



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1633237 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 03804162.6

C07H 21/04 (2006.01)

(22) 申请日 2003.02.19

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/358,075 2002.02.19 US

US 6274350 B1, 2001.08.14, 全文.

US 5539089 A, 1996.07.23, 全文.

US 6143526 A, 2000.11.07, 全文.

US 5362634 A, 1994.11.08, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2004.08.19

审查员 刘建

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2003/004998 2003.02.19

(87) PCT申请的公布数据

W02003/070908 EN 2003.08.28

(73) 专利权人 道农业科学公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 L·S·伯恩斯 P·R·格劳普纳

P·卢尔 C·J·马丁

W·A·沃斯登 C·沃尔德隆

B·威尔金森

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 程泳

(51) Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 57 页 附图 12 页

(54) 发明名称

新的产生 SPINOSYN 的聚酮合酶

(57) 摘要

本发明提供了生物活性的 spinosyn, 能够在刺糖多孢菌中起作用而产生 spinosyn 的杂化 spinosyn 聚酮合酶, 和使用该 spinosyn 控制昆虫的方法。

1. 能够在刺糖多孢茵中起作用而产生生物活性 spinosyn 的聚酮合酶的 DNA, 所述聚酮合酶的 DNA 由经下列修饰的 spinosyn 聚酮合酶的 DNA 构成:

- a) 将 SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:11 的 DNA 按读码框与 SpnA 的 KS1 结构域拼接;
- b) 用 SEQ ID NO:20 的 DNA 取代 spinosyn 聚酮合酶的模块 3AT; 或
- c) 用 SEQ ID NO:26 的 DNA 取代 spinosyn 聚酮合酶的模块 3AT。

2. 权利要求 1 的 DNA 编码的 spinosyn 聚酮合酶。

3. 包含权利要求 1 的 DNA 的载体。

4. 包含权利要求 3 的载体的作为宿主生物的刺糖多孢茵。

新的产生 SPINOSYN 的聚酮合酶

[0001] 发明概述

[0002] 本发明提供了新的杂化聚酮 (polyketide) 合酶 (PKSs), 编码这种 PKSs 的 DNA, 整合有该杂化聚酮合酶 DNA 的载体, 用该杂化聚酮合酶 DNA 转化的宿主生物包括但不限于刺糖多孢菌 (*Saccharopolysporaspinoso*) 菌株, 使用该杂化聚酮合酶 DNA 来改变产生 spinosyn 的菌株制备的产物的方法, 和由这些操作产生的新的生物活性化合物。

[0003] 发明背景

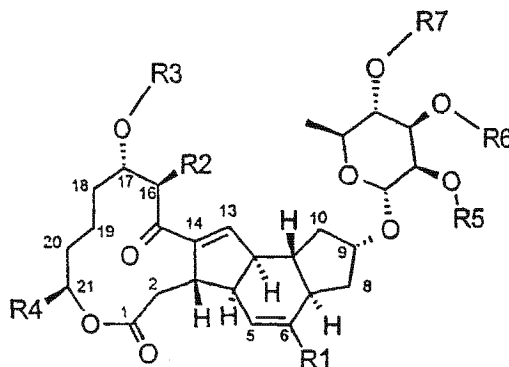
[0004] 如美国专利 5,362,634 公开的, 发酵产物 A83543 是由刺糖多孢菌产生的相关化合物家族。美国专利 6,274,350B1 和 WO 01/19840 中描述了以前已经分离的天然 spinosyn 化合物家族, 连同在各种昆虫控制试验中它们的活性。美国专利 6,001,981 中也描述了很多半合成 spinosyn 类似物, 其中以各种方法成功取代了 spinosyn 分子的化学可接近区域。

[0005] 这个家族的已知成员已被称作因子或成分, 并且对每种分配了一个用于鉴别的字母。以下将这些化合物称作 spinosyn A, B, 等。该 spinosyn 化合物可有效控制蛛形纲动物、线虫和昆虫, 尤其是鳞翅目和双翅目物种, 并且它们对环境相当友好, 具有有吸引力的毒理学特性。商品化产品多杀菌素 (Spinosad) 是 spinosyn A 和 D 的混合物 (Pesticide Manual, 11th ed., p. 1272)。

