a})_2$ 、 $-Si(R^{8a})_3$ 、 $-P(=O)(R^{8a})_2$ 、 $-P(=O)(OR^{8a})_2$ 、 $-p(=O)(R^{8a})(OR^{8a})$ 、 $-P(=O)(R^{8a})(N(R^{8b})_2)$ 、 $-P(=O)(N(R^{8b})_2)_2$ 、 $-P(=O)_2R^{8a}$ 、 $-P(=O)_2OR^{8a}$ 、 $-P(=O)_2N(R^{8b})_2$ 、 $-B(R^{8a})_2$ 、 $-B(OR^{8a})_2$ 和 $-BR^{8a}(OR^{8a})$, 其中如果氧保护基团附接到氧原子,且如果硫保护基团附接到硫原子,那么 R^{8a} 选自由以下组成的群组:任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基,或两个 R^{8a} 基团或 R^{8a} 与 R^{8b} 基团接合形成任选地经取代的杂环;且 R^{8b} 在每一情况中独立地选自由以下组成的群组:氢、任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基、任选地经取代的杂芳基和氮保护基团,或两个 R^{8b} 接合形成任选地经取代的杂环;

[0372] 以提供式 (I-e) 化合物:

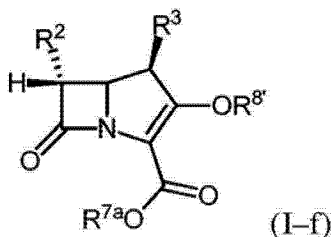
[0373]



[0374] 或其盐。在某些实施例中, R^1 为氢。在某些实施例中, R^2 为氢、 $-CH_2$ 或 $-CH_2CH_3$ 。在某些实施例中, R^3 为氢或 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^4 为氢。在某些实施例中,X 是 $-Cl$ 、 $-Br$ 或 $-I$ 。在某些实施例中,X 是磺酸根。

[0375] 在其中 R^1 和 R^4 为氢的某些实施例中,式 (I-e) 化合物是式 (I-f) 化合物:

[0376]



[0377] 或其盐。

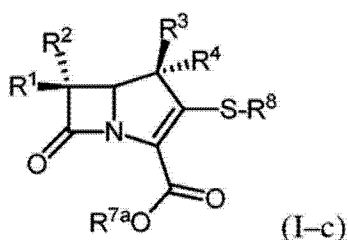
[0378] 在某些实施例中, R^{8'} 选自由以下组成的群组: -C(=O)R^{8a}、-C(=S)R^{8a}、-SO₂R^{8a}、-P(=O)(R^{8a})₂、-P(=O)(OR^{8a})₂、-p(=O)(R^{8a})(OR^{8a})、-P(=O)(R^{8a})(N(R^{8b})₂)、-P(=O)(N(R^{8b})₂)₂、-P(=O)₂R^{8a}、-P(=O)₂OR^{8a} 和 -P(=O)N(R^{8b})₂。在某些实施例中, R^{8'} 选自由以下组成的群组: -C(=O)R^{8a} 和 -P(=O)(OR^{8a})₂。在某些实施例中, R^{8'} 是 -C(=O)R^{8a}。在某些实施例中, R^{8'} 是 -P(=O)(OR^{8a})₂。例如, 参见图 8。

[0379] 在某些实施例中, 使式 (I-e) 化合物与式 HS-R⁸ 化合物接触,

[0380] 其中 R⁸ 选自由以下组成的群组: 任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基;

[0381] 以提供式 (I-c) 含硫醇化合物:

[0382]



[0383] 或其盐。在某些实施例中, R¹ 为氢。在某些实施例中, R² 为氢、-CH₂ 或 -CH₂CH₃。在某些实施例中, R³ 为氢或 -CH₃。在某些实施例中, R⁴ 为氢。

[0384] 在某些实施例中, 式 (I-e) 化合物与 HS-R⁸ 之间的反应包含串联迈克尔加成和之后的基团 -OR^{8'} 的消除。在某些实施例中, 串联迈克尔加成 - 消除反应进一步包含碱。

[0385] 含有 C2 硫醇的侧链的氧化

[0386] 在某些实施例中, 所述方法进一步包含附接到碳青霉烯骨架的含有硫醇的侧链的氧化。例如, 在某些实施例中, 附接到所述骨架的 -SR⁸ 基团部分氧化为亚磺酰基 -S(=O)R⁸, 或完全氧化为磺酰基 -S(=O)₂R⁸。硫氧化为亚磺酰基或磺酰基可采用化学和 / 或酶促方法。所述方法为业内所熟知。例如, 可用于此类氧化的反应条件的实例参见史密斯和马奇, 马奇的高级有机化学, 第 5 版, 约翰威利父子公司, 纽约, 2001; 拉罗克, 综合有机转换, VCH 出版公司, 纽约, 1989; 以及卡拉瑟斯, 一些现代有机合成方法, 第 3 版, 剑桥大学出版社, 剑桥, 1987。

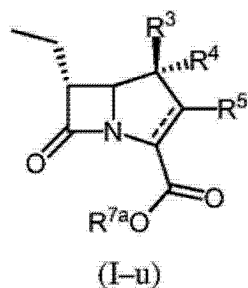
[0387] C6 侧链的附接

[0388] 在某些实施例中, 所述方法包含通过酶促方法附接 C6 侧链。例如, 在其中 R¹ 和 R²

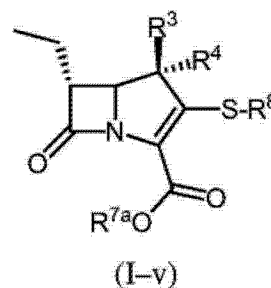
二者都是H的某些实施例中,所述方法包含使式(I)化合物与甲基转移酶(例如,卡特利链霉菌 ThnL、ThnP、ThnK 或其同工酶)接触,以提供其中 R^2 是烷基(例如正烷基,例如 $-\text{CH}_3$ (甲基,Me) 或 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (乙基,Et)) 的化合物。在某些实施例中,使用 S-腺苷甲硫氨酸(SAM) 作为这些酶(Thn L/K/P) 的甲基供体。例如,参见图 6A。在某些实施例中,一个甲基的加成包含一个反应循环,或依序加成两个甲基以获得乙基包含两个反应循环。可以类似方式转移其它甲基以形成其它正烷基,例如正丙基和正丁基。

[0389] 在某些实施例中,在 R^1 和 R^2 都为氢时,式(I-a) 或(I-c) 化合物与甲基转移酶的接触分别提供式(I-u) 或(I-v) 烷基化(即其中加成乙基的) 化合物:

[0390]



(I-u)

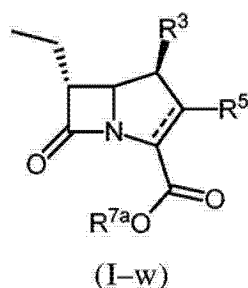


(I-v)

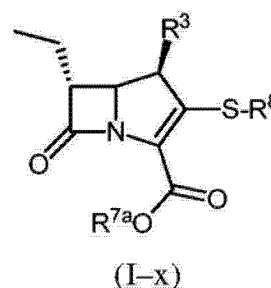
[0391] 或其盐或互变异构体或其组合。

[0392] 在某些实施例中,在 R^1 和 R^4 是氢时,式(I-u) 和(I-v) 化合物分别具有式(I-w) 和(I-x):

[0393]



(I-w)



(I-x)

[0394] 或其盐或互变异构体或其组合。

[0395] 在某些实施例中,甲基转移酶是由细胞表达的酶。在某些实施例中,甲基转移酶是由细胞表达且被隔离在壁膜间隙中的酶。在裂解细胞后,甲基转移酶自由地与式(I-a) 或(I-c) 化合物反应。

[0396] 然而,在某些实施例中,甲基转移酶不是由细胞表达并被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中,在裂解细胞后、例如在无细胞产生所述化合物后,使甲基转移酶与式(I-a) 或(I-c) 化合物接触。

[0397] 在某些实施例中,甲基转移酶是卡特利链霉菌 ThnL。在某些实施例中,甲基转移酶是卡特利链霉菌 ThnP。在某些实施例中,甲基转移酶是卡特利链霉菌 ThnK。

[0398] 在某些实施例中,使用 ThnL、ThnP 和 ThnK 中的两种或两种以上来(例如)产生甲基或乙基侧链。在某些实施例中,使用 ThnL 和 ThnP 来(例如)产生甲基或乙基侧链。在某些实施例中,使用 ThnL 和 ThnK 来(例如)产生甲基或乙基侧链。在某些实施例中,使用 ThnK 和 ThnP 来(例如)产生甲基或乙基侧链。在某些实施例中,使用 ThnL、ThnP 和 ThnK

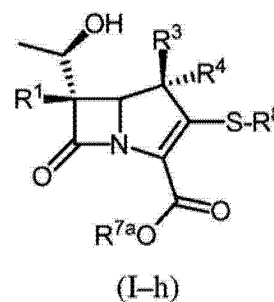
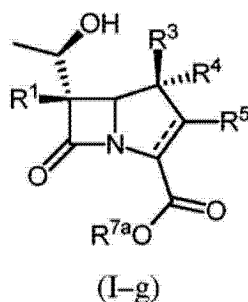
中的全部来（例如）产生甲基或乙基侧链。

[0399] 在另外某些实施例中，在 --- 代表双键且 R^5 为氢或 $-\text{OH}$ 时，可将式 (I-u) 烷基化化合物通过如本文所述的酶促或化学方法转化为式 (I-v) 化合物。

[0400] C6 侧链的氧化

[0401] 在某些实施例中，所述方法包含通过酶促方法氧化 C6 侧链。例如，在某些实施例中，在 R^2 是 $-\text{CH}_3$ 时，所述方法进一步包含使式 (I) 化合物与加氧酶接触以提供其中 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 的化合物。在某些实施例中，在 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 时，所述方法进一步包含使式 (I) 化合物与加氧酶接触以提供其中 R^2 是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 的化合物。例如，在某些实施例中，在 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 时，式 (I-a) 或 (I-c) 化合物与加氧酶的接触分别提供式 (I-g) 或 (I-h) 的羟化化合物：

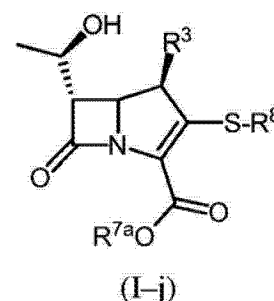
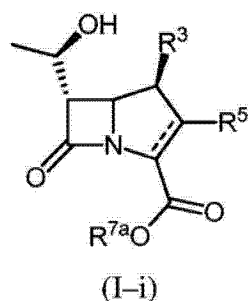
[0402]



[0403] 或其盐或互变异构体或其组合。

[0404] 在某些实施例中，在 R^1 和 R^4 为氢时，式 (I-g) 和 (I-h) 化合物分别具有式 (I-i) 和 (I-j)：

[0405]



[0406] 或其盐或互变异构体或其组合。

[0407] 在某些实施例中，加氧酶是由细胞表达的酶。在某些实施例中，加氧酶是由细胞表达并在裂解前被隔离在壁膜间隙中的酶。在裂解细胞后，加氧酶自由地与式 (I-a) 或 (I-c) 化合物反应。

[0408] 然而，在某些实施例中，加氧酶不是由细胞表达并被隔离在壁膜间隙中。在某些实施例中，在裂解细胞后、例如在无细胞产生所述化合物后，使加氧酶与式 (I-a) 或 (I-c) 化合物接触。在某些实施例中，加氧酶是卡特利链霉菌加氧酶，或 2-酮戊二酸和 / 或 Fe(II) -依赖性加氧酶超家族的酶。在某些实施例中，卡特利链霉菌加氧酶是 ThnQ。

[0409] 在另外某些实施例中，在 --- 是双键且 R^5 为氢或 $-\text{OH}$ 时，可将式 (I-g) 羟化化合物通过如本文所述的酶促或化学方法转化为式 (I-h) 化合物。

[0410] C3 侧链的官能化

[0411] 本发明进一步预期对 C3 侧链的酶促或化学处理。

[0412] 在某些实施例中,将 C3 侧链基团 $-C(=O)OR^{7a}$ (其中 R^{7a} 为氢) 转化为酯 ($-C(=O)OR^{7a}$, 其中 R^{7a} 不为氢)、硫酯 ($-C(=O)SR^{7a}$) 或酰胺 ($-C(=O)N(R^{7b})_2$) 基团。可采用业内已知的方法(例如通过诸如以下等化学方法:生成活化羧酸(例如,生成酰氯或使用偶合剂)和用诸如 HOR^{7a} 、 HSR^{7a} 或 $HN(R^{7b})_2$ 等亲核基团处理经活化羧酸;或通过酶促方法)将羧酸基团转化为酯、硫酯或酰胺。例如,可用于这些类型的转化的反应条件的实例参见史密斯和马奇,马奇的高级有机化学,第 5 版,约翰威利父子公司,纽约,2001;拉罗克,综合有机转换, VCH 出版公司,纽约,1989;以及卡拉瑟斯,一些现代有机合成方法,第 3 版,剑桥大学出版社,剑桥,1987。

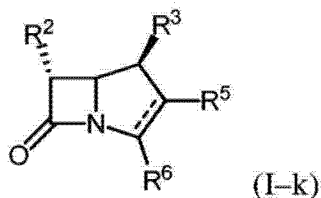
[0413] 在其它实施例中,可进一步以合成方式(例如通过一个或一个以上化学和/或酶促步骤)处理 C3 侧链基团 $-C(=O)OR^{7a}$ 以提供不同 C3 侧链,例如其中 R^6 选自自由以下组成的群组:任选地经取代的烷基、任选地经取代的烯基、任选地经取代的炔基、任选地经取代的杂烷基、任选地经取代的杂烯基、任选地经取代的杂炔基、任选地经取代的碳环基、任选地经取代的杂环基、任选地经取代的芳基和任选地经取代的杂芳基。例如,在某些实施例中,可将 $-C(=O)OR^{7a}$ 还原为醛基 $-CHO$ 且任选地在(例如)维蒂希(Wittig)条件下进一步反应以提供任选地经取代的烯基 $-CH=CH(R^{7a})$ (其中 R^{7a} 如本文中所定义),其可进一步经合成方式处理。在其它实施例中,可使醛基 $-CHO$ 通过还原性氨基化进一步与伯胺 H_2NR^{7b} 反应以提供氨基化基团 $-CH_2-NH(R^{7b})$ (其中 R^{7b} 如本文中所定义),其可进一步经合成方式处理。在其它实施例中,可将 $-C(=O)OR^{7a}$ 还原为醇 $-CH_2OH$,可将其转化为经活化烷基 $-CH_2X$ (其中 X 是离去基团),其可进一步经合成方式处理。应理解,上文仅为所属领域技术人员使用已知化学和/或酶促技术的组合可获得的基团类型的实例。式(I)中的 R^6 的定义所涵盖的各种其它官能基可使用已知化学方法来获得。

[0414] 式(I)化合物的其它实施例

[0415] 可为最终产物或中间体的实例性式(I)化合物可通过本发明无细胞系统和方法来制备。预期所属领域技术人员可了解 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 和 R^6 的各种组合,且所揭示的亚类不应视为具有限制性。

[0416] 例如,在其中 R^1 和 R^4 为氢的式(I)的某些实施例中,化合物具有式(I-k):

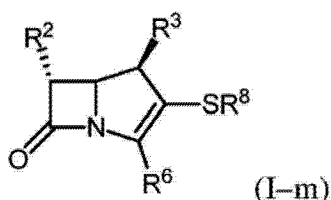
[0417]



[0418] 或其盐,其中 R^2 、 R^3 、 R^5 和 R^6 如本文中所定义。在某些实施例中, R^2 为氢、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 或 $CH(OH)CH_3$ 。在某些实施例中, R^3 为氢或 $-CH_3$ 。在某些实施例中, R^5 为氢、 $-OR^{8'}$ 、 $-OR^8$ 或 $-SR^8$ 。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式(a)、(b)或(c)基团。在某些实施例中, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-OR^{7a}$ 。在某些实施例中, $==$ 是双键。

[0419] 在其中 R^5 为 $-SR^8$ 的某些实施例中,提供式(I-m)化合物:

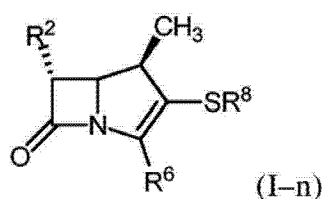
[0420]



[0421] 或其盐, 其中 R^2 、 R^3 、 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^2 选自氢、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 或 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 。在某些实施例中, R^3 为氢或 $-\text{CH}_3$ 。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-\text{OR}^{7a}$ 。

[0422] 在其中 R^3 是 $-\text{CH}_3$ 的 (I-m) 的某些实施例中, 提供式 (I-n) 化合物:

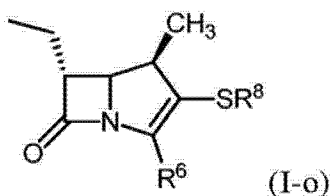
[0423]



[0424] 或其盐, 其中 R^2 、 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^2 选自氢、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 或 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-\text{OR}^{7a}$ 。

[0425] 在其中 R^2 是 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 且 R^3 是 $-\text{CH}_3$ 的 (I-n) 的某些实施例中, 提供式 (I-o) 化合物:

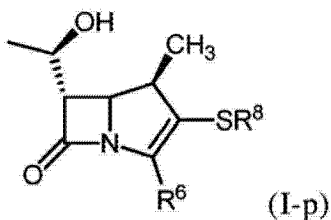
[0426]



[0427] 或其盐, 其中 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-\text{OR}^{7a}$ 。

[0428] 在其中 R^2 是 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 且 R^3 是 $-\text{CH}_3$ 的 (I-n) 的某些实施例中, 提供式 (I-o) 化合物:

[0429]

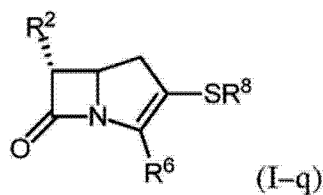


[0430] 或其盐, 其中 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或

(c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-OR^{7a}$ 。

[0431] 在其中 R^3 为氢的 (I-m) 的某些实施例中, 提供式 (I-q) 化合物:

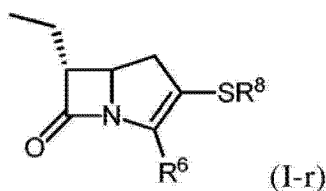
[0432]



[0433] 或其盐, 其中 R^2 、 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^2 选自氢、 $-CH_3$ 、 $-CH_2OH$ 、 $-CH_2CH_3$ 、 $-CH(CH_3)_2$ 或 $-CH(OH)CH_3$ 。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-OR^{7a}$ 。

[0434] 在其中 R^2 是 $-CH_2CH_3$ 且 R^3 是 $-CH_3$ 的 (I-q) 的某些实施例中, 提供式 (I-r) 化合物:

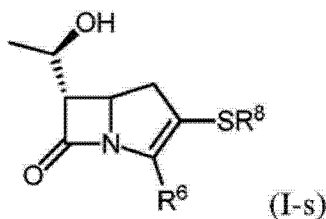
[0435]



[0436] 或其盐, 其中 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-OR^{7a}$ 。

[0437] 在其中 R^2 是 $-CH(OH)CH_3$ 且 R^3 为氢的 (I-q) 的某些实施例中, 提供式 (I-s) 化合物:

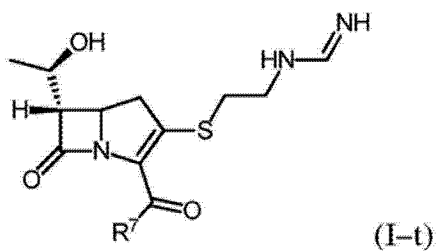
[0438]



[0439] 或其盐, 其中 R^6 和 R^8 如本文中所定义。在某些实施例中, R^8 是任选地经取代的烷基、任选地经取代的杂烷基或任选地经取代的杂环基。在某些实施例中, R^8 是式 (a)、(b) 或 (c) 基团。在某些实施例中, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 。在某些实施例中, R^7 为 $-OR^{7a}$ 。

[0440] 例如, 在其中 R^2 是 $-CH(OH)CH_3$, R^3 为氢, R^6 是 $-C(=O)R^7$ 且 R^8 是式 (b) 基团的式 (I-s) 某些实施例中, 提供式 (I-t) 化合物:

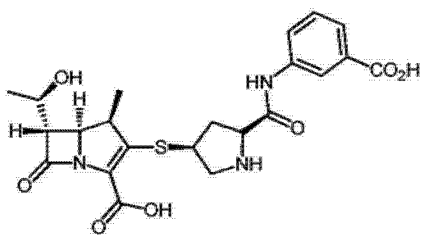
[0441]



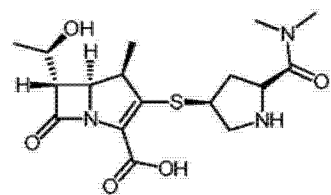
[0442] 或其盐。式 (I-t) 化合物在本文中称作化合物亚胺培南 (其中 R^7 为 $-OH$) 或亚胺培南衍生物 (即, 其中 R^7 是 $-OR^{7a}$ 、 $-SH$ 、 $-SR^{7a}$ 、 $-N(R^{7b})_2$, 其中 R^{7a} 不为氢)。在某些实施例中, 亚胺培南衍生物是亚胺培南的前药。

[0443] 其它实例性式 (I) 化合物选自由以下组成的群组:

[0444]

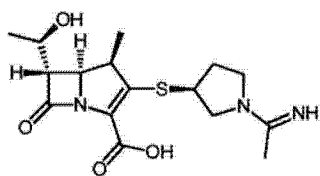


厄他培南

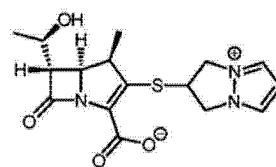


美罗培南

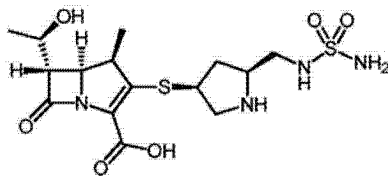
[0445]