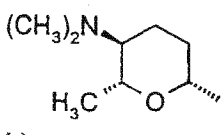
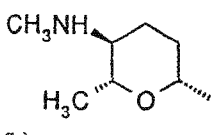
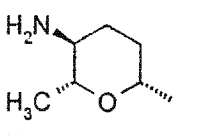
[0006] 表 1 和 2 鉴定了一些已知 spinosyn 化合物的结构:

[0007] 表 1

[0008]

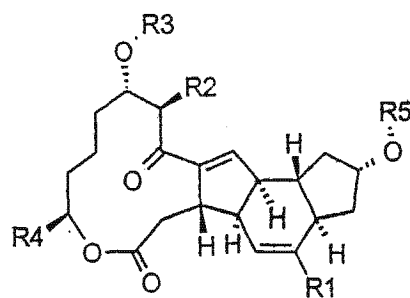


[0009]

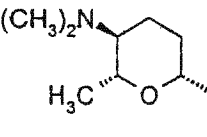
因子	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
spinosyn A	H	CH ₃	 (a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn B	H	CH ₃	 (b)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn C	H	CH ₃	 (c)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn E	H	CH ₃	(a)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn F	H	H	(a)	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn A 17-Psa	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn D 17-Psa	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn E 17-Psa	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
spinosyn F 17-Psa	H	H	H	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃

[0010] 表 2

[0011]



[0012]

因子	R1	R2	R3	R4	R5
spinosyn A 9-Psa	H	CH ₃	 (a)	C ₂ H ₅	H
spinosyn D 9-Psa	CH ₃	CH ₃	(a)	C ₂ H ₅	H
spinosyn A 糖苷配基	H	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H
spinosyn D aglycone	CH ₃	CH ₃	H	C ₂ H ₅	H

[0013] 天然产生的 spinosyn 化合物由与 12 员的大环内酯耦合的 5,6,5- 三环系统、中性糖 (鼠李糖) 和氨基糖 (福洛氨糖 (forosamine)) 组成 (见 Kirst 等 (1991))。如果化合物中不存在氨基糖, 则该化合物被称作 A, D 的假糖苷配基等, 和如果不存在中性糖, 那么该化合物被称作 A, D 的反向假糖苷配基等。更优选的命名法是将假糖苷配基称作 spinosyn A17-Psa, spinosyn D 17-Psa, 等, 和将反向假糖苷配基称作 spinosyn A9-Psa, spinosyn D 9-Psa 等。

[0014] 天然产生的 spinosyn 化合物可以通过从培养物 NRRL 18395, 18537, 18538, 18539, 18719, 18720, 18743 和 18823 发酵来制备。这些培养物已经保藏并且构成 Midwest Area Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 1815 North University Street, Peoria, IL 61604 原始培养物保藏的一部分。

[0015] 美国专利 5, 362, 634 和相应的欧洲专利申请 375316 A1 公开了 spinosyns A, B, C, D, E, F, G, H, 和 J。公开了这些化合物由培养选自 NRRL 18395, NRRL 18537, NRRL 18538 和 NRRL 18539 的新微生物刺糖多孢菌菌株产生。

[0016] WO 93/09126 公开了 spinosyns L, M, N, Q, R, S 和 T。其中也公开的是两个产生 spinosyn J 的菌株: NRRL 18719 和 NRRL 18720, 和产生 spinosyns Q, R, S, 和 T 的一个菌株 NRRL 18823。

[0017] WO 94/20518 和美国专利 5, 670, 486 公开了 spinosyns K, O, P, U, V, W 和 Y, 及其衍生物。也公开的是产生 spinosyn K 的菌株 NRRL 18743。

[0018] WO 01/19840 公开了由培养糖多孢菌种 LW107129 (NRRL 30141) 产生的 spinosyn 类似物。

[0019] WO 99/46387 和美国专利 6, 143, 526 公开了来自刺糖多孢菌的 spinosyn 生物合成基因。

[0020] Spinosyn 生物合成中涉及的基因的性质, 连同前体并入的以前研究 (Broughton 等, 1991), 表明 spinosyns 是由 2- 碳和 3- 碳羧酸逐步缩合产生环化和桥接的聚酮产生