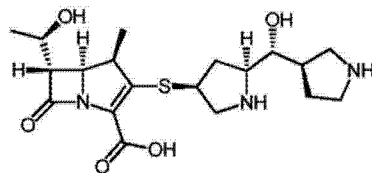
帕尼培南



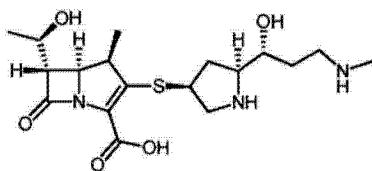
比阿培南



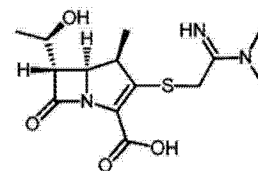
多利培南



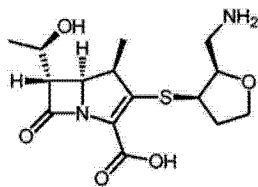
ER-35768



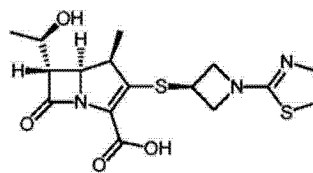
来那培南



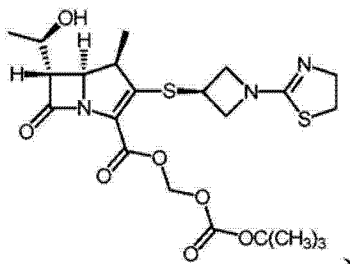
L-646591



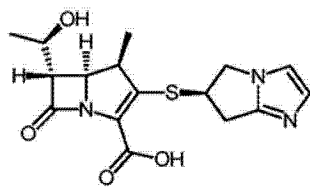
CL-191121



L-036

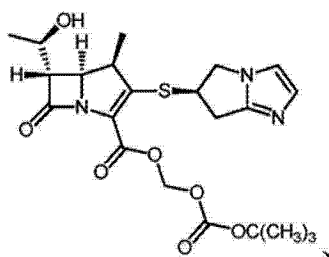


L-084

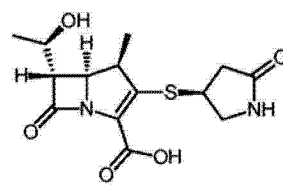


DU-6681

[0446]

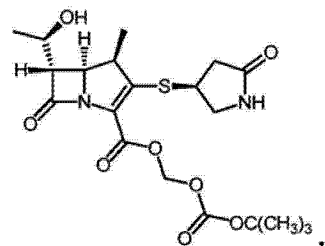


DZ-2640



R-95867

和



CS-834

和其盐。

[0447] 重组基因表达和细胞培养

[0448] 编码与本发明相关的酶的基因可从多种来源获得。如所属领域技术人员可了解，这些酶的同源性基因存在于多个物种中且可通过同源性检索、例如通过可在 NCBI 互联网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 获得的蛋白质 BLAST 检索来鉴别。编码这些酶的基因可通过 PCR 使用（例如）简并引物从来自任何含有给定酶的来源的 DNA 扩增，如所属领域技术人员可理解。在一些实施例中，编码给定酶的基因可为合成基因。任何获得编码本文所讨论酶的基因的方式都与本发明的各个方面相容。

[0449] 本发明分子的表达可使用所属领域技术人员已知的常规方法来测定。这些方法包括（但不限于）直接 RNA 扩增、RNA 到 cDNA 的逆转录、实时 RT-PCR、cDNA 扩增、杂交和基于免疫方式的分析方法，其包括（但不限于）蛋白质印迹法 (Western blotting)、免疫组织化学法、抗体夹心捕获分析、ELISA 和酶联免疫斑点分析 (EliSpot 分析)。例如，对本发明核酸分子在诸如组织或细胞裂解物等样品中的存在水平的测定可通过任何标准核酸测定分析来实施，包括聚合酶链式反应或用经标记杂交探针来分析。所述杂交方法包括（但不限于）微阵列技术。

[0450] 本发明由此在一个方面中涉及多种方法，所述方法涉及酶、编码那些酶的基因、所述酶和基因的功能修饰和变体，以及其相关应用。本发明核酸的同系物和等位基因可通过常用技术来鉴别。本发明还涵盖多种方法，所述方法涉及在严格条件下与本文所述核酸杂交的核酸。如本文所用术语“严格条件”是指所属领域技术人员所熟悉的参数。核酸杂交参数可参见编纂所述方法的参考文献，例如分子克隆：实验室手册 (Molecular Cloning. : A Laboratory Manual), J. 桑布鲁克 (J. Sambrook) 等人编辑，第二版，冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), 冷泉港, 纽约, 1989 ; 或分子生物学现行规范 (Current Protocols in Molecular Biology), F.M. 奥苏贝尔 (F.M. Ausubel) 等人编辑，约翰威利父子公司，纽约。更特定来说，如本文所用的严格条件是指（例如）在 65℃ 下在杂交缓冲液 (3.5×SSC、0.02% 蔗糖 (Ficoll)、0.02% 聚乙烯吡咯烷酮、0.02% 牛血清白蛋白、2.5mM NaH₂PO₄ (pH7)、0.5% SDS、2mM EDTA) 中杂交。SSC 是 0.15M 氯化

钠 /0.015M 柠檬酸钠, pH7 ;SDS 是十二烷基硫酸钠 ;且 EDTA 是乙二胺四乙酸。在杂交后, 在室温下在 (例如) $2\times$ SSC 中洗涤将 DNA 转移到其上的膜, 然后在高达 68℃ 的温度下在 $0.1-0.5\times$ SSC/ $0.1\times$ SDS 中洗涤。

[0451] 可使用获得类似严格性程度的其它条件、试剂等。所属领域技术人员将熟悉所述条件, 且因此在本文中不再赘述。然而, 应理解, 所属领域技术人员将能以允许明确鉴别本发明核酸的同系物和等位基因的方式操纵所述条件 (例如, 通过使用较低严格性条件)。所属领域技术人员还熟悉筛选用于表达所述分子的细胞和库的方法, 然后以常规方式分离所述细胞和库, 之后分离相关核酸分子并测序。

[0452] 一般来说, 同系物和等位基因通常将与核酸和多肽序列分别共享至少 75% 核苷酸一致性和 / 或至少 80% 氨基酸一致性, 在一些情况下将共享至少 90% 核苷酸一致性和 / 或至少 90% 或 95% 氨基酸一致性, 且在其它情况下将共享至少 95% 核苷酸一致性和 / 或至少 99% 氨基酸一致性。在一些实施例中, 同系物和等位基因将与本文所述的核酸序列共享至少 75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上的核苷酸一致性, 和 / 或与本文所述的多肽序列共享 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上的一致性。

[0453] 同源性可使用 NCBI (贝塞斯达 (Bethesda), 马里兰) 研发的各种公众可用软件工具来计算, 所述工具可通过 NCBI 互联网网站获得。实例性工具包括同样可在 NCBI 互联网网站 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 获得的 BLAST 软件。成对和 ClustalW 比对 (BLOSUM30 矩阵设置) 以及 Kyte-Doolittle 亲疏水性分析可使用 MacVector 序列分析软件 (牛津分子集团 (Oxford Molecular Group)) 获得。本发明还包括上述核酸的沃森-克里克 (Watson-Crick) 补体。

[0454] 在基因的筛选和鉴别中, 可应用所属领域技术人员已知的技术, 例如 DNA 印迹 (Southern blot)、RNA 印迹 (Northern blot) 和扩增方案 (例如使用与所呈现序列杂交的引物的聚合酶链式反应)。

[0455] 本发明还包括简并核酸, 其包括天然材料中存在的密码子的替代密码子。例如, 丝氨酸残基是由密码子 TCA、AGT、TCC、TCG、TCT 和 AGC 编码。六个密码子中的每一个都等效用于编码丝氨酸残基的目的。因此, 所属领域技术人员将了解, 任何编码丝氨酸的核苷酸三联体都可用于引导蛋白质合成设备在活体外或活体内将丝氨酸残基纳入延长多肽中。类似地, 编码其它氨基酸残基的核苷酸序列三联体包括 (但不限于): CCA、CCC、CCG 和 CCT (脯氨酸密码子); CGA、CGC、CGG、CGT、AGA 和 AGG (精氨酸密码子); ACA、ACC、ACG 和 ACT (苏氨酸密码子); AAC 和 AAT (天冬酰胺密码子); 和 ATA、ATC 和 ATT (异亮氨酸密码子)。其它氨基酸残基可通过多个核苷酸序列以类似方式编码。因此, 本发明包括简并核酸, 其因遗传密码的简并性而与生物分离核酸的密码子序列不同。本发明还包括密码子优化以适应宿主细胞的最佳密码子使用。

[0456] 本发明还提供经修饰核酸分子, 其包括添加、取代和缺失一个或一个以上核苷酸。在某些实施例中, 这些经修饰核酸分子和 / 或其编码的多肽保留未修饰核酸分子和 / 或多肽的至少一种活性或功能, 例如酶促活性。在某些实施例中, 经修饰核酸分子编码经修饰多肽、优选地具有如本文其它地方所述的保守氨基酸取代的多肽。经修饰核酸分子在结构上

与未修饰核酸分子相关,且在某些实施例中,在结构上与未修饰核酸分子足够相关以使得经修饰和未修饰核酸分子可在严格条件下杂交。

[0457] 例如,可制备编码具有单一氨基酸变化的多肽的经修饰核酸分子。这些核酸分子中的每一者可具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或 10 个以上核苷酸取代,不包括对应于如本文所述的遗传密码简并性的核苷酸变化。同样,可制备编码具有两个氨基酸变化的多肽的经修饰核酸分子,其具有(例如)2-6 个核苷酸变化。所属领域技术人员将容易地设想多个与所述类似的经修饰核酸分子,包括(例如)密码子中编码氨基酸 2 和 3、2 和 4、2 和 5、2 和 6 等的核苷酸取代。在上述实例中,两个氨基酸的每一组合包括在经修饰核酸分子的组中以及所有编码氨基酸取代的核苷酸取代中。还可制备编码具有其它取代(即,3 个或 3 个以上)、添加或缺失(例如,通过引入终止密码子或剪接位点)的多肽的其它核酸分子且其包括在本发明中,如所属领域技术人员容易地设想。任一上述核酸或多肽可通过常规实验来测试与本文所揭示核酸和/或多肽的结构相关性或活性的保留。

[0458] 本发明包括本文所述多肽的变体。如本文所用的多肽的“变体”是含有对多肽的初始氨基酸序列的一个或一个以上修饰的多肽。可对酶进行产生酶变体的修饰,例如 1) 改变酶的细胞分布;2) 降低或消除酶的活性;3) 增强或改变酶的性质、蛋白质在表达系统中的稳定性或其它性质;4) 向酶提供新颖活性或性质,例如添加抗原性表位或添加可检测部分;或 5) 提供酶与酶促底物之间的等效或更佳结合。

[0459] 对多肽的修饰通常是对编码所述多肽的核酸来进行,且可包括缺失、点突变、截头、氨基酸取代和氨基酸或非氨基酸部分的添加。或者,可通过(例如)裂解、添加连接体分子、添加可检测部分(例如生物素)、添加脂肪酸等直接对多肽进行修饰。修饰还包括融合蛋白质。所属领域技术人员将熟悉预测蛋白质序列变化对蛋白质构象的效应的方法,且可由此根据已知方法“设计”变体多肽。所述方法的一个实例由达黑亚特(Dahiyat)和梅奥(Mayo)阐述于科学(Science)278:82-87,1997 中,藉此可从头设计蛋白质。可将所述方法应用于已知蛋白质以仅改变多肽序列的一部分。通过应用达黑亚特和梅奥的计算方法,可提出并测试多肽的特定变体以测定所述变体是否保留所需构象。

[0460] 一般来说,变体包括已经特定修饰以改变与其所需生理活性无关的多肽特征的多肽。例如,半胱氨酸残基可经取代或缺失以防止形成不期望的二硫键联。类似地,可改变某些氨基酸以通过在表达系统中消除蛋白酶的蛋白酶解来促进多肽的表达(例如,其中存在 KEX2 蛋白酶活性的酵母表达系统中的氨基二羧酸残基)。

[0461] 编码多肽的核酸的突变优选地保存编码序列中的氨基酸读码框,且优选地不在所述核酸中产生可能杂交形成二级结构(例如发夹或环,其可能不利于变体多肽的表达)的区域。

[0462] 突变可通过选择氨基酸取代或通过编码多肽的核酸中的所选位点随机诱变来进行。然后表达并测试变体多肽的一种或一种以上活性以测定哪个突变为变体多肽提供所需性质。可对变体(或对非变体多肽)进行进一步突变,所述突变对多肽的氨基酸序列沉默,但在具体宿主中提供用于翻译的优选密码子。例如大肠杆菌中核酸的用于翻译的优选密码子为所属领域技术人员所熟知。可对基因或 cDNA 克隆的非编码序列进行其它突变以促进多肽表达。可通过以下方式测试多肽变体的活性:将编码所述变体多肽的基因克隆到细菌或哺乳动物表达载体中,将所述载体引入适宜宿主细胞中,表达所述变体多肽,并测

试如本文所揭示多肽的功能能力。

[0463] 所属领域技术人员还将认识到,可在多肽中进行保守氨基酸取代以提供与上述多肽在功能上等价的变体,即保留多肽的功能能力的变体。如本文所用的“保守氨基酸取代”是指不改变其中进行所述氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特性的氨基酸取代。可根据所属领域技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,例如参见编纂所述方法的参考文献,例如分子克隆:实验室手册, J. 桑布鲁克等人编辑,第二版,冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1989;或分子生物学现行规范, F. M. 奥苏贝尔等人编辑,约翰威利父子公司,纽约。多肽的实例性功能等效变体包括本文所揭示蛋白质的氨基酸序列中的保守氨基酸取代。氨基酸的保守取代包括在以下群组内的氨基酸之间进行的取代:(a) M、I、L、V;(b) F、Y、W;(c) K、R、H;(d) A、G;(e) S、T;(f) Q、N;和 (g) E、D。

[0464] 一般来说,在制备变体多肽时优选地不改变全部氨基酸。如果已知具体氨基酸残基可赋予某功能,那么将不置换所述氨基酸,或另一选择为,将通过保守氨基酸取代来置换。优选地,在制备变体多肽时可改变1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个残基。一般优选地进行最少数目的取代。因此,一种生成变体多肽的方法是用所有其它氨基酸取代具体单一氨基酸,然后分析变体的活性,然后用一种或一种以上具有最佳活性的多肽重复所述过程。

[0465] 多肽的氨基酸序列中待产生多肽的功能等效变体的保守氨基酸取代通常是通过改变编码多肽的核酸来进行。所述取代可通过所属领域技术人员已知的多种方法来进行。例如,氨基酸取代可根据孔克尔(Kunkel)的方法通过PCR定向突变、位点定向诱变来进行(孔克尔,美国国家科学院院刊(Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.) 82:488-492, 1985);或通过化学合成编码多肽的基因来进行。

[0466] 本发明的各方面涉及一种或一种以上酶在细胞中的过表达。在一些实施例中,细胞内源表达一种或一种以上编码一种或一种以上酶的基因。内源基因的表达可通过改变基因的启动子、例如通过插入组成型或诱导型启动子来促进。内源基因的表达还可通过在细胞中表达基因的额外拷贝、例如通过将基因的额外拷贝插入染色体中或通过在线粒体上表达基因的一个或一个以上拷贝来促进。

[0467] 本发明的各方面涉及一种或一种以上编码一种或一种以上酶的基因的重组表达。在一些实施例中,编码与本发明相关的酶的基因是在重组表达载体中表达。如本文所用的“载体”可为多种可通过限制和连接向其中插入所需序列的核酸中的任一者,其用于在不同遗传环境之间转运或用于在宿主细胞中表达。载体通常由DNA组成,但也可使用RNA载体。载体包括(但不限于):质粒、福斯质粒(fosmid)、噬菌粒、病毒基因组和人工染色体。

[0468] 克隆载体是能在宿主细胞中自主复制或整合在基因组中的载体,且其特征进一步在于一个或一个以上内切核酸酶限制位点,在所述限制位点处可以可测定方式切割所述载体且可将所需DNA序列连接到其中,以使得新重组载体保留其在宿主细胞中复制的能力。在质粒情形中,所需序列的复制可随质粒拷贝数在宿主细菌内的增加而多次进行,或在宿主通过有丝分裂繁殖之前在每个宿主中仅进行一次。在噬菌体情形中,复制可在裂解期期间主动进行或在裂解原期期间被动进行。

[0469] 表达载体是可通过限制和连接将所需DNA序列插入其中以使得其可操作接合到调节序列且可表达为RNA转录物的载体。载体可进一步含有一种或一种以上适用于鉴别已

经或未经所述载体转换或转染的细胞的标记序列。标记包括（例如）编码提高或降低对抗生素或其它化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因、编码活性可通过业内已知的标准分析检测的酶（例如， β -半乳糖苷酶、荧光素酶或碱性磷酸酶）的基因以及显著影响经转换或经转染细胞、宿主、菌落或噬斑的表型的基因（例如，绿色荧光蛋白）。优选载体是那些能自主复制并表达存于其可操作接合的 DNA 区段中的结构基因产物的载体。

[0470] 如本文所用，在编码序列和调节序列以某一方式共价连接而将编码序列的表达或转录置于调节序列的影响或控制下时，称所述编码序列和所述调节序列“可操作”接合。在需要将编码序列翻译成功能蛋白质时，如果在 5' 调节序列中诱导启动子导致编码序列转录且如果两个 DNA 序列之间的键联的性质不会（1）导致引入移码突变，（2）干扰启动子区域引导编码序列转录的能力，或（3）干扰相应 RNA 转录物翻译成蛋白质的能力，那么称两个 DNA 序列可操作接合。因此，如果启动子区域能实现所述 DNA 序列的转录而使得所得转录物可翻译为所需蛋白质或多肽，那么启动子区域将可操作接合到编码序列。

[0471] 在细胞中表达编码本发明任一酶的核酸分子时，可使用多种转录控制序列（例如，启动子/增强子序列）来引导其表达。启动子可为天然启动子，即基因在其内源情况中的启动子，其正常调节基因表达。在一些实施例中，启动子可为组成型，即启动子未经调节以容许连续转录其相关基因。还可使用多种条件性启动子，例如受分子的存在或不存在控制的启动子。

[0472] 基因表达所需调节序列的准确性质可随物种或细胞类型而变，但一般应视需要包括分别参与转录和翻译的起始的 5' 非转录和 5' 非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。具体来说，所述 5' 非转录调节序列将包括启动子区域，其包括用于可操作接合基因的转录控制的启动子序列。调节序列还可视需要包括增强子序列或上游活化剂序列。本发明载体可任选地包括 5' 前导序列或信号序列。所属领域技术人员有能力慎重选择并设计适宜载体。

[0473] 含有所有表达所需元件的表达载体可从市场购得且为所属领域技术人员已知。例如，参见桑布鲁克等人，分子克隆：实验室手册，第二版，冷泉港实验室出版社，1989。通过向细胞中引入异源 DNA（或 RNA）对细胞进行遗传改造。将所述异源 DNA（或 RNA）置于转录元件的可操作控制下以允许在宿主细胞中表达异源 DNA。在一些实施例中，可将两个或两个以上本发明核酸克隆到相同表达载体或质粒中。

[0474] 可使用业内标准方法和技术将编码与本发明相关的任一酶的核酸分子或核酸分子引入细胞中。例如，可通过标准方案引入核酸分子，例如转换（包括化学转换和电穿孔）、转导、粒子轰击等。表达编码酶的核酸分子还可通过将核酸分子整合到基因组中来完成。可使用业内熟知的标准技术将核酸分子整合到细胞的基因组 DNA 中。

[0475] 在一些实施例中，在细菌细胞中重组表达一种或一种以上与本发明相关的基因。可在具有任一类型（加富或最低）和任一组成的培养基中培养本发明细菌细胞。在一些实施例中，在 LB 培养基中培养细胞。如所属领域技术人员可理解，常规优化可容许使用多种类型的培养基。所选培养基可补充有多种额外组份。补充组份的一些非限制性实例包括葡萄糖、抗生素、IPTG、用于基因诱导的四环素或脱水四环素（aTc）和 ATCC 微量矿物质补充剂。类似地，可通过常规实验来优化培养基的其它方面以及本发明细胞的生长条件。例如，pH 和温度是可优化因素的非限制性实例。在一些实施例中，可优化补充组份的浓度和量。

在其它实施例中,可优化向培养基中补充一种或一种以上补充组分的频率以及培养培养基的时间长度。

[0476] 在一些实施例中,生长培养基是从扎瓦达(Zawada)和斯瓦茨(2006)生物技术与生物工程 94(4):618 调整而来,且包含以下物质中的一种或一种以上:去离子水、斯瓦茨培养基母液、 $MgSO_4$ 母液、硫胺母液、微量金属、葡萄糖、维生素母液、氨基酸母液、BASF Industrol DF204(消泡剂)、氯霉素、羧苄西林(Carbenicillin)和预培养接种物。母液的代表性组成进一步阐述于实例部分中。微量金属的非限制性实例包括:硼酸、六水合氯化钴、五水合硫酸铜、水合硫酸锰、二水合钼酸钠、七水合硫酸锌和硫酸。

[0477] 维生素的非限制性实例包括:氯化胆碱、尼克酸(烟酸)、盐酸吡哆辛(pyridoxine hydrochloride)、核黄素、泛酸半钙盐、对氨基苯甲酸(PABA)、KOH、生物素、氰钴胺和二水合叶酸。氨基酸的非限制性实例包括:异亮氨酸、亮氨酸、色氨酸和缬氨酸。