的。这些反应的四环、糖苷配基产物通过添加鼠李糖基残基转变为假糖苷配基,通过添加二-N-甲基化糖即福洛氨糖 (forosamine) 来完成合成。在有些方面,这个过程类似于产生其它大环内酯(如抗生素红霉素、抗寄生虫阿弗菌素和免疫抑制剂雷帕霉素)的生物合成途径。尤其是,聚酮化合物核心是由很大的多功能蛋白装配起来的,那是 I 型聚酮合酶 (spn PKS)。这个多肽复合物包括一个装载模块 (loading module) 和十个延伸模块 (extension module),每个模块负责特定酰基-CoA 前体添加到正在生长的聚酮化合物链,以及 β -酮基羰基的还原程度。每个模块执行几种生物化学反应,这些反应是由该多肽的特定结构域实施的。所有延伸模块含有向酰基载体蛋白 (ACP) 提供前体的酰基的酰基转移酶 (AT) 结构域,和通过脱羧缩合给新的酰基-ACP 添加预先存在的聚酮链的 β -酮合酶 (KS) 结构域。一些延伸模块还存在另外的结构域:将 β -酮基还原为羟基的 β -酮还原酶 (KR) 结构域,除去羟基留下双键的脱水酶 (DH) 结构域,和将双键还原留下饱和碳的烯酰还原酶 (ER) 结构域。spn PKS 的装载模块不同于延伸模块,因为它含有变异 KS 结构域 (KSq),以及 AT 和 ACP 结构域。KSq 结构域,在一些其它的 I 型 PKS 装载模块(但不是所有)中也发现了它,据信它提供 ACP-结合酰基链脱羧的必需起始单位 (Bisang 等,1999)。末端延伸模块含有使聚酮链从 PKS 释放的硫酸酯酶/环化酶 (TE) 结构域。

[0021] spinosyn PKS DNA 区域由 5 个 ORFs 组成,符合读框 (in-frame) 的终止密码子在一些 ACP 结构域的末端,类似于其它产生大环内酯的细菌中的 PKS ORFs。这五个 spinosyn PKS 基因头尾排列,没有任何插入的非 PKS 功能,如在红霉素 PKS 基因 AI 和 AII 之间发现的插入元件 (Donadio 等,1993)。它们命名为 spnA, spnB, spnC, spnD, 和 spnE。美国专利 6,143,526 和 Waldron 等,2001 中鉴定了这五个 spinosyn PKS 基因中的每一个的核苷酸序列和相应的多肽。这些来源中也鉴定的是 PKS 基因的预测翻译产物,和结构域和模块的边界。

[0022] 在它合成之后,spinosyn 聚酮前体缩合形成大环内酯,以下称作聚酮化合物核心。杀虫活性的 spinosyns 的产生需要另外加工聚酮化合物核心。首先,C3 和 C14, C4 和 C12, 以及 C7 和 C11 之间应该形成碳-碳桥,产生糖苷配基中间体。(Waldron 等,2001) 已经提示了这些罕见反应的可能机制,但是不知道它们发生所需要的聚酮底物的结构特征。其次,在 C9 应该并入三-O-甲基鼠李糖以产生假糖苷配基。尚不知道鼠李糖在其添加到糖苷配基之前还是之后被正常甲基化,但是刺糖多孢菌能够在鼠李糖部分已连接到糖苷配基后添加甲基基团 (Broughton 等,1991)。甲基化应该以特定顺序发生 (2' 然后 3' 然后 4') 或不是它们的全部都发生,表明甲基转移酶具有非常特异的底物需要。第三加工步骤中,在 C17 添加福洛氨糖 (forosamine),是产生最具活性的 spinosyn 所需的。这个步骤中涉及的酶也具有严格的底物需要:福洛氨糖基 (forosaminyl) 转移酶将不使用糖苷配基作为底物,且在福洛氨糖连接到假糖苷配基之后,N-甲基转移酶将不对福洛氨糖 (forosamine) 作用。后一生物合成酶的这一底物特异性可能是从具有不同化学结构的前体产生新的生物活性 spinosyns 的障碍。

[0023] 在某些情况下,以前对聚酮合酶 (PKS) 的基因进行了操作已提供新的聚酮化合物。已经表明框内删除编码产生红霉素 (ery) PKS 的模块 5 中的 KR 结构域的一部分的 DNA 导致红霉素类似物的形成,即 5,6-双脱氧-3 α -碳霉糖基 (mycarosyl)-5-oxoerythronolide B 和 5,6-双脱氧-5-oxoerythronolide B (Donadio 等,1991)。同样地,通过相应的编码 PKS

的 DNA 的基因工程改造造成 ery PKS 的模块 4 的 ER 结构域中活性部位残基的改变,接着将其导入红色糖多孢菌 (*Saccharopolysporaerythraea*), 导致 6,7- 脱水红霉素 C(Donadio 等,1993) 的产生。WO 93/13663 描述了能够产生改变的聚酮化合物的另外类型的 ery PKS 基因的基因操作。

[0024] WO 98/01546 公开了用来自阿弗菌素 (ave)PKS 的装载模块取代 eryPKS 的装载模块,产生杂化 I 型 PKS 基因,它并入了不同起始单位来形成新的红霉素类似物。

[0025] 然而,也已经发现不是所有的 PKS 基因操作都产生所需新类似物。当 Donadio 等 (1993) 灭活 ery PKS 的 ER 结构域时,所得脱水衍生物不能完全加工,因为它不再是碳霉糖 (mycarose)-O- 甲基转移酶的底物。改变聚酮化合物起始单位可以阻止地中海拟无枝酸菌 (*Amycolatopsismediterranei*) 中利福霉素类似物的完全延伸和加工 (Hunziker 等, 1998)。假定延伸底物特异性加工是产生杀昆虫活性的 spinosyns 所需的,改变 spinosyn 聚酮化合物结构的基因操作将允许合成具有有效生物活性的完全加工分子不是显而易见的。然而,如果可以制备这种类似物,并且它们具有不同的杀昆虫活性谱,那么将非常期望它们,因为已知的 spinosyns 不能控制所有害虫。

[0026] 发明简述

[0027] 在一个方面,本发明提供了一种能够在刺糖多孢菌中起作用而产生生物活性的 spinosyn 的杂化 spinosyn 聚酮合酶,所述合酶包含与多个刺糖多孢菌延伸模块可操作相连的异源装载模块。在优选实施方案中,用红霉素 PKS 或阿弗菌素 PKS 的装载模块取代 spinosyn 装载结构域。Ave 和 ery 装载结构域尤其令人感兴趣,因为它们接受各种起始单位。也有效的是杂化 PKS 基因,其中异源装载模块整合罕见的起始单位,如雷帕霉素 (环己烯羧酸) 或 myxathiazole (3- 甲基丁酸) 的装载模块。在培养基中可以提供所需的前体,如环己烯羧酸或 3- 甲基丁酸,或可以将编码它们的生物合成酶的基因引入到生物中,使得可以内源合成它们。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了能够在刺糖多孢菌中起作用而产生生物活性 6- 乙基 spinosyn 化合物、16- 乙基 spinosyn 化合物、18- 乙基 spinosyn 化合物或 20- 乙基 spinosyn 化合物的杂化 spinosyn 聚酮合酶,所述杂化聚酮合酶是由 spinosyn 生物合成 DNA 产生的产物,该 DNA 已经被修饰使得 spinosyn PKS 中模块 8,3,2 或 1 的 AT 结构域的 DNA 分别被正常整合入乙基丙二酰 -CoA 的 AT 结构域的 DNA 取代。在优选实施方案中,编码相关 spinosyn AT 结构域的 DNA 被编码泰洛星 PKS 的模块 5 或莫能星 PKS 的模块 5 的 AT 结构域的 DNA 取代。在优选实施方案中,肉桂链霉菌 (*Streptomyces cinnamonensis*) 巴豆酰 -CoA 还原酶被共表达。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了能够在刺糖多孢菌中起作用而产生生物活性 18- 甲基 spinosyn 化合物或 20- 甲基 spinosyn 化合物的杂化 spinosyn 聚酮合酶,所述杂化聚酮合酶是由 spinosyn 生物合成 DNA 产生的产物,该 DNA 已经被修饰使得 spinosyn PKS 中模块 2 或 1 的 AT 结构域的 DNA 分别被正常整合入甲基丙二酰 -CoA 的 AT 结构域的 DNA 取代。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了能够在刺糖多孢菌中起作用而产生生物活性 16- 脱甲基 (desmethyl) spinosyn 化合物的杂化 spinosyn 聚酮合酶,所述杂化聚酮合酶是由 spinosyn 生物合成 DNA 产生的产物,该 DNA 已经被修饰使得 spinosyn PKS 中模块 3 的 AT 结构域的 DNA 分别被正常整合入丙二酰 -CoA 的 AT 结构域的 DNA 取代。在优选实施方案中,