[0478] 可在多种装置中培养与本发明各方面相关的细胞,如所属领域技术人员可理解。在一些实施例中,在生物反应器、例如由 DASGIP AG(于利希,德国)提供的生物反应器中培养细胞。在一些实施例中,生物反应器是 DASGIP AG 生物反应器,体积 4.0,2009 年 5 月,且生物反应器制备是基于 DASGIP 控制 4.0 用户手册。在一些实施例中,遵循溶解氧进料策略,如实例部分中所述且如李(Lee)(1996)生物技术趋势(Trends in Biotechnology),14(3):98-105 中进一步讨论。

[0479] 在一些实施例中,重组蛋白质表达在 LacI 启动子控制下且通过添加 IPTG 来诱导。应了解,其它诱导型启动子也与本发明的各方面相容。可根据多种程序收获细胞,如所属领域技术人员所熟悉。例如,可通过蠕动泵系统收获细胞,如实例部分中进一步阐述。

[0480] 根据本发明各方面,生成用于无细胞产生工艺的澄清裂解物。可根据多种程序裂解细胞,如所属领域技术人员所熟悉。在一些实施例中,在收获后,使用(例如)奥维斯汀 EmulsiFlex-C3 高压匀浆器(奥维斯汀公司(Avestin, Inc.),渥太华,安大略省,加拿大)以 20,000psi 通过单程匀浆裂解细胞。在一些实施例中,对裂解物实施第二次和任选地进一步匀浆进程。然后通过离心使全细胞裂解物澄清,其中在收获上清液中获得澄清裂解物。在一些实施例中,无细胞反应是通过向澄清裂解物添加底物和辅因子来起始。尽管在实例部分中提供了用于细胞培养、收获和无细胞反应的代表性程序,但应了解,所属领域技术人员可对所述方案进行优化。

[0481] 医药组合物

[0482] 本发明还提供医药组合物,其包含通过上述无细胞系统制备的碳青霉烯(例如式(I)化合物)和任选地医药上可接受的赋形剂。

[0483] 医药上可接受赋形剂包括适合于所需具体剂型的任一和所有溶剂、稀释剂、或其它液体媒剂、分散或悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠或乳化剂、防腐剂、固体粘合剂、润滑剂等。医药组合物的调配和/或制造中的一般考虑可参见(例如)雷明顿氏制药科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第 16 版,E.W. 马丁(E.W. Martin)(迈克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚州,1980);和雷明顿:制造科学与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy),第 21 版(利平科特威廉姆斯与威尔金斯(Lippincott Williams&Wilkins),2005)。

[0484] 本文所述的医药组合物可通过制药领域已知的任何方法来制备。一般来说,所述

制备方法包括以下步骤：使式 (I) 化合物（“活性成份”）与一种或一种以上赋形剂和 / 或一种或一种以上其它附属成份结合，然后如果需要和 / 或期望，将产物成形和 / 或包装为所需的单一或多剂量单位。

[0485] 医药组合物可以散装形式、以单一单位剂量和 / 或以多个单一单位剂量制备、包装和 / 或销售。如本文所用的“单位剂量”是包含预定量活性成份的个别量的医药组合物。活性成份的量一般等于将投与个体的活性成份的剂量和 / 或此一剂量的方便部分，例如此一剂量的一半或三分之一。

[0486] 医药组合物中的活性成份、医药上可接受的赋形剂和 / 或任何其它成份的相对量将根据所治疗个体的属性、大小和 / 或情况而变化，且进一步根据投与组合物的途径而变化。举例来说，组合物可包含介于 0.1% 与 100% (w/w) 之间的活性成份。

[0487] 用于制造所提供医药组合物的医药上可接受的赋形剂包括惰性稀释剂、分散和 / 或成粒剂、表面活性剂和 / 或乳化剂、崩解剂、粘合剂、防腐剂、缓冲剂、润滑剂和 / 或油。诸如以下等赋形剂也可存于组合物中：可可脂和栓剂蜡、着色剂、涂布剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。

[0488] 实例性稀释剂包括（但不限于）碳酸钙、碳酸钠、磷酸钙、磷酸二钙、硫酸钙、磷酸氢钙、磷酸钠、乳糖、蔗糖、纤维素、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、山梨醇、肌醇、氯化钠、干淀粉、玉米淀粉、糖粉等和其组合。

[0489] 实例性成粒和 / 或分散剂包括（但不限于）马铃薯淀粉、玉米淀粉、木薯淀粉、淀粉羟乙酸钠、粘土、藻酸、瓜尔胶、柑橘果肉、琼脂、皂粘土、纤维素和木质产物、天然海绵、阳离子交换树脂、碳酸钙、硅酸盐、碳酸钠、交联聚（乙烯-吡咯烷酮）（交联维酮）、羧甲基淀粉钠（淀粉羟乙酸钠）、羧甲基纤维素、交联羧甲基纤维素钠（交联羧甲纤维素）、甲基纤维素、预胶化淀粉（淀粉 1500）、微晶淀粉、水不溶性淀粉、羧甲基纤维素钙、硅酸镁铝（瓦格姆（Veegum））、月桂基硫酸钠、季铵化合物等和其组合。

[0490] 实例性表面活性剂和 / 或乳化剂包括（但不限于）天然乳化剂（例如阿拉伯胶、琼脂、藻酸、藻酸钠、黄蓍胶、克罗珠克（chondrux）、胆固醇胶、黄原胶、果胶、明胶、蛋黄、酪蛋白、羊毛脂、胆固醇胶、蜡和卵磷脂）、胶状粘土（例如皂粘土（硅酸铝）和瓦格姆（硅酸镁铝））、长链氨基酸衍生物、高分子量醇（例如硬脂醇、鲸蜡醇、油醇、单硬脂酸三醋汀、乙二醇二硬脂酸酯、甘油单硬脂酸酯和丙二醇单硬脂酸酯、聚乙烯醇）、卡波姆（carbomer）（例如羧聚乙烯、聚丙烯酸、丙烯酸聚合物和聚羧乙烯）、角叉菜胶、纤维素衍生物（例如羧甲基纤维素钠、纤维素粉、羟基甲基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、甲基纤维素）、山梨糖醇酐脂肪酸酯（例如聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯（吐温（Tween）20）、聚氧乙烯山梨糖醇酐（吐温 60）、聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯（吐温 80）、山梨糖醇酐单棕榈酸酯（司盘（Span）40）、山梨糖醇酐单硬脂酸酯（司盘 60）、山梨糖醇酐三硬脂酸酯（司盘 65）、甘油单油酸酯、山梨糖醇酐单油酸酯（司盘 80））、聚氧乙烯酯（例如聚氧乙烯单硬脂酸酯（卖泽（Myrj）45）、聚氧乙烯氢化蓖麻油、聚乙氧基化蓖麻油、聚甲醛硬脂酸酯和溶醇（Solutol））、蔗糖脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯（例如克列莫佛（Cremophor））、聚氧乙烯醚、（例如聚氧乙烯月桂基醚（布里杰（Brij）30））、聚（乙烯-吡咯烷酮）、二乙二醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、油酸钠、油酸钾、油酸乙酯、油酸、月桂酸乙酯、月桂基硫酸钠、普流尼克（Pluronic）F68、泊洛沙姆（Poloxamer）188、西曲溴铵（cetrimonium bromide）、

西吡氯铵 (cetylpyridinium chloride)、苯扎氯铵 (benzalkonium chloride)、多库酯钠 (docusate sodium) 等和 / 或其组合。

[0491] 实例性粘合剂包括（但不限于）淀粉（例如玉米淀粉和淀粉糊剂）、明胶、糖（例如蔗糖、葡萄糖、右旋糖、糊精、糖蜜、乳糖、拉克替醇（lactitol）、甘露醇等）、天然和合成树胶（例如阿拉伯胶、藻酸钠、鹿角菜提取物、潘瓦胶（panwar gum）、印度胶（ghatti gum）、伊莎贝（isapol）果壳粘液、羧甲基纤维素、甲基纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、乙酸纤维素、聚（乙烯-吡咯烷酮）、硅酸镁铝（瓦格姆）和落叶松阿拉伯半乳聚糖）、藻酸酯、聚氧化乙烯、聚乙二醇、无机钙盐、硅酸、聚甲基丙烯酸酯、蜡、水、醇等和/或其组合。

[0492] 实例性防腐剂包括（但不限于）抗氧化剂、螯合剂、抗微生物防腐剂、抗真菌防腐剂、醇防腐剂、酸性防腐剂和其它防腐剂。

[0493] 实例性抗氧化剂包括（但不限于） α 生育酚、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、硫代甘油、偏重亚硫酸钾、丙酸、没食子酸丙酯、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、偏重亚硫酸钠和亚硫酸钠。

[0494] 实例性螯合剂包括（但不限于）乙二胺四乙酸（EDTA）和其盐和水合物（例如，依地酸钠、依地酸二钠、依地酸三钠、依地酸二钠钙、依地酸二钾等）、柠檬酸和其盐和水合物（例如，一水合柠檬酸）、富马酸和其盐和水合物、苹果酸和其盐和水合物、磷酸和其盐和水合物和酒石酸和其盐和水合物。实例性抗微生物防腐剂包括苯扎氯铵、苄索氯铵（benzethonium chloride）、苯甲醇、溴硝丙二醇（bronopol）、溴化十六烷基三甲铵（cetrimide）、西吡氯铵、氯己定（chlorhexidine）、三氯叔丁醇、氯甲酚、氯二甲酚（chloroxylenol）、甲酚、乙醇、甘油、海克替啶（hexetidine）、咪脲（imidurea）、苯酚、苯氧乙醇、苯乙基醇、硝酸苯汞、丙二醇和硫柳汞。

[0495] 实例性抗真菌防腐剂包括（但不限于）对羟基苯甲酸丁酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸、羟基苯甲酸、苯甲酸钾、山梨酸钾、苯甲酸钠、丙酸钠和山梨酸。

[0496] 实例性醇防腐剂包括（但不限于）乙醇、聚乙二醇、苯酚、酚类化合物、双酚、三氯叔丁醇、羟基苯甲酸酯和苯乙醇。

[0497] 实例性酸性防腐剂包括（但不限于）维生素 A、维生素 C、维生素 E、β-胡萝卜素、柠檬酸、乙酸、脱氢乙酸、抗坏血酸、山梨酸和植酸。

[0498] 其它防腐剂包括生育酚、生育酚乙酸酯、甲磺酸去脞酯 (deteroxime mesylate)、溴化十六烷基三甲铵、丁基化羟基苯甲醚 (BHA)、丁基化羟基甲苯 (BHT)、乙二胺、月桂基硫酸钠 (SLS)、月桂基醚硫酸钠 (SLES)、亚硫酸氢钠、偏重亚硫酸钠、亚硫酸钾、偏重亚硫酸钾、嘉兰丹 + (Glydant Plus)、极美 (Phenonip)、甲基对羟基苯甲酸酯、杰玛 (Germall) 115、杰玛苯 (Germaben) II、尼奥龙 (Neolone)、卡松 (Kathon) 和优客索 (Euxyl)。

[0499] 实例性缓冲剂包括（但不限于）柠檬酸盐缓冲溶液、乙酸盐缓冲溶液、磷酸盐缓冲溶液、氯化铵、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、D- 葡萄糖酸、甘油磷酸钙、乳酸钙、丙酸、戊酮酸钙、戊酸、二碱式磷酸钙、磷酸、三碱式磷酸钙、羟基磷灰石 (calcium hydroxide phosphate)、乙酸钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、钾混合物、二碱式磷酸钾、一碱式磷酸钾、磷酸钾混合物、乙酸钠、碳酸氢钠、氯化钠、柠檬酸钠、乳酸钠、二碱式

磷酸钠、一碱式磷酸钠、磷酸钠混合物、氨丁三醇 (tromethamine)、氢氧化镁、氢氧化铝、藻酸、无热原水、等渗盐水、林格氏溶液 (Ringer's solution)、乙醇等和其组合。

[0500] 实例性润滑剂包括 (但不限于) 硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸、二氧化硅、滑石粉、麦芽、甘油山嵛酸酯、氢化植物油、聚乙二醇、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠、亮氨酸、月桂基硫酸镁、月桂基硫酸钠等和其组合。

[0501] 实例性天然油包括 (但不限于) 杏仁油、杏桃核仁油、鳄梨油、巴巴苏油、佛手柑油、黑醋栗种油、琉璃苣油、刺楸油、甘菊油、芸苔油、葛缕子油、腊棕榈油、蓖麻油、桂皮油、可可脂油、椰油、鱼肝油、咖啡油、玉米油、棉籽油、鸕鹚油、桉树油、月见草油、鱼油、亚麻籽油、香叶醇油、葫芦油、葡萄籽油、榛子油、海索油、肉豆蔻酸异丙酯、荷荷巴油、夏威夷果油、杂薰衣草油、薰衣草油、柠檬油、萆澄茄油、澳洲坚果油、锦葵油、芒果籽油、白芒果花籽油、貂油、肉豆蔻油、橄榄油、橙皮油、深海鱼油、棕榈油、棕榈核仁油、桃核仁油、花生油、罂粟籽油、南瓜籽油、油菜籽油、米糠油、迷迭香油、红花油、檀香油、山茶花油、欧洲薄荷油、沙棘油、芝麻油、乳木果油、硅酮油、大豆油、向日葵油、茶树油、菊油、黄金椿油、岩兰油、胡桃油和小麦胚油。实例性合成油包括 (但不限于) 硬脂酸丁酯、辛酸甘油三酯、癸酸三甘油酯、环甲硅油、癸二酸二乙酯、二甲硅油 360、肉豆蔻酸异丙酯、矿物油、辛基十二烷醇、油醇、硅油和其组合。

[0502] 用于经口和非经肠投与的液体剂型包括医药上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。除了活性成份以外, 液体剂型还可包含业内常用的惰性稀释剂, 例如水或其它溶剂; 增溶剂和乳化剂, 例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油 (例如, 棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇酐的脂肪酸酯和其混合物。除了惰性稀释剂以外, 经口组合物还可包括诸如以下等佐剂: 润湿剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、矫味剂和芳香剂。在某些实施例中, 对于非经肠投与, 将活性成份与增溶剂混合, 例如克列莫佛™、醇、油、改质油、二醇、聚山梨酯、环糊精、聚合物和其组合。

[0503] 可根据已知技术使用适宜分散或润湿剂和悬浮剂来调配可注射制剂, 例如无菌可注射水性或油性悬浮液。无菌可注射制剂可为于无毒非经肠可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液、悬浮液或乳液, 例如 1,3-丁二醇溶液。可采用的可接受的媒剂和溶剂为水、林格氏溶液、U. S. P. 和等渗氯化钠溶液。另外, 通常采用无菌不挥发性油作为溶剂或悬浮介质。出于此目的, 可采用包括合成甘油单酸酯或甘油二酸酯的任何温和的不挥发性油。另外, 在可注射制剂中使用诸如油酸等脂肪酸。

[0504] 可注射调配物可通过 (例如) 经由细菌截留过滤器过滤或通过纳入杀菌剂来进行灭菌, 所述杀菌剂呈可在使用前溶解或分散于无菌水或其它无菌可注射介质中的无菌固体组合物形式。

[0505] 用于经直肠或阴道投与的组合物通常为栓剂, 其可通过将活性成份与适宜非刺激性赋形剂或载剂 (例如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡) 混合来制备, 所述赋形剂或载剂在环境温度下为固体但在体温下为液体且因此可在直肠或阴道腔内融化并释放活性成份。

[0506] 用于经口投与的固体剂型包含胶囊、片剂、丸剂、粉剂和颗粒。在所述固体剂型中, 将活性成份与至少一种医药上可接受的惰性赋形剂 (例如, 柠檬酸钠或磷酸二钙) 和 / 或以下物质混合: a) 填充剂或扩充剂, 例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸, b) 粘合

剂,例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶,c) 保湿剂,例如甘油,d) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠,e) 溶液阻滞剂,例如石蜡,f) 吸收促进剂,例如季铵化合物,g) 润湿剂,例如鲸蜡醇单硬脂酸酯和甘油单硬脂酸酯,h) 吸收剂,例如高岭土和皂粘土,和 i) 润滑剂,例如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠和其混合物。在胶囊、片剂和丸剂情形中,剂型可包含缓冲剂。

[0507] 在使用诸如乳糖 (lactose) 或乳糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软质和硬质填充明胶胶囊中,可采用类似类型的固体组合物作为填充剂。片剂、糖衣剂、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可制备有包衣和外壳,例如肠溶包衣和医药调配技术中熟知的其它包衣。其可任选地含有遮光剂且可为任选地以延迟方式仅在或优先在肠道的某一部分中释放活性成份的组合物。可用包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。在使用诸如乳糖 (lactose) 或乳糖 (milk sugar) 以及高分子量聚乙二醇等赋形剂的软质和硬质填充明胶胶囊中,可采用类似类型的固体组合物作为填充剂。

[0508] 活性成份还可呈具有一种或一种以上上述赋形剂的微囊封形式。片剂、糖衣剂、胶囊、丸剂和颗粒的固体剂型可制备有包衣和外壳,例如肠溶包衣、释放控制包衣和医药调配技术中熟知的其它包衣。在所述固体剂型中,可将活性成份与至少一种惰性稀释剂(例如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。所述剂型可如通常作法一样包含除惰性稀释剂以外的其它物质,例如压片润滑剂和其它压片助剂(例如硬脂酸镁和微晶纤维素)。在胶囊、片剂和丸剂的情形中,所述剂型可包含缓冲剂。其可任选地包含遮光剂,且可为任选地以延迟方式仅在或优先在肠道的某一部分中释放活性成份的组合物。可用包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。

[0509] 用于局部和/或经皮投与的剂型可包括软膏剂、糊剂、乳霜、洗液、凝胶、粉剂、溶液、喷雾剂、吸入剂和/或贴剂。通常,在可能需要时,在无菌条件下将活性成份与医药上可接受的赋形剂和/或所需任何防腐剂和/或缓冲液混合。

[0510] 用于递送本文所述真皮内医药组合物的适宜装置包括短针装置,例如那些在美国专利 4,886,499、5,190,521、5,328,483、5,527,288、4,270,537、5,015,235、5,141,496 和 5,417,662 中所述者。真皮内组合物可通过限制针进入皮肤中的有效刺入长度的装置来投与,例如那些在 PCT 公开案 W099/34850 中阐述者和其功能等效装置。通过液体喷射注射器和/或通过刺穿角质层并产生到达真皮的射流的针将液体疫苗递送到真皮的喷射注射装置是适宜的。喷射注射装置阐述于(例如)以下文献中:美国专利 5,480,381、5,599,302、5,334,144、5,993,412、5,649,912、5,569,189、5,704,911、5,383,851、5,893,397、5,466,220、5,339,163、5,312,335、5,503,627、5,064,413、5,520,639、4,596,556、4,790,824、4,941,880、4,940,460 以及 PCT 公开案 W097/37705 和 W097/13537。使用压缩气体加速呈粉剂形式的疫苗穿过皮肤外层到达真皮的弹道粉剂/粒子递送装置是适宜的。或者或另外,可在真皮内投与的经典芒图(mantoux)方法中使用常用注射器。

[0511] 适合局部投与的调配物包括(但不限于)液体和/或半液体制剂,例如搽剂、洗液、水包油和/或油包水乳液(例如乳霜、软膏剂和/或糊剂)和/或溶液和/或悬浮液。可局部投与的调配物可包含(例如)约 1%到约 10% (w/w) 的活性成份,但活性成份的浓度可与所述活性成份在溶剂中的溶解度限值一样高。用于局部投与的调配物可进一步包含

一种或一种以上本文所述的其它成份。

[0512] 医药组合物可在适于通过颊腔经肺投与的调配物中制备、包装和 / 或销售。此一调配物可包含干粒子,所述干粒子包含活性成份且直径在约 0.5 纳米到约 7 纳米或约 1 纳米到约 6 纳米范围内。所述组合物方便地呈干粉剂形式以供使用包含干粉剂储仓(可将推进剂流引导到所述储仓以分散所述粉剂)的装置投与和 / 或使用自推进溶剂 / 粉剂分散容器(例如在密封容器中包含溶解和 / 或悬浮于低沸点推进剂中的活性成份的装置)投与。所述粉剂包含粒子,其中至少 98 重量%粒子的直径大于 0.5 纳米,且至少 95 数量%粒子的直径小于 7 纳米。或者,至少 95 重量%粒子的直径大于 1 纳米,且至少 90 数量%粒子的直径小于 6 纳米。干粉剂组合物可包括诸如糖等固体细粉剂稀释剂且方便地以单位剂型来提供。

[0513] 低沸点推进剂一般包括在大气压下沸点低于 65° F 的液体推进剂。通常,推进剂可构成组合物的 50%到 99.9% (w/w),且活性成份可构成组合物的 0.1%到 20% (w/w)。推进剂可进一步包含其它成份,例如液体非离子型和 / 或固体阴离子型表面活性剂和 / 或固体稀释剂(其粒径可与包含活性成份的例子在同一数量级)。

[0514] 经调配用于经肺递送的医药组合物可提供呈溶液和 / 或悬浮液的微滴形式的活性成份。所述调配物可以水性和 / 或稀释醇溶液和 / 或悬浮液形式制备、包装和 / 或销售,任选地无菌,包含活性成份,且可方便地使用任何喷雾和 / 或雾化装置来投与。所述调配物可进一步包含一种或一种以上其它成份,包括(但不限于)矫味剂(例如糖精钠)、挥发性油、缓冲剂、表面活性剂和 / 或防腐剂(例如羟基苯甲酸甲酯)。通过此投与途径提供的微滴的平均直径可在约 0.1 纳米到约 200 纳米范围内。