模块 3 的 AT 结构域被编码雷帕霉素 PKS 的模块 2 的 AT 结构域的 DNA 取代。

[0031] 在另一个方面,本发明提供了制备 6-乙基 spinosyn 化合物,21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn 化合物,或 6-乙基-21-脱乙基-21-丙基 spinosyn 化合物的方法,它包括培养巴豆酰-CoA 还原酶与 spinosyn 生物合成途径共表达的转基因宿主生物。在优选实施方案中,用编码肉桂链霉菌的巴豆酰-CoA 还原酶的 DNA 转化该宿主生物。

[0032] 在另一个方面,本发明提供了已经用肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 还原酶的 DNA 转化的刺糖多孢菌菌株。

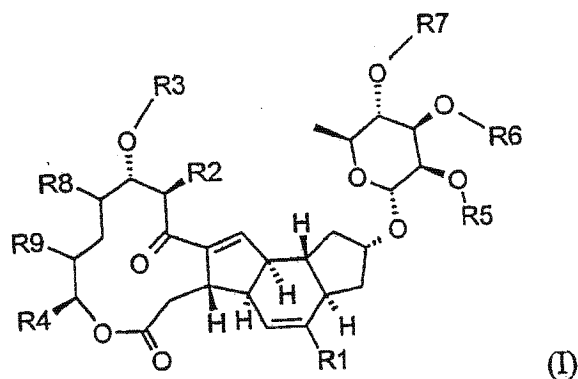
[0033] 在另一个方面,本发明提供了编码如上所述本发明的杂化 spinosyn 聚酮合酶的 DNA。

[0034] 在另一个方面,本发明提供了包含如上所述 DNA 的载体。

[0035] 在另一个方面,本发明提供了包含如上所述的 DNA 的宿主生物。

[0036] 在另一个方面,本发明提供了通式 (I) 的化合物

[0037]



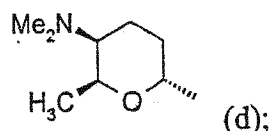
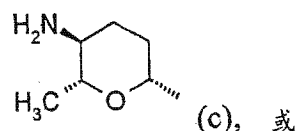
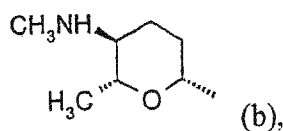
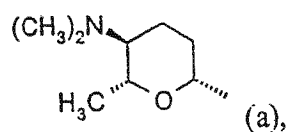
[0038] 其中

[0039] R1 是氢,甲基,或乙基;

[0040] R2 是氢,甲基,或乙基;

[0041] R3 是氢,

[0042]



[0043] R4 是甲基或乙基,二者任一可以被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代;

[0044] R4 是 α -分支 C_3-C_5 烷基, C_3-C_8 环烷基,或 C_3-C_8 环烯基,其中任何一个可以被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代;或

[0045] R4 是 3-6 员的杂环基,含有 O 或 S,其为饱和或完全或部分不饱和,且可以被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代;

[0046] R5 是氢或甲基;

[0047] R6 是氢或甲基;

[0048] R7 是氢或甲基;

[0049] R8 是氢,甲基,或乙基;

[0050] R9 是氢,甲基,或乙基;

[0051] 或通式 I 化合物的 5,6-二氢衍生物,前提是:

[0052] a) R4 是被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代的甲基或乙基;或

[0053] b) R4 是 α -分支 C_3-C_5 烷基, C_3-C_8 环烷基,或 C_3-C_8 环烯基,其中任何一个可以被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代;或

[0054] c) R4 是 3-6 员的杂环基,含有 O 或 S,其为饱和或完全或部分不饱和,且可以被一个或多个选自卤素,羟基, C_1-C_4 烷基, C_1-C_4 烷氧基, C_1-C_4 烷硫基,或氰基的基团取代;或

[0055] d) R1 或 R2 是乙基;或

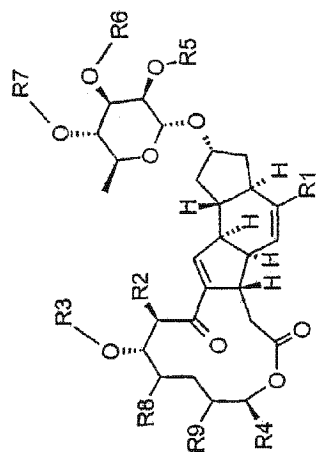
[0056] e) R8 是甲基或乙基;或

[0057] f) R9 是甲基或乙基。

[0058] 下列表 3 鉴定了本发明提供的示例化合物。以下引用的化合物编号是指表 3 中鉴定的化合物。

[0059]

表 3



(I)

化合物 编号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
1	21-脱乙基-21-环丙基 spinosyn A	H	CH ₃	(CH ₃) ₂ N H ₃ C (a)	环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
2	21-脱乙基-21-环丙基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
3	21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	环丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
4	21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	环丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
5	21-脱乙基-21-甲基硫代甲基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	甲基硫代甲基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
6	21-脱乙基-21-甲基硫代甲基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	甲基硫代甲基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
7	21-脱乙基-21-氧甲基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	氧甲基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

[0060]

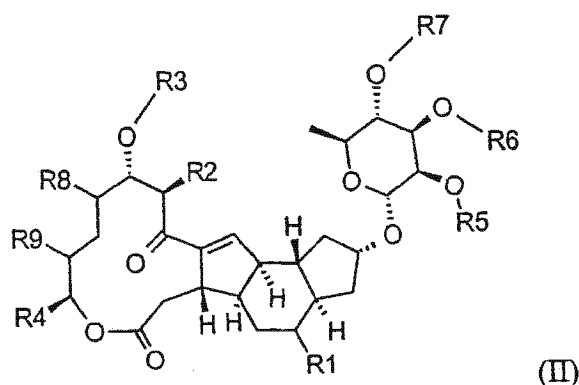
化合物 编号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
8	5, 6-二氢-21-脱乙酰基-21-环丁基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	环丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
9	21-脱乙酰基-21-异丙基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	异丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
10	21-脱乙酰基-21-异丙基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	异丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
11	21-脱乙酰基-21-仲丁基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	仲丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
12	21-脱乙酰基-21-仲丁基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	仲丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
13	21-脱乙酰基-21-甲基环丙基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	甲基环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
14	21-脱乙酰基-21-甲基环丙基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	甲基环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
15	21-脱乙酰基-21-(3-呋喃) spinosyn A	H	CH ₃	(a)	3-呋喃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
16	21-脱乙酰基-21-(3-呋喃) spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	3-呋喃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
17	21-脱乙酰基-21-环丙基 spinosyn A 17-假糖苷配基	H	CH ₃	H	环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
18	21-脱乙酰基-21-环丙基 spinosyn D 17-假糖苷配基	CH ₃	CH ₃	H	环丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
19	21-脱乙酰基-21-环丁基 spinosyn A 17-假糖苷配基	H	CH ₃	H	环丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

[0061]

化合物 编号	名称	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
20	21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn D 17- 假糖苷配基	CH ₃	CH ₃	H	环丁基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
21	16-脱甲基 spinosyn D	CH ₃	H	(a)	乙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
22	16-脱甲基 spinosyn D 17- 假糖苷配基	CH ₃	H	H	乙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
23	21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	正丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
24	6-乙基 spinosyn A	C ₂ H ₅	CH ₃	(a)	乙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
25	6-乙基-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A	C ₂ H ₅	CH ₃	(a)	正丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
26	16-脱甲基-16-乙基 spinosyn A	H	C ₂ H ₅	(a)	乙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
27	16-脱甲基-16-乙基 spinosyn D	CH ₃	C ₂ H ₅	(a)	乙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
28	21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn D	CH ₃	CH ₃	(a)	正丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
29	5,6-二氢-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A	H	CH ₃	(a)	正丙基	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H