[0515] 可用于经肺递送的本文所述调配物还可用于鼻内递送。适于鼻内投与的另一调配物是包含活性成份且平均粒径为约 0.2 微米到 500 微米的粗粉剂。此一调配物是通过从保持在鼻孔附近的粉剂容器经鼻道通过快速吸入来投与。适于经鼻投与的调配物可包含(例如)约少到 0.1% (w/w) 且多到 100% (w/w) 的活性成份,且可包含一种或一种以上本文所述的其它成份。

[0516] 本发明医药组合物可在适于经颊投与的调配物中制备、包装和 / 或销售。所述调配物可呈(例如)使用常用方法制造的片剂和 / 或锭剂形式,且可含有(例如)0.1%到 20% (w/w) 活性成份,其余部分包含经口可溶解和 / 或可降解组合物以及任选地一种或一种以上本文所述其它成份。或者,适于经颊投与的调配物可包含粉剂和 / 或包含活性成份的气溶胶化和 / 或雾化溶液和 / 或悬浮液。所述粉剂化、气溶胶化和 / 或气溶胶化调配物在分散时平均粒径和 / 或滴径可在约 0.1 纳米到约 200 纳米范围内,且可进一步包含一种或一种以上本文所述的其它成份。

[0517] 本发明医药组合物可在适于经眼投与的调配物中制备、包装和 / 或销售。所述调配物可呈(例如)眼滴剂形式,包括(例如)0.1/1.0% (w/w) 活性成份于水性或油性液体载剂中的溶液和 / 或悬浮液。所述滴剂可进一步包含缓冲剂、盐和 / 或另外一种或一种以上本文所述其它成份。其它可用的可经眼投与的调配物包括那些以微晶形式和 / 或在脂质体制剂中包含活性成份者。预期耳滴剂和 / 或眼滴剂在本发明范围内。

[0518] 尽管对本文所提供医药组合物的说明主要涉及适合投与人类的医药组合物,但所属领域技术人员应理解,所述组合物一般适合投与所有种类的动物。为使适合投与人类的

医药组合物适合投与各种动物而对所述组合物进行的修饰广为人知,且普通熟练的兽医药理学家可用普通实验设计和/或执行所述修饰。医药组合物的调配和/或制造中的一般考虑可参见(例如)雷明顿:制造科学与实践,第21版,利平科特威廉姆斯与威尔金斯,2005。

[0519] 本发明另外涵盖医药包和/或试剂盒。所提供的医药包和/或试剂盒可包含医药组合物和容器(例如,小瓶、安瓿、瓶、注射器和/或分配器包或其它适宜容器)。在一些实施例中,包和/或试剂盒可任选地进一步包括另一容器,其包含适用于使医药组合物稀释或悬浮的医药赋形剂以为投与个体作准备。任选地,在本发明的所述试剂盒中另外提供使用说明书。所述说明书一般可提供(例如)剂量和投与的说明书。在其它实施例中,说明书可另外提供关于用于投与的具体容器和/或系统的专用说明书的其它详情。另外,说明书可提供与另一疗法结合和/或组合使用的专用说明书。

[0520] 治疗和投与方法

[0521] 本发明还提供治疗细菌感染的方法,其包含向有需要的个体投与治疗有效量的通过上述无细胞方法制备的碳青霉烯(例如式(I)化合物)或其组合物。

[0522] 细菌感染包括好氧细菌、厌氧细菌、革兰氏阳性细菌以及革兰氏阴性细菌的感染。实例性细菌感染包括(但不限于)革兰氏阳性细菌(例如,葡萄球菌(*Staphylococcus*)、链球菌、梭菌、利斯特菌(*Listeria*)、棒状菌(*Corynebacteria*)或芽孢杆菌感染)或革兰氏阴性细菌(例如,大肠杆菌、沙门菌(*Salmonella*)、志贺菌(*Shigella*)、假单胞菌、摩拉克氏菌(*Moraxella*)、螺杆菌(*Helicobacter*)、狭长平胞菌、水蛭弧菌(*Bdellovibrio*)、乙酸细菌、军团病杆菌(*Legionella*)、沃尔巴克体(*Wolbachia*)、奈瑟球菌(*Neisseria*)、嗜血杆菌(*Hemophilus*)或克雷伯氏菌(*Klebsiella*)感染)的感染。在某些实施例中,细菌感染是假单胞菌感染。在某些实施例中,假单胞菌感染是铜绿假单胞菌感染,医院感染的主要因素之一。

[0523] 预期向其投与的“个体”包括(但不限于)人类(即,任何年龄组的男性或女性,例如儿科个体(例如婴儿、儿童、青少年)或成年个体(例如,年轻成人、中年成人或年长成人))和/或其它灵长类动物(例如,食蟹猴、罗猴);哺乳动物,包括商业相关哺乳动物,例如牛、猪、马、绵羊、山羊、猫和/或狗;和/或鸟类,包括商业相关的鸟类,例如鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0524] 如本文所用且除非另外指明,否则术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”预期在个体经受感染时发生的作用,其降低感染的严重性或延迟或减慢感染的进展。

[0525] 如本文所用且除非另外指明,否则化合物的“治疗有效量”是足以在感染的治疗或管控中提供治疗益处,或延迟或最小化一个或一个以上与感染相关的症状的量。化合物的治疗有效量的意指单独或其它疗法组合的治疗剂在感染的治疗或管控中提供治疗益处的量。术语“治疗有效量”可涵盖改善总体疗法、减少或避免感染的症状或病因或增强另一治疗剂的治疗功效的量。

[0526] 本文所提供的化合物和组合物可通过任一途径来投与,包括经口、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、皮下、心室内、经皮、真皮内、经直肠、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉剂、软膏剂、乳霜和/或滴剂)、经粘膜、经鼻、经颊、肠内、舌下;通过气管内滴注、支气管滴注和/或吸入;和/或作为经口喷雾剂、经鼻喷雾剂和/或气溶胶形式。明确预期的途径是

全身静脉内注射、通过血液和 / 或淋巴供应局部投与和 / 或经口投与。一般来说,最适宜的投与途径将取决于多种因素,包括药剂性质(例如,其在胃肠道环境中的稳定性)、个体的情况(例如,个体是否能耐受经口投与)等。

[0527] 本文所提供的化合物和组合物通常是以易于投与且剂量均匀的剂量单位形式来调配。然而,应理解,本发明组合物的总日用量应由主治医生在合理的医学判断范围内决定。任一具体患者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗感染和所述感染的严重性;所用特定活性成份的活性;所用特定组合物;个体的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;所用特定活性成份的投与时间、投与途径和排泄速度;治疗的持续时间;与所用特定活性成份组合或同时使用的药物;以及医学技术中熟知的类似因素。可按以下方案递送所需剂量:一天三次、一天两次、一天一次、每隔一天、每隔两天、每周、每两周、每三周或每四周。在某些实施例中,可使用多次投与(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 14 次以上投与)来递送所需剂量。

[0528] 在某些实施例中,的一天一次或一次以上投与 70kg 成年人类的化合物的治疗有效量可包含每单位剂型约 0.0001mg 到约 3000mg、约 0.0001mg 到约 2000mg、约 0.0001mg 到约 1000mg、约 0.001mg 到约 1000mg、约 0.01mg 到约 1000mg、约 0.1mg 到约 1000mg、约 1mg 到约 1000mg、约 1mg 到约 100mg、约 10mg 到约 1000mg 或约 100mg 到约 1000mg 本发明化合物。应了解,如本文所述的剂量范围为向成人投与所提供的医药组合物提供指导。待投与(例如)儿童或青少年的量可由开业医师或所属领域技术人员决定且可低于或等于投与成人的量。

[0529] 还应了解,如本文所述的化合物或组合物可与一种或一种以上其它治疗活性剂组合投与。所述化合物或组合物可与一种或一种以上其它治疗活性剂同时、在其之前或在其之后投与。一般来说,每一药剂将以所决定用于所述药剂的剂量和 / 或时间方案来投与。另外应了解,在此组合中所用的另一治疗活性剂可与单一组合物一起投与或在不同组合物中分开投与。方案中所用的具体组合将考虑到本发明化合物与另一治疗活性剂的相容性和 / 或要实现的所需治疗效应。一般来说,期望组合物中所用其它治疗活性剂是以不超过其个别利用时的水平的水平来利用。在一些实施例中,组合中所用水平将低于个别利用时的水平。

[0530] 所述化合物或组合物可与改良其生物利用度、降低和 / 或改良其代谢、抑制其排泄和 / 或改良其在体内的分布的药剂组合投与。还应了解,所用疗法可对相同病症实现所需效应(例如,化合物可与抗炎剂、抗焦虑剂和 / 或抗抑郁剂等组合投与)和 / 或其可实现不同效应(例如,控制不良副作用)。

[0531] 在一个特定实施例中,式(I)化合物(例如亚胺培南)可与脱氢肽酶抑制剂(例如西司他丁(cilastatin))组合投与。

[0532] 实例

[0533] 为了可更全面地了解本文所述的本发明,阐述以下实例。应理解,这些实例仅用于阐释性目的且不应视为以任何方式限制本发明。

[0534] 碳青霉烯的无细胞合成

[0535] 首先在经遗传改造的快速生长的大肠杆菌株系中表达催化从经济底物到所需产物的有效生物转化所需的关键酶(例如,参见表 1 和 2 中列示的酶)。本发明的这一方

面利用大肠杆菌的区室化结构在细胞质中产生大部分所需路径酶,且关键入口酶(即,产物所需指定代谢路径中的第一个酶)经靶向在周质中产生。例如,参见 PCT 公开案 W02010/074760;其是以引用方式并入本文中。此确保在完整生物体中所述路径未被活化(或最低活化),从而维持稳健生长和代谢健康。细胞在经设计具有高输氧率和热移除率的发酵罐中快速生长到相对较高的细胞密度。在收获前,诱导培养物以产生靶向到细胞质和周质二者的过表达蛋白质。

[0536] 亚胺培南的实例性无细胞合成. 路径步骤 a-f 催化从谷氨酸和葡萄糖形成异源路径底物谷氨酸半醛和乙基丙二酰基-辅酶 A,且涉及天然大肠杆菌酶(步骤 a、b、c 和 e)或已显示在大肠杆菌中具有功能的酶(步骤 d、f)。步骤 a 和 b 催化从谷氨酸形成谷氨酸半醛。步骤 c 包括糖酵解路径并从葡萄糖供应乙酰基-辅酶 A。步骤 d-f 是从乙酰基-辅酶 A ($R^2 = -CH_2CH_3$) 产生乙基丙二酰基-辅酶 A 所需的。显示来自球形红杆菌的乙酰基-辅酶 A 乙酰基转移酶(步骤 d)和巴豆酰基-辅酶 A 还原酶(步骤 f)可分别催化从大肠杆菌中的乙酰基-辅酶 A、巴豆酰基-辅酶 A 和 CO_2 形成乙酰乙酰基-辅酶 A 和乙基丙二酰基-辅酶 A。例如,参见佐藤(Sato)等人,生物科学与生物工程杂志(2007)103:38-44;厄尔布(Erb)等人,美国国家科学院院刊(2007)104:10631-10636;厄尔布等人,美国国家科学院院刊(2009)106:8871-8876。另外,可在大肠杆菌中从乙酰乙酰基-辅酶 A(步骤 e)使用天然大肠杆菌 FadB 或其它异源酶产生巴豆酰基-辅酶 A。例如,参见敦美(Atsumi)等人,代谢工程(Metab. Eng.) (2008)10:305-311。从谷氨酸半醛和乙基丙二酰基辅酶 A 到亚胺培南的路径(步骤 1-5)组合来自噻烯霉素和碳青霉烯生物合成路径二者的酶。例如,参见威廉森(Williamson)等人,生物化学杂志(J Biol Chem)(1985)260:4637-4647;斯德潘等人,美国化学学会会志(2003)125:15746-15747;罗德里格斯(Rodriguez)等人,抗生素杂志(JAntibiot)(2010)63:135-138;罗德里格斯等人,分子微生物学(Mol Microbiol)(2008)69:633-645;和表 2 中引用的参考文献。

[0537] 根据上文说明的指导预期其它碳青霉烯化合物,例如,参见图 9A-9H。可从葡萄糖和甘氨酸提供所预期的一种具体碳青霉烯中间体(参见图 3-5A 与 9D 的组合)。关键步骤包括使用苏氨酸醛缩酶从甘氨酸和丙二酸半醛产生 3-羟基谷氨酸以及从 3-羟基谷氨酸半醛和乙基丙二酰基-CoA 形成碳青霉烯核心。例如,参见里瓦(Riva)等人,四面体(2008)64:5079。

[0538] C2 侧链的附接

[0539] 在到噻烯霉素的卡特利链霉菌路径中,假定由 ThnV 催化将泛酰巯基乙胺在 C-2 位置附接到碳青霉烯核。例如,参见努涅斯等人,化学与生物学(2003)10:301-311。已提出 ThnV 可基于与谷胱甘肽转移酶的序列相似性催化在碳青霉烯核的 C-2 位置的含硫醇侧链的缩合。此假说可通过以下方式来测试:在大肠杆菌中表达 thnV 基因(经密码子优化以供在大肠杆菌中表达)并评价异源蛋白质偶联泛酰巯基乙胺与碳青霉烯核($R^2 = CH_2CH_3$)的能力。编码 ThnV 的基因的序列(从 EMBL 以登录号 AJ421798 获得)可化学合成且可经修饰以包括 C-末端和 N-末端 6×His 标签用于通过固定金属亲和色谱来纯化。由于卡特利链霉菌基因组的高(>70%)GC 含量,thnV 基因可经密码子优化以在大肠杆菌中表达。可将合成基因亚克隆到赋予 C-末端和 N-末端 6×His 标签的表达载体中。由于可从市场购得(诺瓦根公司(Novagen, Inc.)),易于亚克隆且对基因表达具有严格控制,pDuet 家族的载

体可用于合成基因的基于 T7 的表达。可通过使用不同水平的异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷 (IPTG) 以及通过在不同载体之间使用拷贝数变化 (pDuet 载体都共享相同的表达机制, 但拷贝数在约 10 拷贝 / 细胞到 >100 拷贝 / 细胞范围内变化) 来改变表达水平。可用含有亚克隆基因的质粒转换大肠杆菌株系 BL21 (DE3), 且转换体可使用适当抗生素来选择。可使培养物在成份确定的加富培养基中生长到中间光学密度 (OD_{600} 0.5-1), 之后用 0.1-1mM IPTG 诱导表达。然后可收获并浓缩细胞, 之后使用高压匀浆器来裂解。全长蛋白质的表达可通过变性蛋白质凝胶电泳用适当标准物来确以。

[0540] 可以化学或酶促方式通过相应硫醇的迈克尔加成附接 C2 基团 (例如, $-SR^8$ 基团)。实例性 C2 基团包括 (但不限于) 泛酰巯基乙胺和 N-亚胺甲基半胱胺以及本文中阐述的其它基团 (例如, 参见图 6)。泛酰巯基乙胺可如曼德尔 (Mandel) 等人, 有机化学通讯 (Org Lett) (2004) 6:4801-4803 中所述来制备。N-亚胺甲基半胱胺可如美国专利第 4,292,436 号和第 4,329,481 号中所述来制备。可通过在二氯甲烷存在下氧化再引入 C2-C3 双键 (参见贝特森 (Bateson), 上述文献)。C2 基团还可通过捕获烯醇形式, 之后进行迈克尔加成且随后进行消除来附接。例如, 参见拉贝赛达 (Rabasseda) 等人, 未来药物 (Drugs Fut) (1994) 19:631 和 US20090312539。

[0541] 基因的化学合成

[0542] 编码表 3 中所列示酶的基因可以化学方式合成, 且经密码子优化以在大肠杆菌中表达。基因可合成有 C-末端和 N-末端 $6 \times His$ 标签以供纯化所表达蛋白质。可在每一酶促步骤 1-3 中测试来自胡萝卜果胶杆菌的酶 (CarB、CarA、CarC) 和来自卡特利链霉菌的同系物 (ThnE、ThnM、ThnG)。

[0543]

表 3: 从化学合成的基因表达/纯化的酶的列表

步骤	酶	说明	生物体	基因库
1	CarB	羧甲基脯氨酸合酶	胡萝卜果胶杆菌	AAD38230.1
1	ThnE	羧甲基脯氨酸合酶	卡特利链霉菌	CAD18973.1
2	CarA	碳青霉烷合成酶	胡萝卜果胶杆菌	AAD38229.1
2	ThnM	b-内酰胺合成酶	卡特利链霉菌	CAD18981.1
3	CarC	碳青霉烯合酶	胡萝卜果胶杆菌	AAD38231.1
3	ThnG	假想碳青霉烯合酶	卡特利链霉菌	CAD18975.1

[0544] 底物的化学合成

[0545] 已从 4-烯丙基-阿扎他定 (azatidin)-2 酮、4-烯丙基-3-甲基阿扎他定-2 酮和 4-烯丙基-3-乙基阿扎他定-2 酮分别制备天然碳青霉烯 ($R^2 = H$)、6-甲基碳青霉烯 ($R^2 = CH_3$) 和 6-乙基碳青霉烯 ($R^2 = CH_2CH_3$) 底物。例如, 参见贝特森等人, 化学协会杂志 (J. Chem. Soc.) 珀尔金汇刊 (Perkin Trans.) I (1990) 1793-1801。

[0546] 表 4 列示待化学合成以供测试对非天然底物的酶活性的化合物。其它所需底物 (包括丙二酰基-辅酶 A、ATP 和 2-酮戊二酸) 将从商业供应商获得。

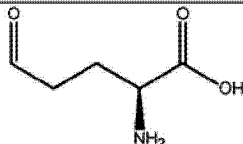
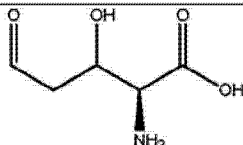
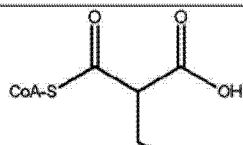
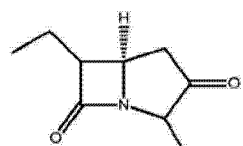
[0547]

表 4: 定制合成化合物的列表

化合物	说明	结构
-----	----	----

[0548]

表 4: 定制合成化合物的列表

化合物		说明	结构
a	(S)-2-氨基-5-氧代戊酸 (谷氨酸半醛)	CarB 的天然底物 (步骤 1)	
b	(2S)-2-氨基-3-羟基-5-氧代戊酸 (3-羟基-谷氨酸半醛)	CarB/ThnE 的所需 底物(步骤 1)	
c	乙基丙二酰基-辅酶 A	CarB/ThnE 的所需 底物(步骤 1)	
d	(5R)-6-乙基-3,7-二氧代-1-氮杂二环 [3.2.0]庚烷-2-甲酸	CarC/ThnG(步骤 3)与 CarB/ThnE 底 物 b、c 的所需产 物	

[0549] 在收到 d 后,执行初始测试已评价化合物的抗生素活性。对抗生素活性的测试将由以下步骤组成:将不同浓度的 d 点涂在灌注有 β -内酰胺敏感的大肠杆菌株系(例如, SC12155、X580)的板上。生长抑制区的外观将确认 d 的抗生素活性,从而使得能简单快速地分析 d 在用所需底物 b 和 c 起始的偶合酶反应中的产生。例如,参见斯利曼和斯科菲尔德(Schofield),生物化学杂志(2004)279:6730。如果没有观察到抗生素活性,那么将使用 LC/MS 分析来检验对非天然底物的酶活性。

[0550] 在收到 a 和丙二酰基-CoA 后,将通过评价偶合 CarB/CarA/CarC 反应的抗生素活性来证实纯化 CarB、CarA 和 CarC 的天然活性。例如,参见斯利曼和斯科菲尔德,生物化学杂志(2004)279:6730。将测试每种蛋白质的 N-末端和 C-末端 6×His 形式二者以及 CarB、CarA 和 CarC 的 Thn 同系物(ThnE、ThnM、ThnG)。

[0551] 一旦证实了 CarB、CarA 和 CarC 酶(以及 Thn 同系物)的天然活性,那么将用底物 b 和 c 测试偶合 CarB/CarA/CarC 反应。将使用抗生素作用(如果 d 具有抗生素活性)和 LC/MS 分析二者来检验 d 的产生。

[0552] 对转移酶作用于化学底物的测试

[0553] 将使用经纯化 ThnV(使用固定镍亲和树脂柱)以及高密度(OD_{600} 约 100)粗裂解物

来制备生化反应物。反应物将在 50mM Tris-HCl (pH7.5) 中以介于 1-5mM 范围内的浓度含有化学合成的泛酰巯基乙胺、N- 亚胺甲基半胱胺和碳青霉烯底物。对酶活性的金属辅因子的要求将通过添加 1-5mM 二价 (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Co^{2+}) 和单价 (K^{+} 、 Na^{+} 和 Li^{+}) 金属来确定。将反应物在 37℃ 下培育 3-15 分钟;例如, 1g/L-h 亚胺培南生产率等效于需要 10min 反应时间获得 50% 底物转化率的 0.05mM 亚胺培南 /min。泛酰巯基乙胺或 N- 亚胺甲基半胱胺到每一碳青霉烯核中的纳入将通过在 300nm 下 (普通碳青霉烯生色团的最高吸光度) 进行 UV 检测的反相高效液相色谱 (HPLC) 中相应反应峰的增加来确定。例如, 参见博德纳等人, 美国化学学会杂志 (J Am. Chem. Soc.) (2010) 132 :12-13 ;迈尔斯 (Myers) 等人, 抗微生物剂化学疗法 (Antimicrob. Agents. Chemother.) (1984) 26 :78-81。非天然 N- 亚胺甲基半胱胺侧链的纳入水平为 5% 指示, 可采用蛋白质进化技术来获得所需产物的较高产率。迈尔斯等人 (上述文献) 报道, 碳青霉烯衍生物通过 HPLC 检测的最低检测限值为 1 μ M, 远低于 1mM 的 5% 或 50 μ M 的最低目标。将收集对应于产物峰的部分并使用电喷射离子化质谱 (ESI-MS) 进行进一步验证。

[0554] 此计划将产生新的低成本制造平台, 其还可有助于通过使用异源酶以及经改造以有效接受非天然底物的酶产生新颖碳青霉烯抗生素。例如, 参见迪特里希 (Dietrich) 等人, ACS 化学生物学 (ACS Chem Biol) (2009) 4 :261-267 ;特里斯沃尔 (Tracewell) 等人, 化学生物学新见 (Curr Opin Chem Biol) (2009) 13 :3-9。

[0555] 细胞生长方法

[0556] 通过用 1ml 经改造株系的解冻工作母液接种 100ml 含有适宜抗生素的 LB 来制备种子培养物。将种子培养物在 300rpm 和 37℃ 下培育 7h。使用种子培养物来接种 1L 成份确定的生长培养基 (例如, 如扎瓦达和斯瓦茨, 生物技术与生物工程 94(4) :618, 2006 中所述)。起始光学密度 (OD) 为 0.03。如下表中所述使用基于 DO 的进料策略;进料溶液在每 200ml 进料中含有 500mg/ml 葡萄糖、0.15% (v/v) BASF Industrol DF204 消泡剂和 7.69mM $MgSO_4$ 。基于 DO 的进料策略是基于以下参考文献:李, SY (Lee, SY), 1996. 大肠杆菌的高细胞密度培养物 (High cell-density culture of *Escherichia coli*). 生物技术趋势. 14, 3, 98-105。通过在光学密度达到 10-20 时添加 0.8mM IPTG 来诱导蛋白质表达 1h。在细胞收获前, 经 0.25-0.5h 将培养物的温度从 37℃ 降低到 10℃, 同时维持搅动、通气和进料。

[0557]

表 5. 发酵工艺参数

温度	37℃
----	-----

[0558]

表 5. 发酵工艺参数

DO 设定值	30%；控制器设定 P=0.20, Ti=300s
DO 级联	控制器级联 0–50% → 500–1100 rpm；50–100% → 21–60% O ₂
pH 设定值	7；自动重置 Yi (未检查)
通气	60 L/h (1 vvm)
搅动	500–1100 rpm (级联)
泵 B	NH ₄ OH 15% (7.4 M)
泵 C	进料溶液；基于 DO 的进料策略：以 40 ml/h 流速进给 6 ml 注射；触发器开启：DO > 55%；触发器关闭：DO < 40%

[0559] 细胞裂解物的制备方法

[0560] 通过在 4℃ 下以 8000×g 离心 30–60min 来收获约 10℃ 培养物。使细胞沉淀在 10–50mM 磷酸钾 (pH8.5) 中再悬浮到光学密度 100–250。

[0561] 在诱导酶积累到最佳水平时，浓缩并裂解培养物，从而释放在周质中表达的关键酶。优化的化学环境将活化通过在细胞裂解期间形成的内膜囊泡催化的呼吸作用。例如，参见朱伊特等人，分子系统生物学 (2008) 4 :220。这将为合成路径提供丰富供应的 ATP 且还将移除过量还原当量以使 NAD⁺ 和 / 或 NADP⁺ 再循环。通过两次 20,000psi 的匀浆器进程裂解细胞（例如，奥维斯汀 EmulsiFlex-C3 高压匀浆器）。将裂解物收集在湿冰上的无菌烧瓶中。如果需要，通过在 4℃ 下以 25,000×g 离心 30min 来澄清裂解物。保留上清液作为澄清裂解物。

[0562] 无细胞反应物的制备方法

[0563] 无细胞反应在生物反应器中使用下表中概述的设定来进行。在反应器中使裂解物或澄清裂解物升温到 37℃ 并平衡溶解氧水平。无细胞反应是通过添加路径底物和关键辅因子来起始。

[0564]

表 6. 无细胞反应工艺参数

温度	37℃
DO 设定值	80%；控制器设定 P=0.50, Ti=300s
DO 级联	控制器级联 1200 rpm；0–100% → 21–100% O ₂
pH 设定值	7；自动重置 Yi (经检查)；控制器设定 P=10, Ti=2400s
通气	10 L/h (2.2 vvm)
搅动	1200 rpm (级联)

[0565]

表 6. 无细胞反应工艺参数

泵 A	H ₂ SO ₄ , 5% (1.9N)
泵 B	KOH, 2N
泵 C	底物
泵 D	底物

[0566] 实例 1 到 4 的一般程序

[0567] 产生若干种株系,其各自使得能可诱导地过表达以下酶中的一种或一种以上: ProB、ProA、CarB、CarA、CarC 和 PutA。胡萝卜果胶杆菌的 carB/A/C 基因经密码子优化以在大肠杆菌中表达,而 proB/A 和 putA 基因是直接从大肠杆菌 MG1655 基因组扩增。使株系在 37℃ 下生长到对数中期,诱导 1-5 小时,沉淀,在再悬浮后浓缩 10-20X,并使用细胞匀浆器来裂解。通过离心澄清裂解物以移除细胞碎片,且使用单一裂解物或裂解物的混合物来提供所需活性。将反应物 (0.1-1mL) 在 37℃ 下维持 1-3 小时,之后用乙醇骤冷。在需要时向反应物中添加经修饰二酸、CoA 底物、脯氨酸和其它辅因子 (ATP、NADPH、2- 酮戊二酸)。使用 LCMSMS 来分析反应中间体和产物。

[0568] 实例 1. 从经取代谷氨酸和丙二酰基 -CoA 或乙基丙二酰基 -CoA 产生经取代羧甲基脯氨酸分子

[0569] 使含有表达 ProB、ProA 和 CarB 的质粒的 BL21 (DE3) 株系生长到高细胞密度,裂解,并通过离心移除细胞碎片。将澄清裂解物 (30% 最终反应体积, 3.9mg/ml 蛋白质) 与 5mM 的以下物质中的一种在 37℃ 下一起培育 60min: 谷氨酸、4- 羟基 - 谷氨酸或 4- 甲基 - 谷氨酸以及 1.6mM 乙基丙二酰基 -CoA、3mM ATP、3mM NADPH 和 2mM MgCl₂。包括无底物反应作为对照。通过 LCMSMS 使用以下方法分析经乙醇骤冷的反应物:

[0570]

柱	Phenomenex Synergi Polar RP, 250 × 4.6 mm, 4 mm
移动相	A: 10 mM 乙酸铵, 于水中, pH 6.6 B: 乙腈
流动	75/25 A/B, 等度, 0.75 ml/min
注射体积	0.02 ml 反应混合物
检测	MS/MS, 负模式

[0571] 根据羧基的损失 (-44), 通过 LCMSMS 以负模式鉴别天然羧甲基脯氨酸和多种经取代羧甲基脯氨酸。数据展示于图 10 中。

[0572]

底物	MS/MS 过渡 (负模式)
谷氨酸 + 丙二酰基 CoA	172/128
2S, 4S4- 甲基谷氨酸 + 丙二酰基 CoA	186/142
2S, 4R4- 甲基谷氨酸 + 丙二酰基 CoA	186/142
4- 羟基谷氨酸 + 丙二酰基 CoA	188/144
4- 羟基谷氨酸 + 乙基丙二酰基 CoA	216/172
谷氨酸 + 乙基丙二酰基 CoA	200/156
2S, 4R4- 甲基谷氨酸 + 乙基丙二酰基 CoA	214/170
2S, 3S-3-OH 谷氨酸 (反式) + 丙二酰基 CoA	188/144

[0573]

[0574] 实例 2. 从含有 ProB、ProA、CarB 和 CarA 活性的裂解物中的经取代谷氨酸和丙二酰基 -CoA 产生经取代碳青霉烷

[0575] 将实例 1 中所述的反应物浓缩 4× 并在 37°C 下于 10mM Tris pH9 中与 5 μM CarA 蛋白质、6mM ATP、2mM MgCl₂ 组合 60min。包括无底物反应作为对照。通过 LCMSMS 使用以下方法分析经乙醇骤冷的反应物：

柱	Phenomenex Synergi Polar RP, 250 × 4.6 mm, 4 mm
移动相	0.1% (v/v) 甲酸, 于水中 0.1% (v/v) 甲酸, 于乙腈中
流动	75/25 A/B, 等度, 0.75 ml/min
注射体积	0.02 ml 反应混合物
检测	MS/MS, 负模式

[0577] 根据代表烯酮损失 (-42) 的产物离子, 使用或不使用五元环的脱羧 (-44), 通过 154/112 (天然碳青霉烷)、168/82 (4- 甲基碳青霉烷) 和 170/84 (4- 羟基碳青霉烷) 的 MS/MS 过渡来鉴别碳青霉烷。数据展示于图 11 中。

[0578] 实例 3. 从含有 ProB、ProA、CarB、CarA 和 CarC 活性的裂解物中的经取代谷氨酸和丙二酰基 -CoA 产生经取代碳青霉烯

[0579] 在于 50mM Tris pH8.5 中的 2.5mM NADPH、10mM ATP 和 6.7mM $MgCl_2$ 存在下,将 15mM 4- 甲基 - 谷氨酸和 8mM 丙二酰基 CoA 添加到来自表达 ProB、ProA、CarB 和 CarA 的株系的无细胞提取物中。使反应在 37℃ 下进行 2 小时以产生甲基化碳青霉烷,藉由 LCMSMS 对其进行检测 (168/125.9)。将产生碳青霉烷的反应物在 8mM α - 酮戊二酸、1mM 抗坏血酸盐、1mM 硫酸亚铁铵和 1.6mg/ml CarC 中稀释两倍。在 37℃ 下 1 小时后,用等体积的乙醇将反应物骤冷,并通过真空高速离心 (speed vac centrifugation) 浓缩到其原始体积。通过 LCMSMS 来测定剩余甲基化碳青霉烷的水平和甲基化碳青霉烯的外观。在 166/122 (脱羧) 和 184/140 (水解后脱羧) 下检测甲基化碳青霉烯。数据展示于图 12 中。

[0580] 实例 4. 从含有 PutA (大肠杆菌脯氨酸氧化酶) 和 CarB 裂解物中的 3- 羟基脯氨酸和丙二酰基 -CoA 产生经取代羧甲基 - 脯氨酸

[0581] 使载有使得能 IPTG 诱导型表达 CarB 的质粒的 BL21 (DE3) 株系在 1L LB 中生长到 $0.5 < OD < 1$ 并在 37℃ 下诱导 (0.8mM IPTG) 1h。使载有空载体的 BL21 (DE3) 株系在 5LM9+10g/L 脯氨酸中生长直到达到约 0.4 的最大 OD。收获细胞,在 100mL 再悬浮培养基 (100mM Tris-HCl, pH8) 中洗涤,并在生成裂解物之前将细胞沉淀储存在 -80℃ 下。使沉淀再悬浮于 100mM Tris-HCl (pH8) 中并使用匀浆器裂解 (在 15k psi 下,2 次进程)。通过在 4℃ 下以 $21,000 \times g$ 离心 20min 来移除细胞碎片。将不同量的从在脯氨酸 (代表不同 PutA 活性水平) 中生长的细胞获得的裂解物与从过表达 CarB 的细胞获得的裂解物组合。反应物还含有 8mM $MgCl_2$ 、7.5mM FAD、4mM 丙二酰基 -CoA 和 50mM 顺式 - 或反式 -3- 羟基 - 脯氨酸。如实例 1 中所述通过 LCMSMS 分析经乙醇骤冷的反应物。数据展示于图 14 中。

[0582] 其它实施例

[0583] 在权利要求书中,除非上下文明确指示相反含义或其它含义,否则诸如“一 (a)”、“一 (an)”和“所述”等冠词可意指一个或一个以上。除非上下文明确指示相反含义或其它含义,否则如果一个、一个以上或所有群组成员存在于、用于或以其它方式涉及给定产物或工艺,那么认为其满足在群组的一个或一个以上成员之间包括“或”的权利要求或说明。本发明包括其中恰好只有一个群组成员存在于、用于或以其它方式涉及给定产物或工艺的实施例。本发明包括其中一个以上或所有群组成员都存在于、用于或以其它方式涉及给定产物或工艺的实施例。

[0584] 此外,本发明涵盖所有变化形式、组合和排列,其中将一个或一个以上来自一个或一个以上所列示权利要求的限制、要素、分句和描述性术语引入另一权利要求中。例如,任何依赖于另一权利要求的权利要求可经修改以包括一个或一个以上在依赖于相同基础权利要求的任何其它权利要求中发现的限制。如果以列表形式 (例如,以马库西 (Markush) 群组格式) 呈现要素,那么本发明还揭示每个要素亚组并且可从所述群组中移除任何要素。应理解,一般来说,如果称本发明或本发明的各方面包含具体要素和 / 或特征,那么本发明的某些实施例或本发明的各方面由所述要素和 / 或特征组成或基本上由其组成。出于简洁性目的,在本文中不用同样的话明确阐述所述实施例。还应注意,术语“包含”和“含有”打算为开放式且允许包括其它要素或步骤。如果给出范围,那么包括端点。此外,除非上下文和所属领域技术人员的理解另有指示或其它含义较明显,否则除非上下文明确指示其它含义,否则表述为范围的值可在本发明的不同实施例中采用所述范围内的任何特定值或子范围,精确到所述范围的下限的单位的十分之一。

[0585] 本申请案涉及各个授权专利、公开专利申请案、杂志论文和其它出版物,其都以引用方式并入本文中。如果在所并入的任一参考文献与本说明书之间有冲突,应以本说明书为准。另外,本发明在现有技术内的任何具体实施例可明确从任何一个或一个以上权利要求中排除。因为所述实施例被认为是所属领域技术人员已知,即使本文中未明确阐述排除也可将其排除。可因任何原因,不管是否与存在现有技术相关,从任何权利要求排除本发明的任何具体实施例。

[0586] 所属领域技术人员仅使用常规实验就可了解或能确定本文所述特定实施例的许多等效内容。本文所述的本发明实施例的范围不打算受限于上述说明,而是如所附权利要求书中所述。所属领域技术人员将了解,可在不背离如以下权利要求书中所定义的本发明的精神或范围的情况下,对本说明作出各种改变和修改。

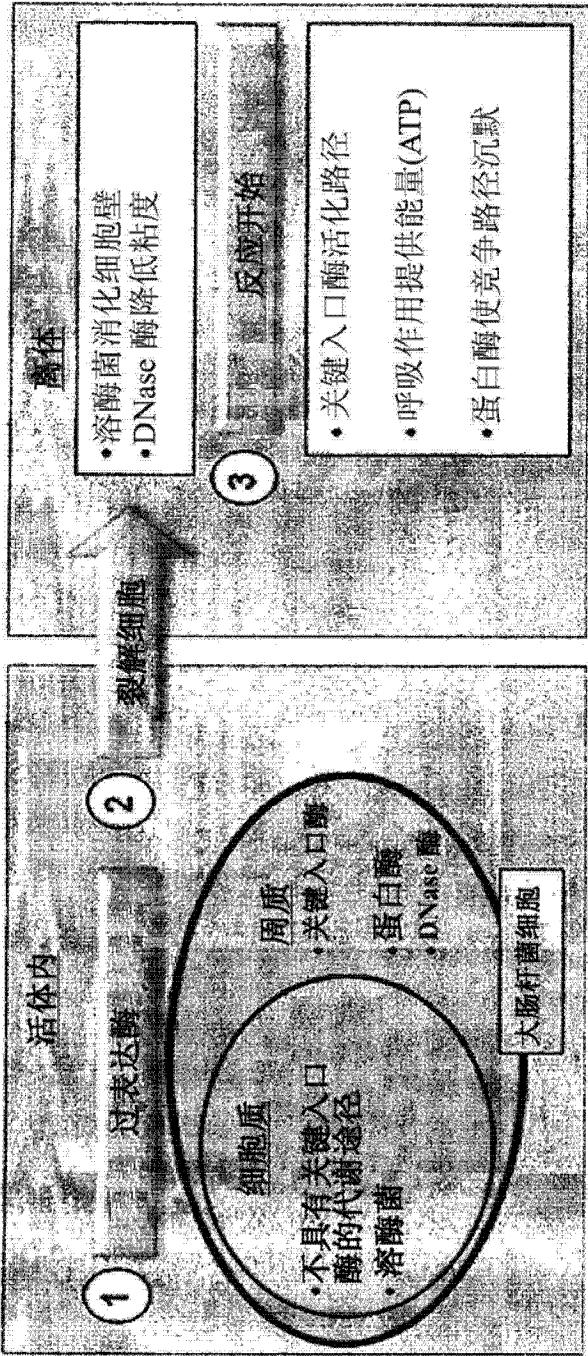


图 1

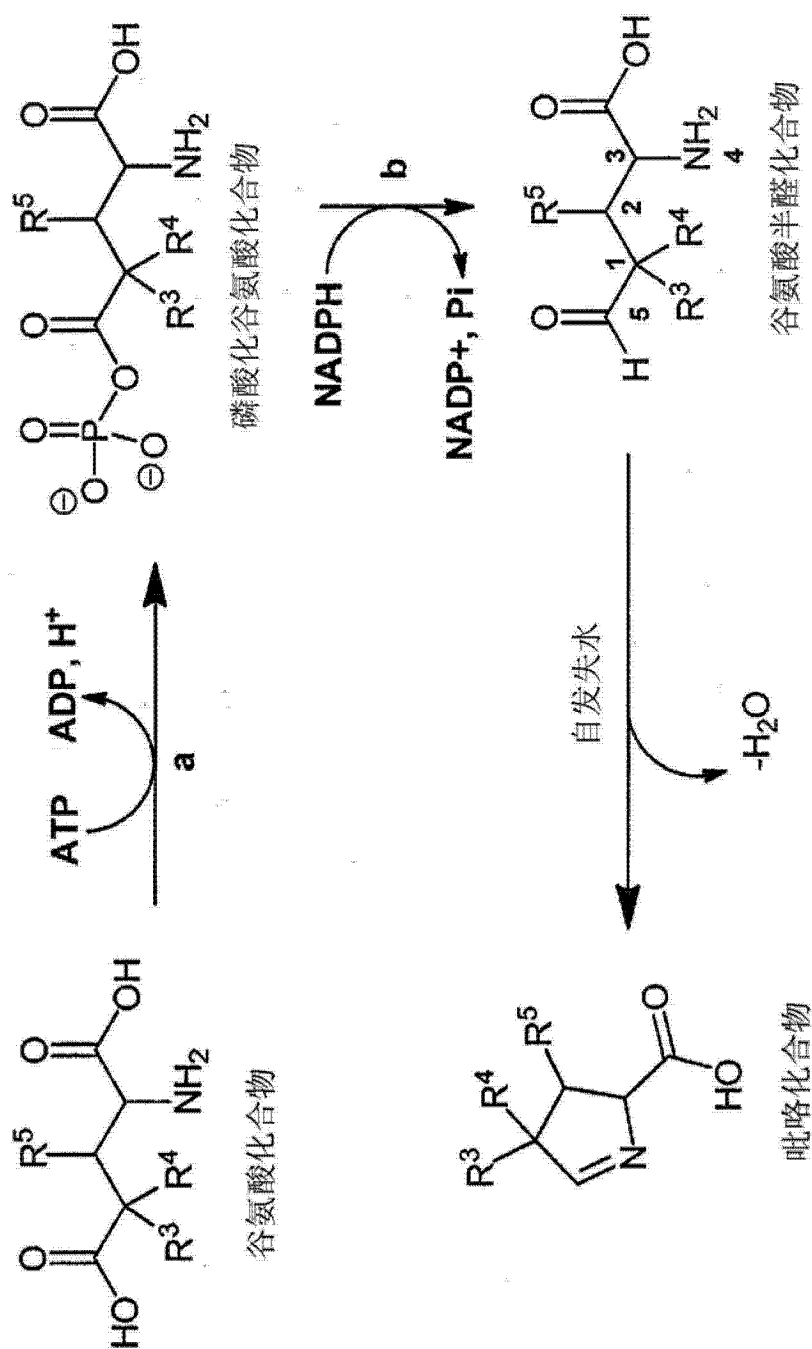


图 2A

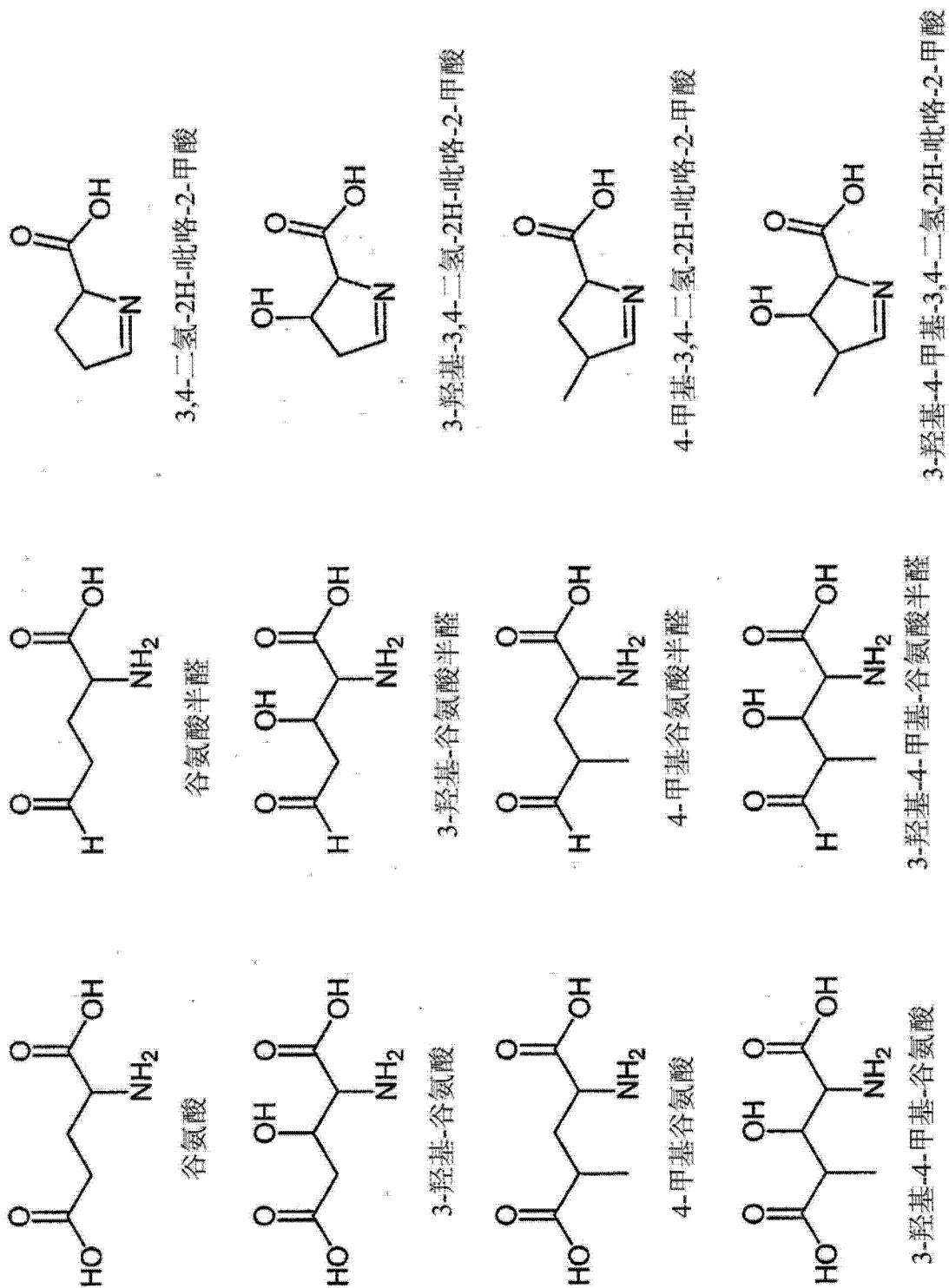


图 2B

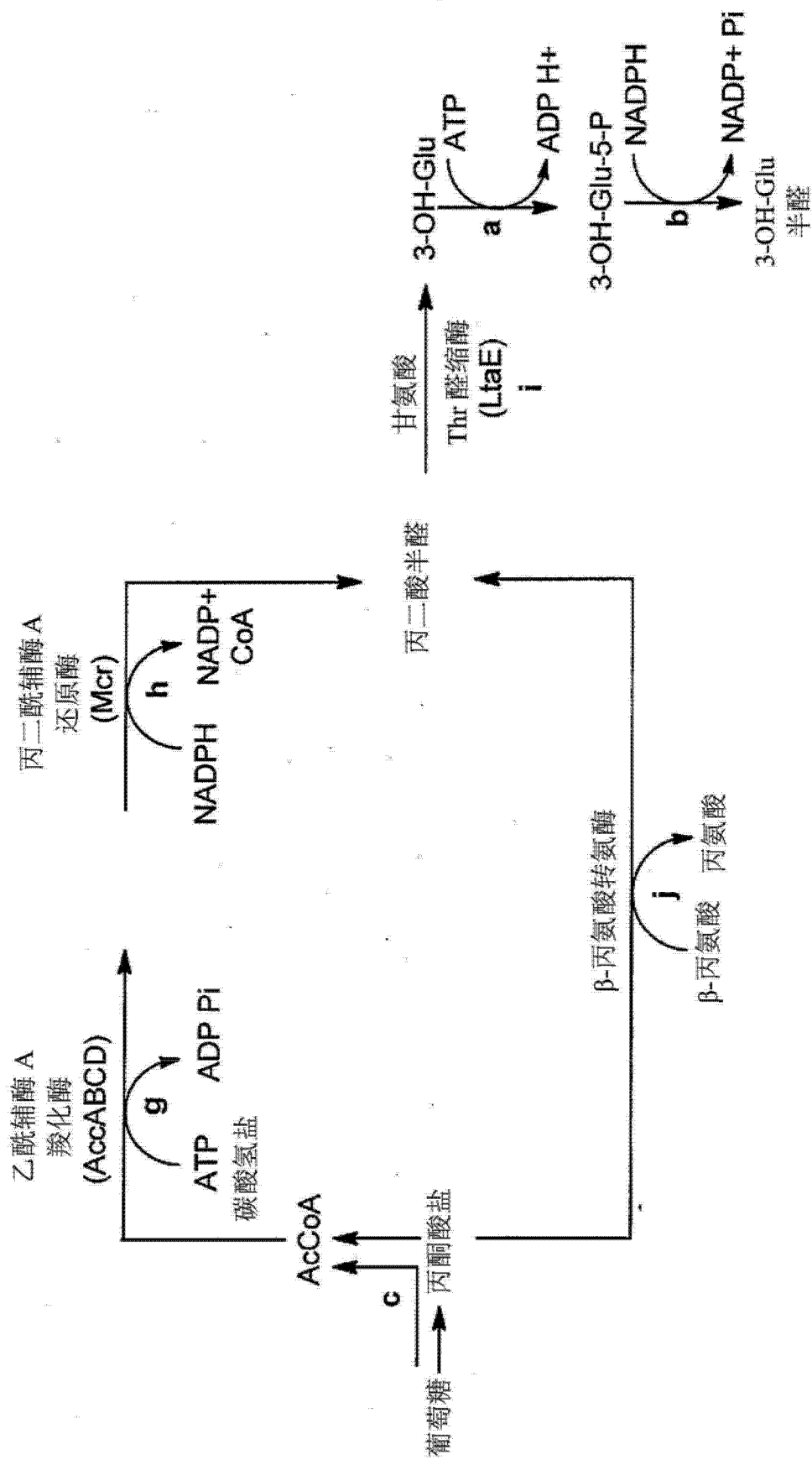


图 3

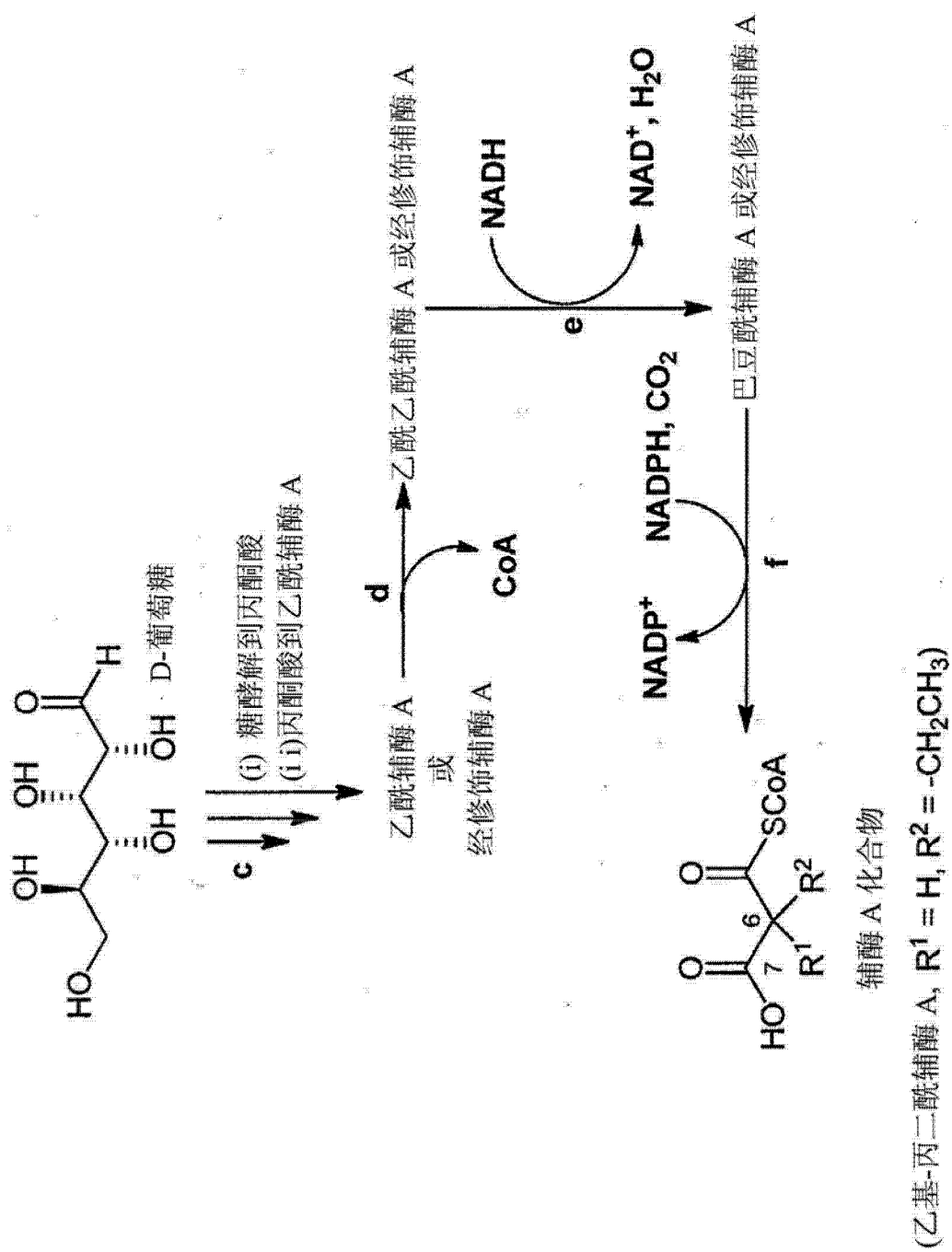


图 4

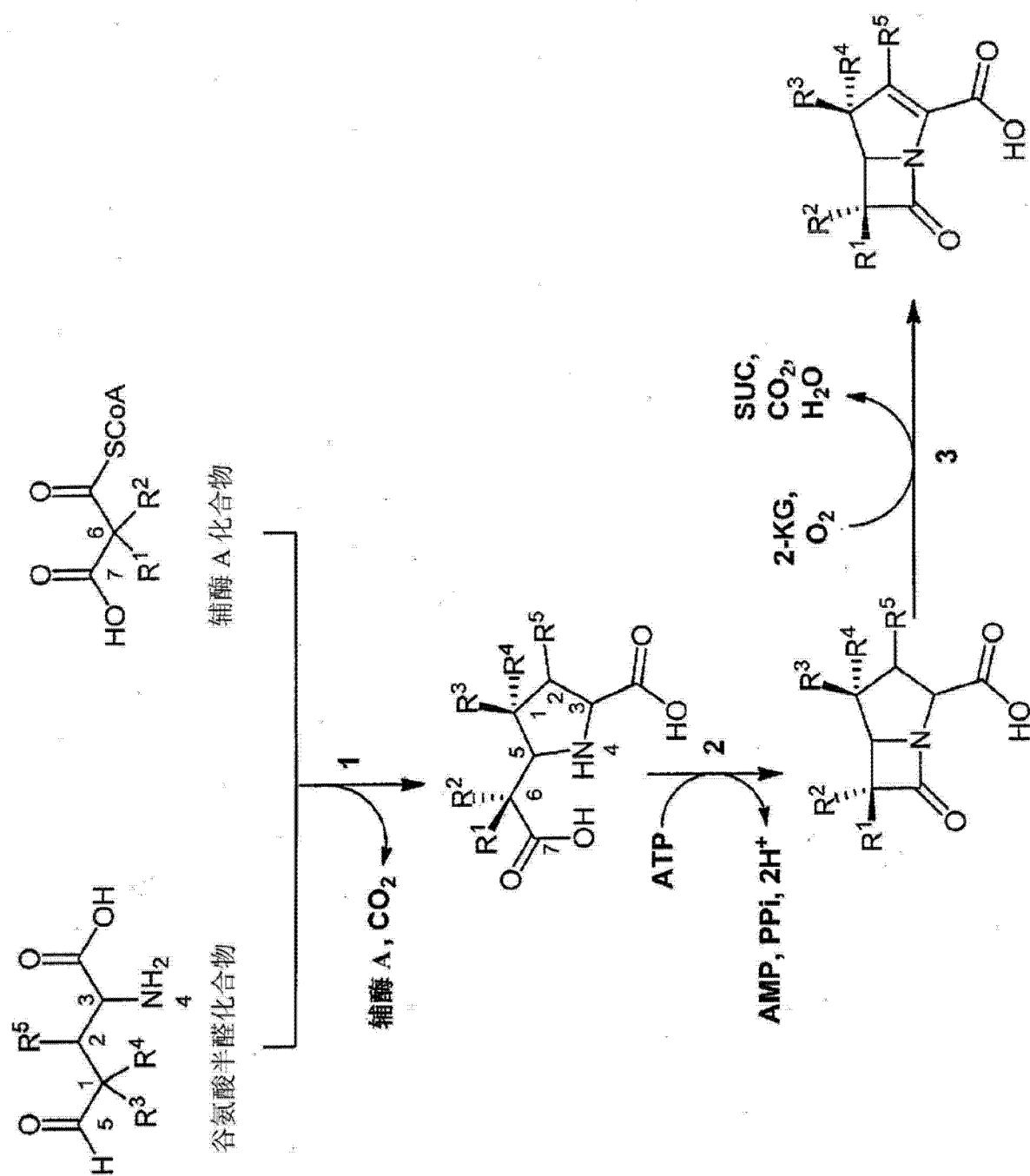


图 5A

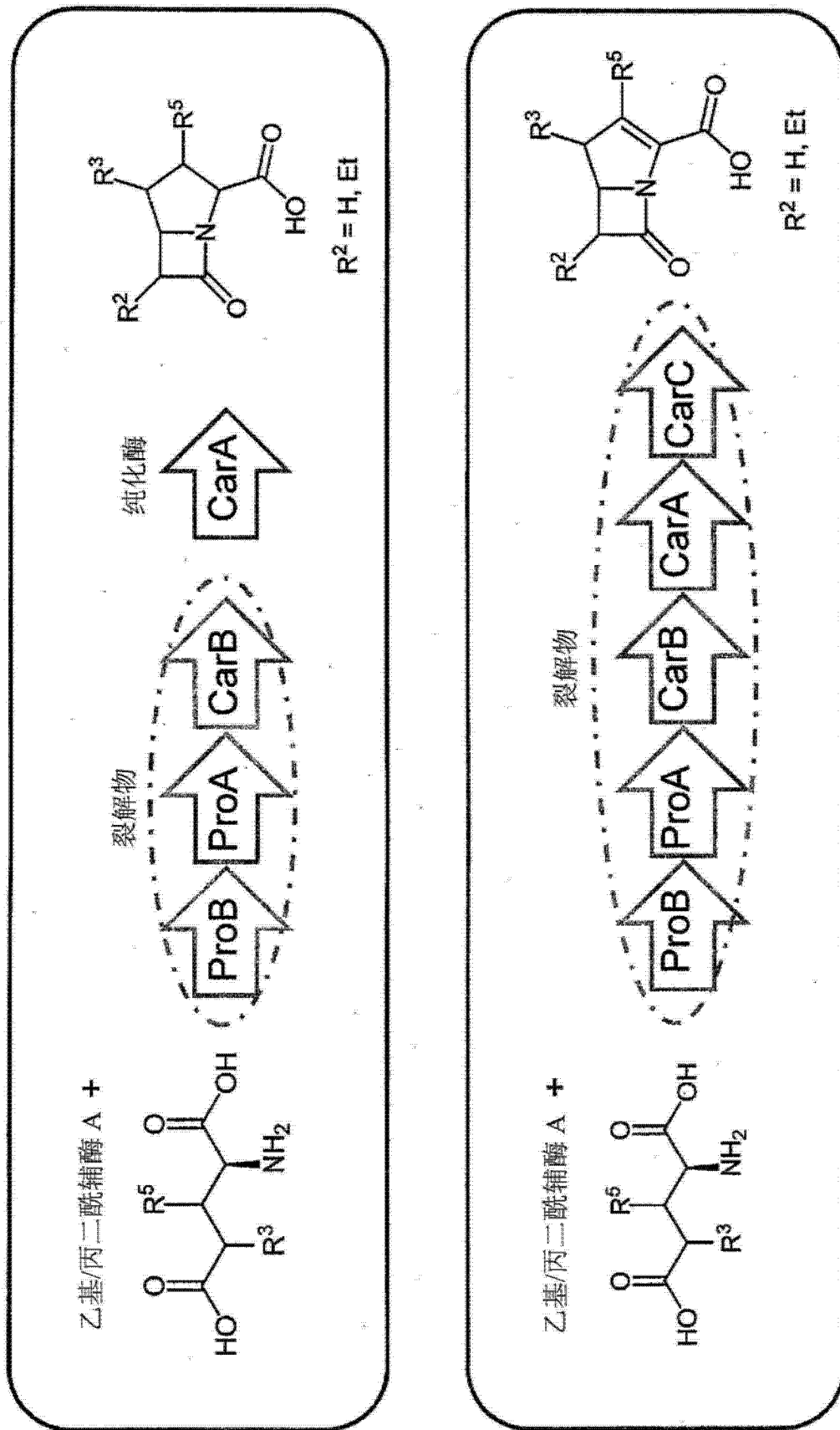


图 5B

乙基侧链的酶促衔接, $R^1, R^2 = H$

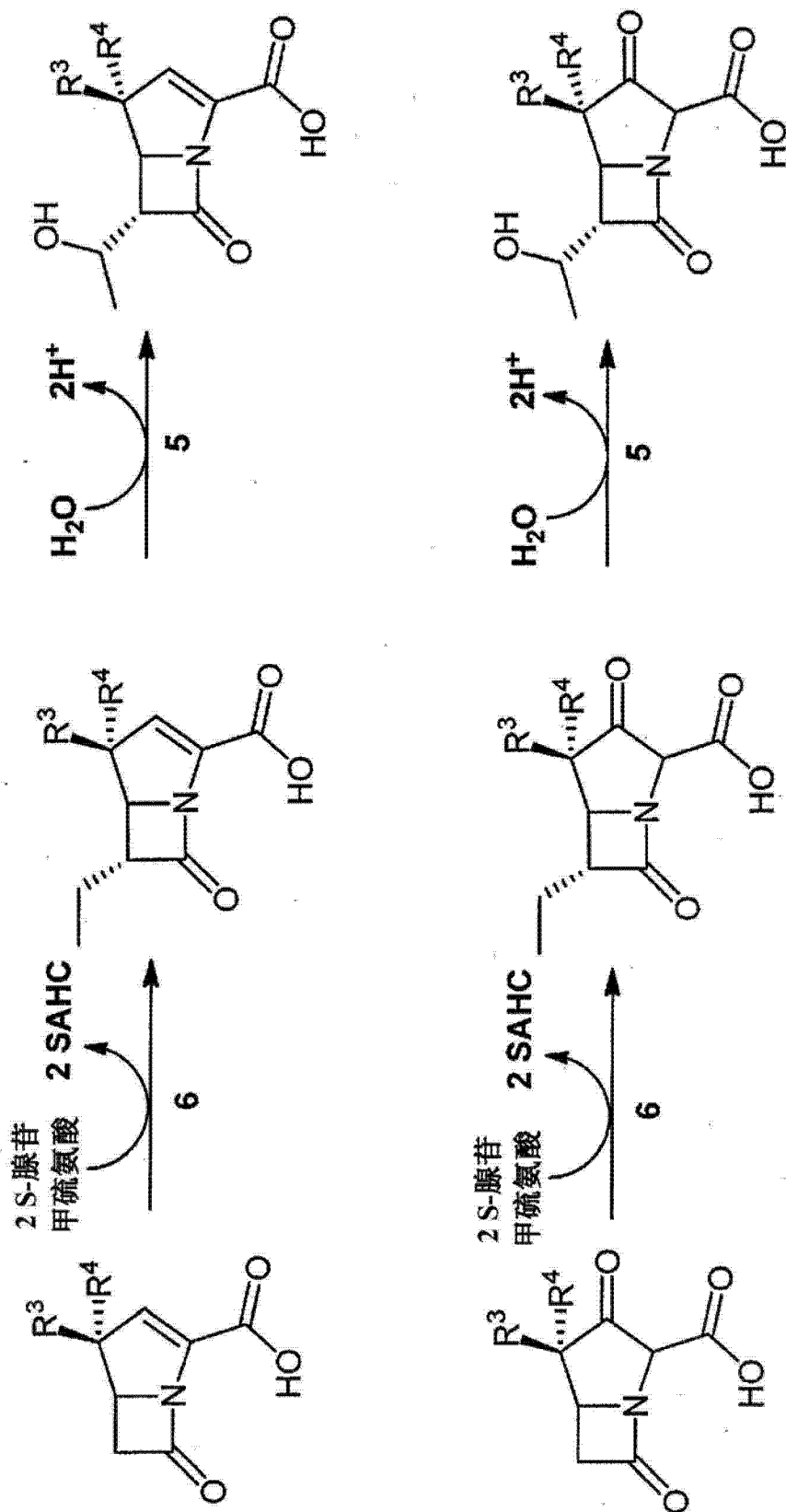


图 6A

-SR⁸侧链的化学衔接, R⁵ = -OH, =O

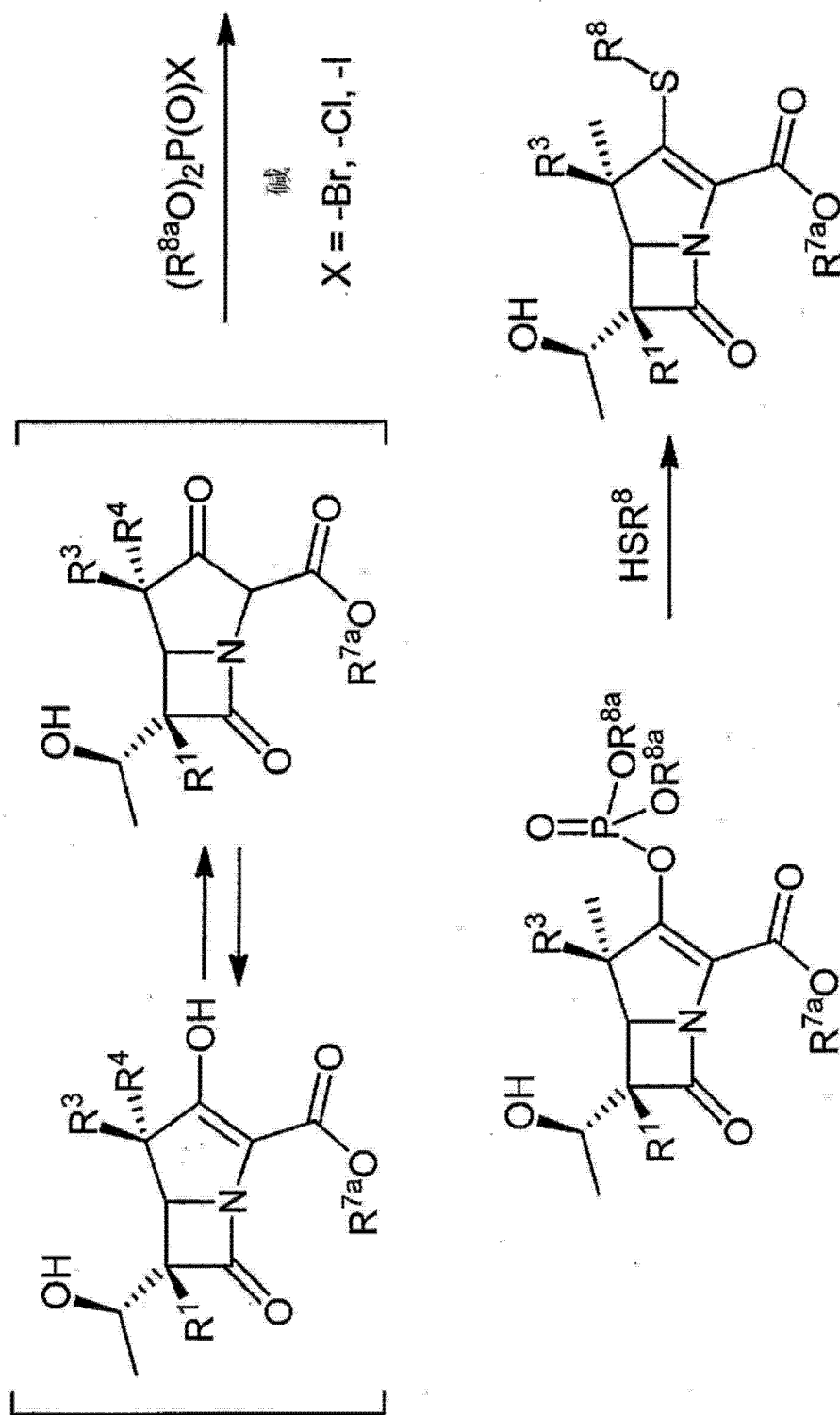


图 8

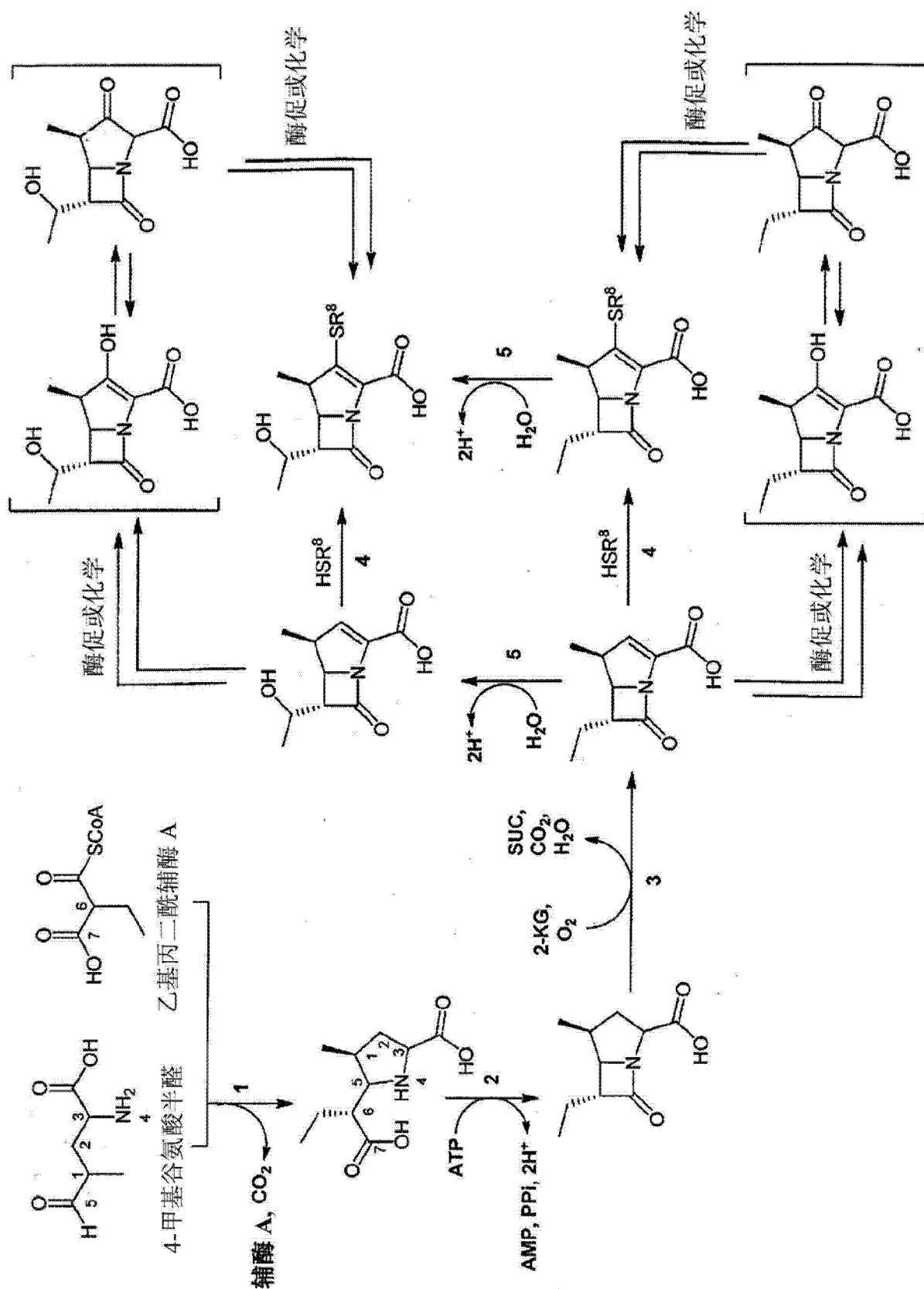


图 9C

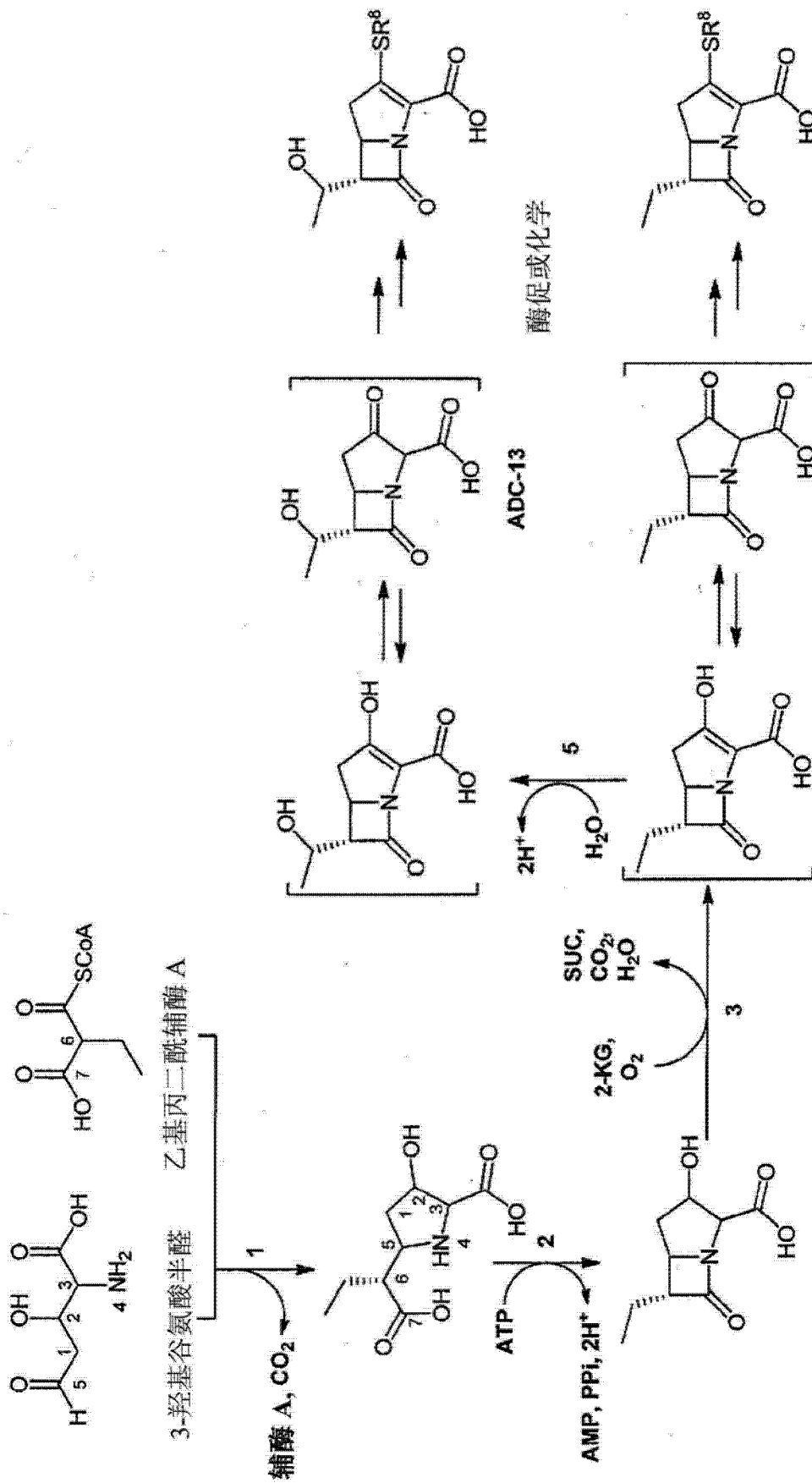


图 9D

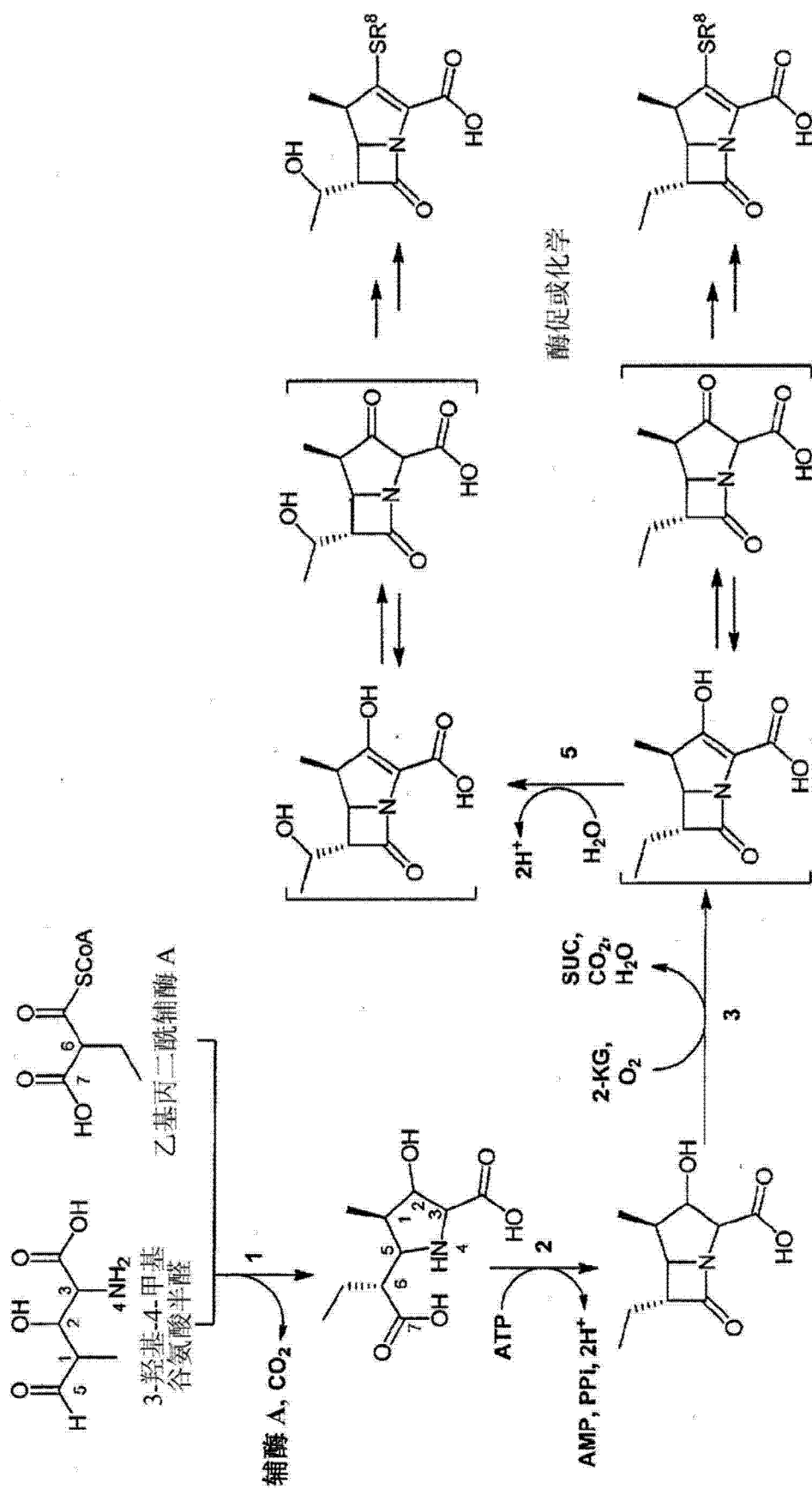


图 9E

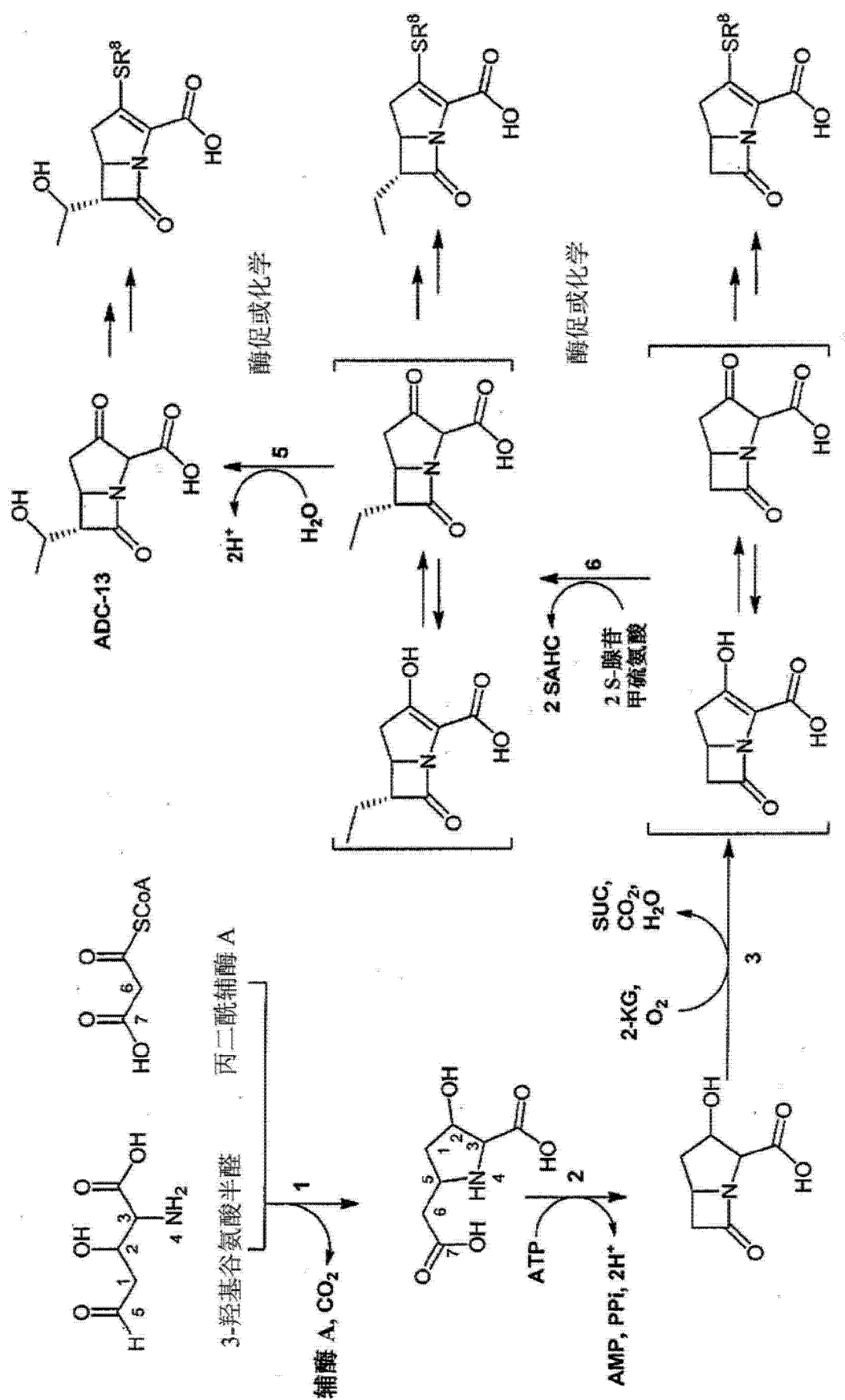


图 9G

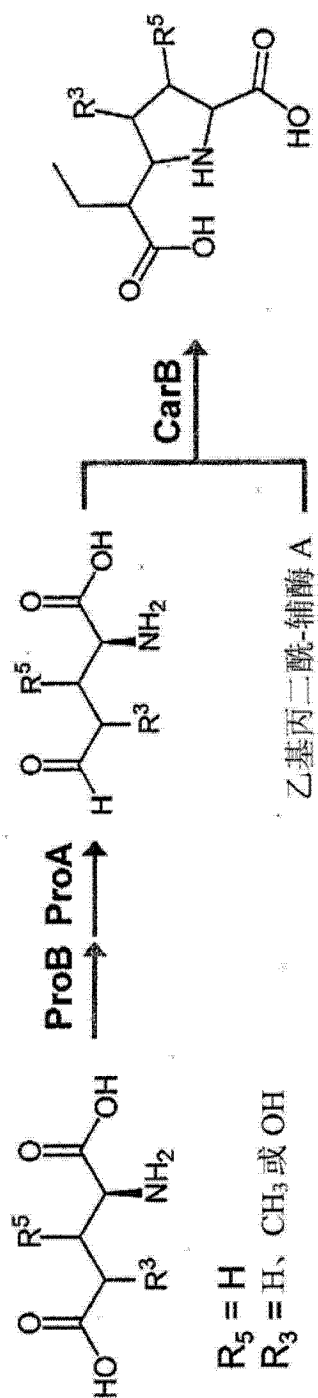
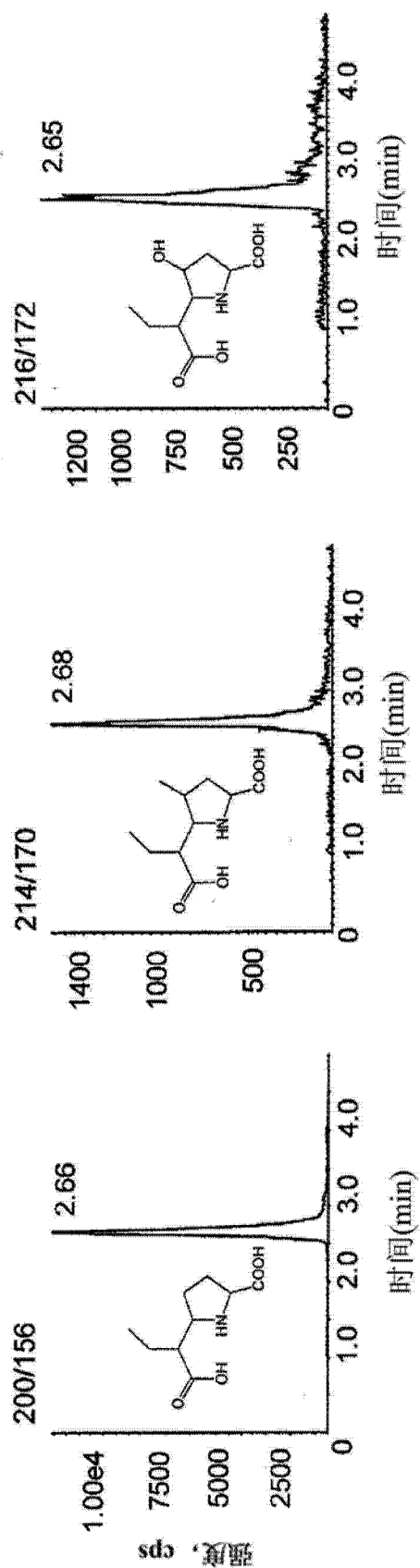
A**B**

图 10

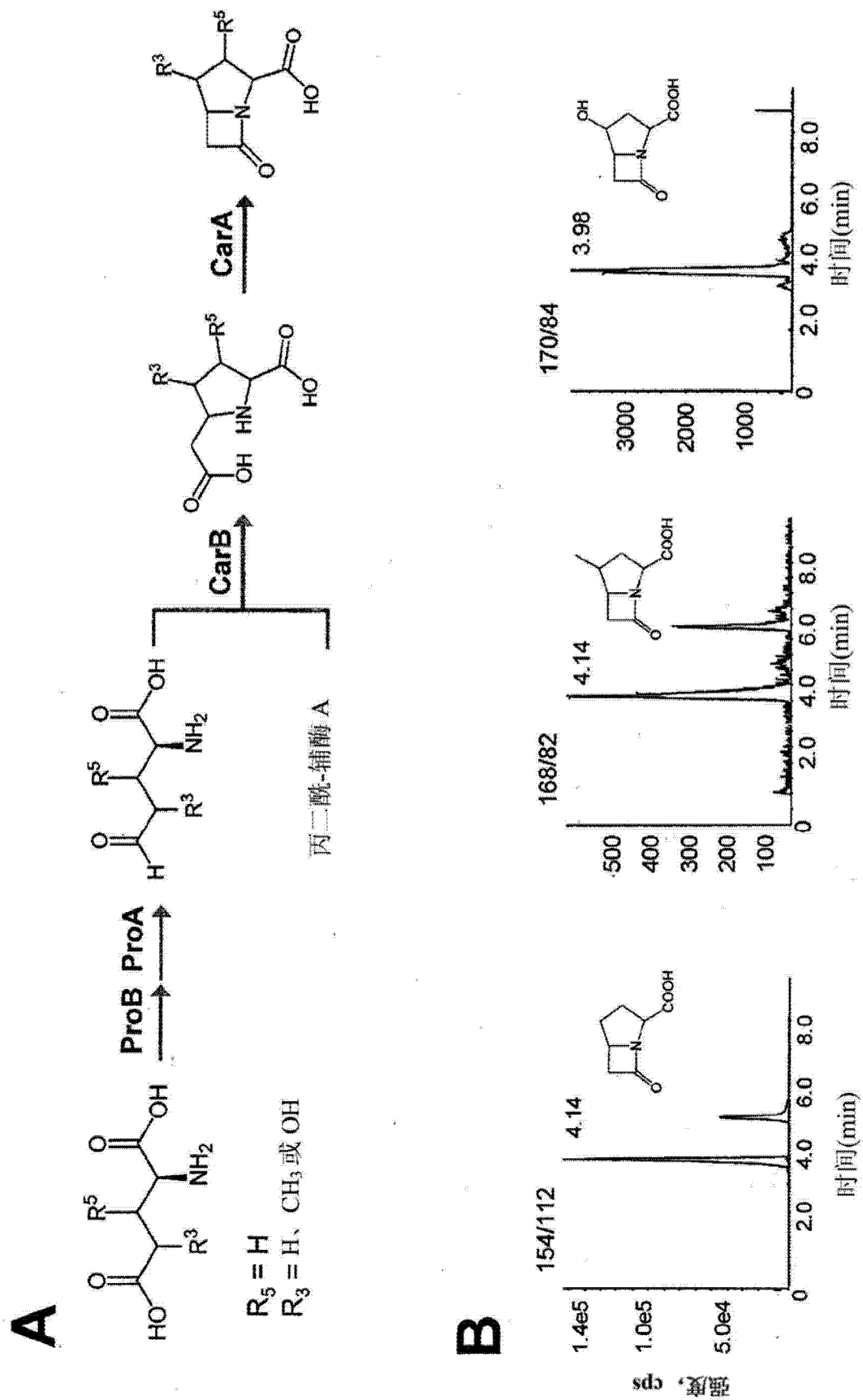


图 11

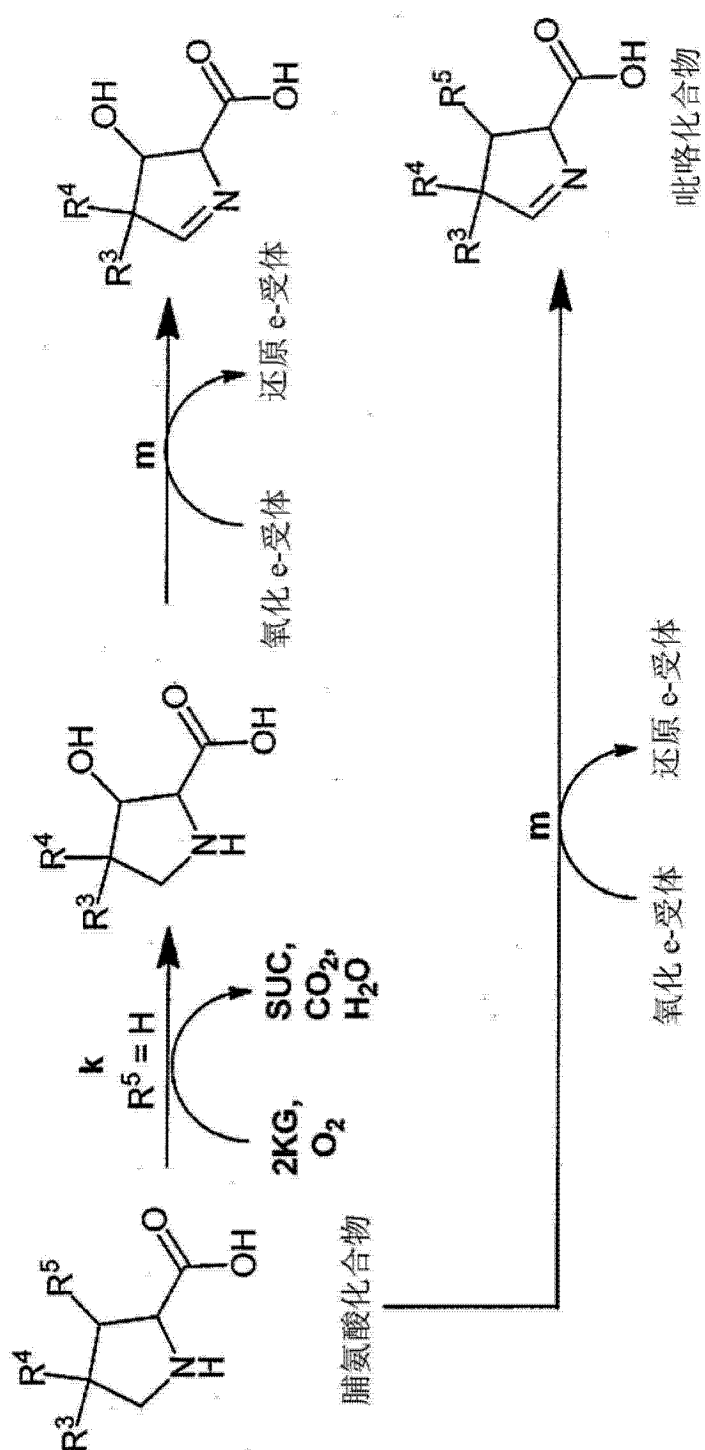


图 13A

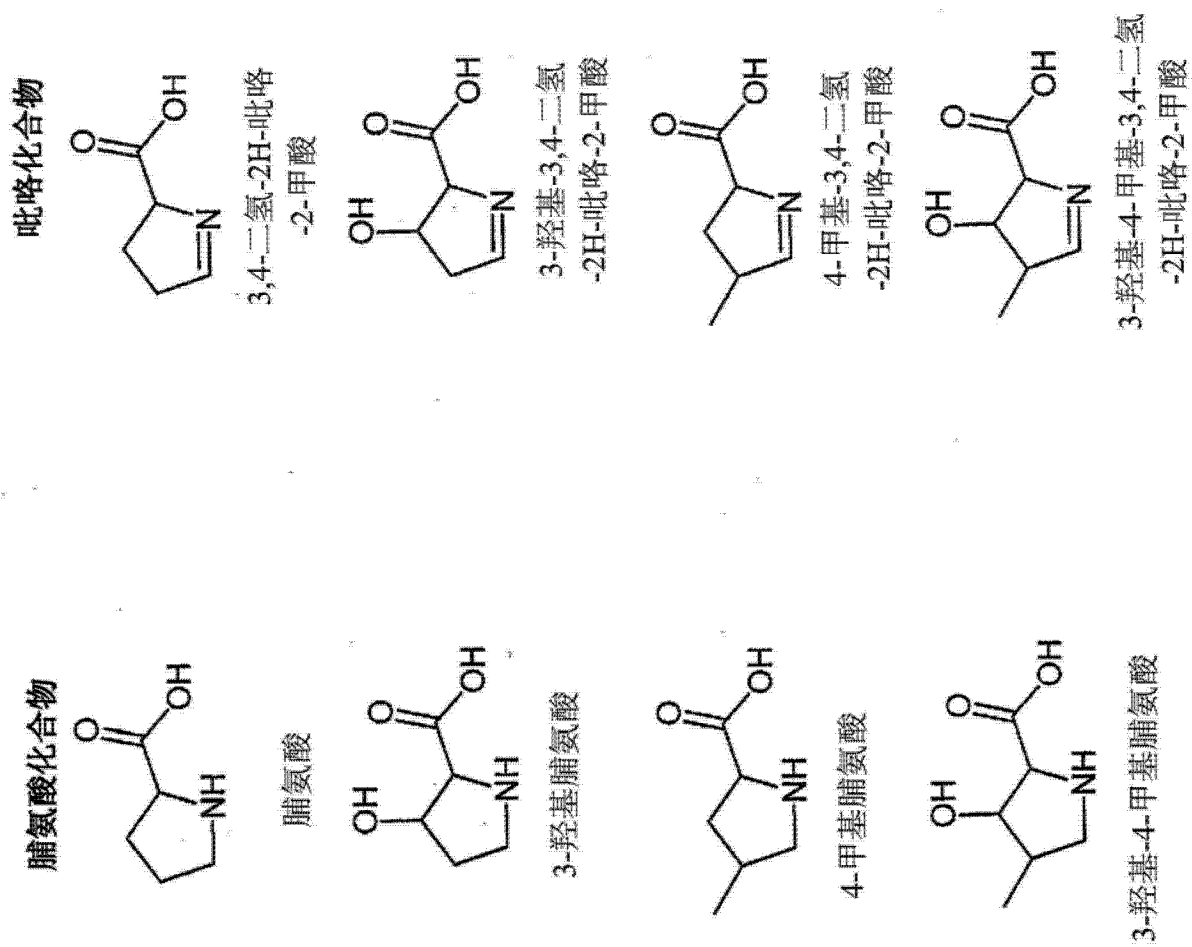


图 13B

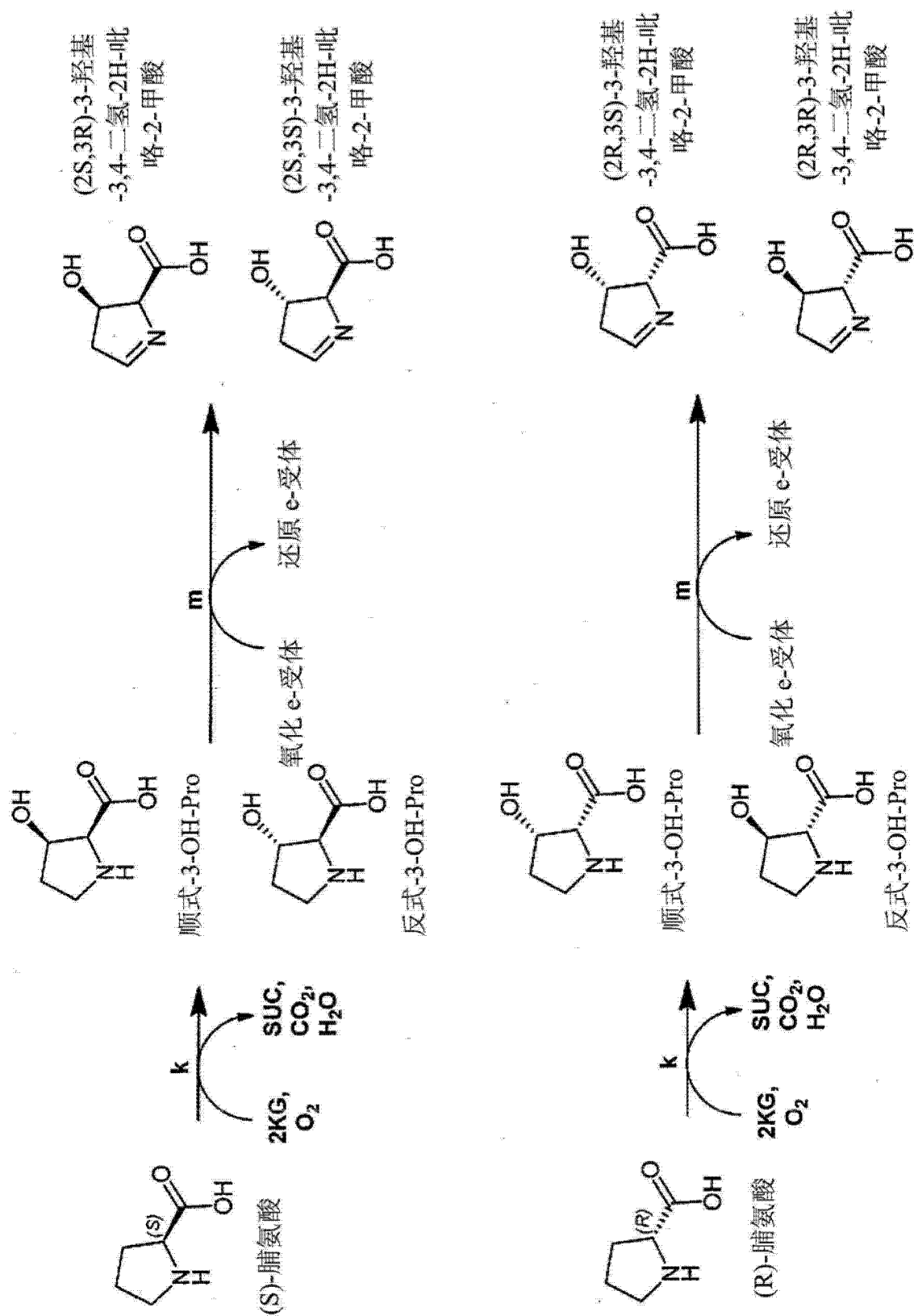


图 13C

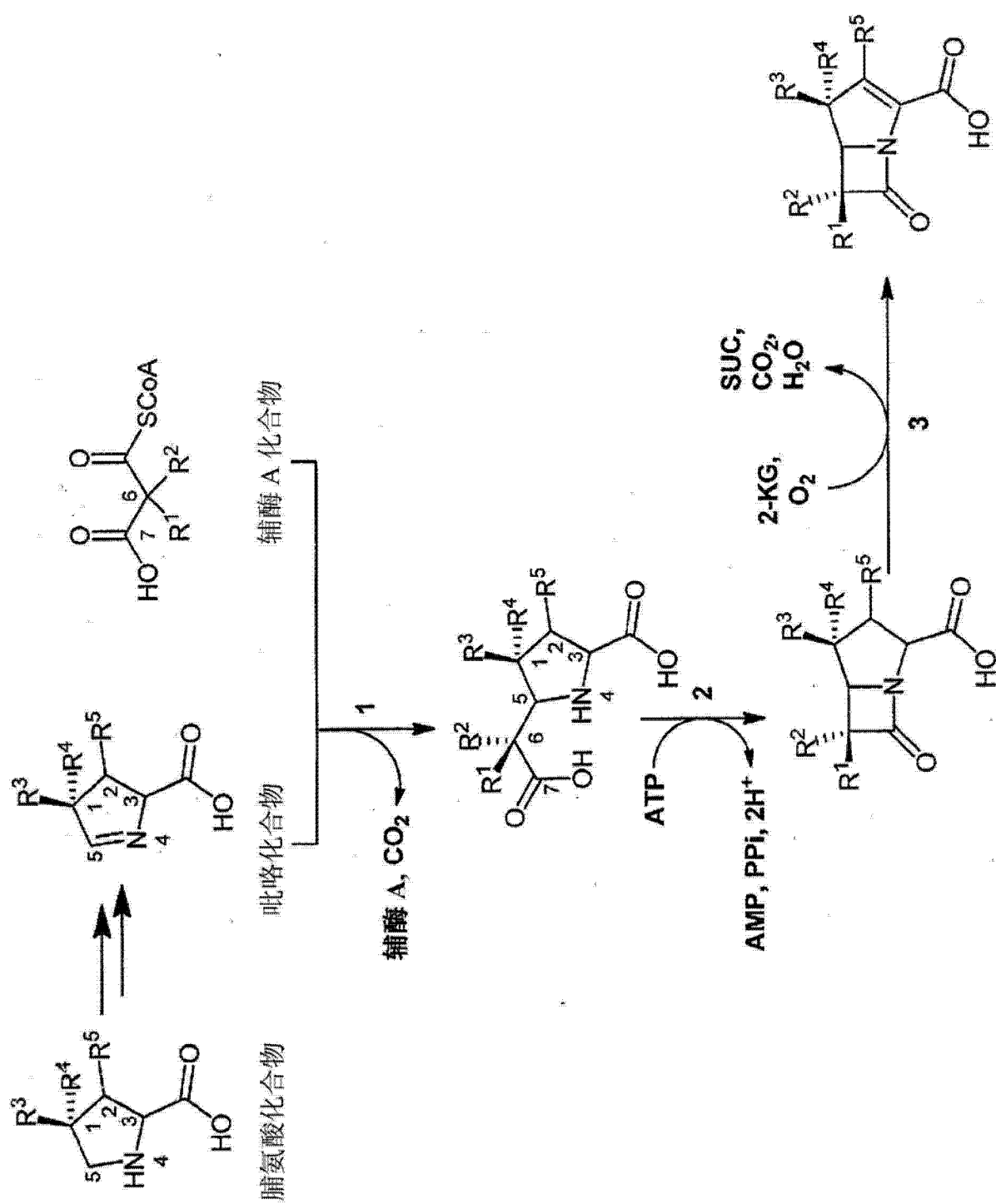


图 13D

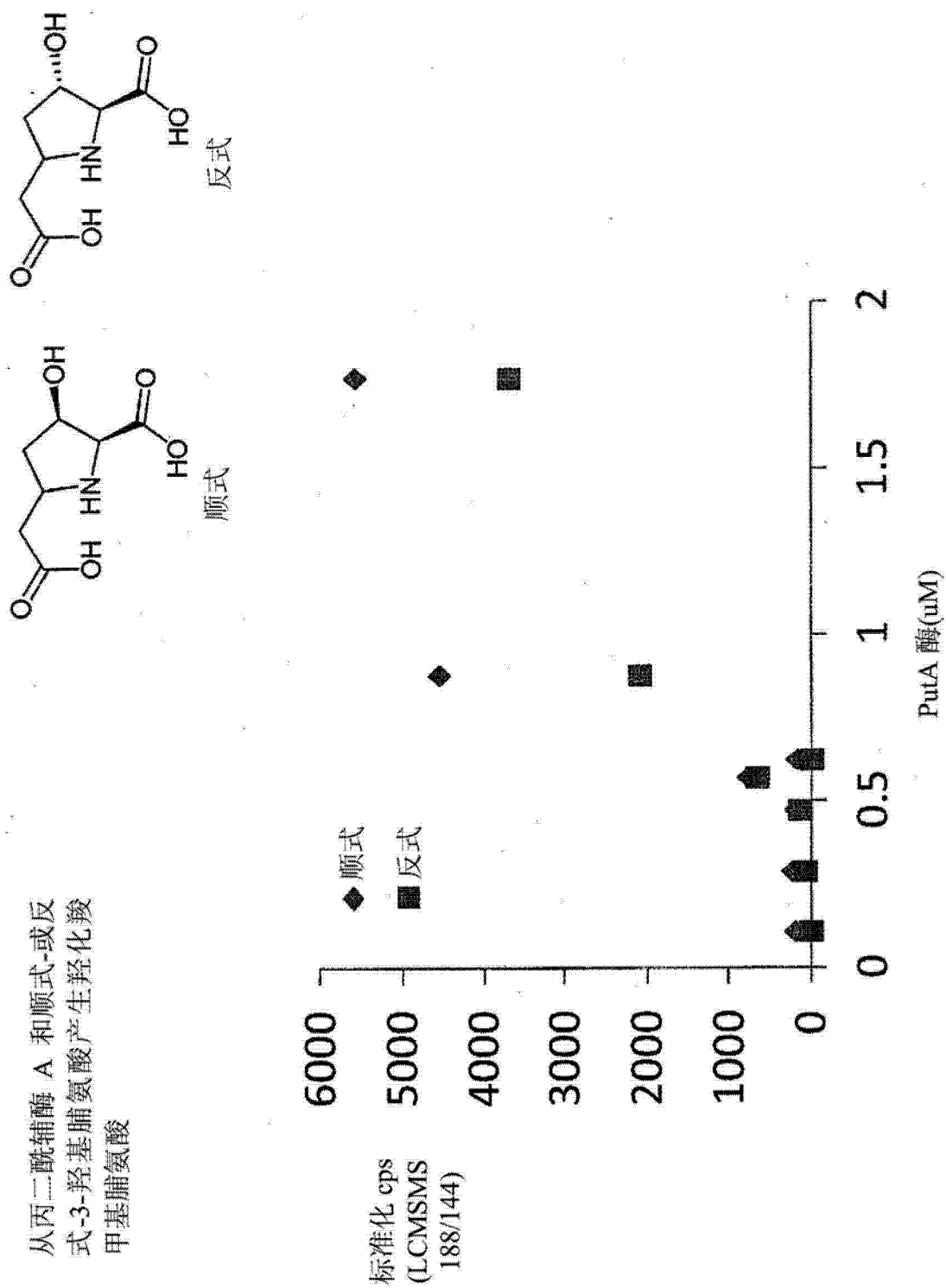


图 14