[0062] 通式 I 化合物的 5,6- 二氢衍生物 (如表 3 中的化合物 8) 是通式 II 的化合物 :

[0063]



[0064] 其中 R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, 和 R9 如通式 I 所定义的。

[0065] 在另一个方面,本发明提供了选自 NRRL 30539, NRRL 30540, NRRL30541, 和 NRRL 30542 的刺糖多孢菌的生物纯培养物。

[0066] 在另一个方面,本发明提供了控制害虫的方法,它包括给害虫递送有效量的权利要求 1 的化合物。

[0067] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量权利要求 1 的化合物作为活性成分与适当稀释剂或载体组合的杀虫剂组合物。

[0068] 附图简述

[0069] 图 1 显示了 pCJR81 的构建。

[0070] 图 2 显示了用于在刺糖多孢菌中基因表达的载体 pLSB2 和 pLSB3 的构建。

[0071] 图 3 显示了将 ery 导入 spinosyn 途径的载体即 pLSB62 的构建。

[0072] 图 4 显示了刺糖多孢菌 13E 的杂化 ery/spn PKS 途径。

[0073] 图 5 显示了将 ave 导入 spinosyn 途径的载体即 pLSB29 的构建。

[0074] 图 6 显示了刺糖多孢菌 21K2 的杂化 ave/spn PKS 途径。

[0075] 图 7a 和 7b 显示了用于产生模块 3AT 交换质粒的中间质粒即 pALK26 的构建。

[0076] 图 8 显示了用于将 rapAT2 导入 spinosyn 模块 3 的载体即 pALK39 的构建。

[0077] 图 9 显示了用于在刺糖多孢菌中表达肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 还原酶基因的载体即 pALK21 的构建。

[0078] 图 10 显示了用于将 ty1AT5 导入 spinosyn 模块 3 的载体即 pALK36 的构建。

[0079] 图 11 显示了菌株刺糖多孢菌 7D23 的杂化 PKS 途径。

[0080] 图 12 显示了菌株刺糖多孢菌 36P4 的杂化 PKS 途径。

[0081] 序列简述

[0082] SEQ ID NO :1 是寡核苷酸 PRIS1。

[0083] SEQ ID NO :2 是寡核苷酸 PRIS2。

[0084] SEQ ID NO :3 是普那霉素抗性的启动子的 DNA 序列。

[0085] SEQ ID NO :4 是寡核苷酸 CR311。

[0086] SEQ ID NO :5 是寡核苷酸 CR312。

[0087] SEQ ID NO :6 是寡核苷酸 SP28。

[0088] SEQ ID NO :7 是寡核苷酸 SP29。

[0089] SEQ ID NO :8 是用于克隆的编码 ery PKS 装载模块的 DNA 片段,在 bp 1-6 和 bp1680-1685 导入了限制性酶切位点。

[0090] SEQ ID NO:9 是寡核苷酸 SP14。

[0091] SEQ ID NO:10 是寡核苷酸 SP15。

[0092] SEQ ID NO:11 是用于克隆的编码 ave PKS 装载模块的 DNA 片段,在 bp 1-6 和 bp1689-1694 导入了限制性酶切位点。

[0093] SEQ ID NO:12 是寡核苷酸 CR322。

[0094] SEQ ID NO:13 是寡核苷酸 CR323。

[0095] SEQ ID NO:14 是寡核苷酸 CR324。

[0096] SEQ ID NO:15 是寡核苷酸 CR325。

[0097] SEQ ID NO:16 是寡核苷酸 CR328。

[0098] SEQ ID NO:17 是寡核苷酸 CR329。

[0099] SEQ ID NO 18 是寡核苷酸 CR 330。

[0100] SEQ ID NO:19 是寡核苷酸 CR 321。

[0101] SEQ ID NO:20 是用于克隆的编码 rap AT2 的 DNA 片段,在 bp 1-6 和 bp832-837 导入了限制性酶切位点。

[0102] SEQ ID NO:21 是寡核苷酸 CCRMNF。

[0103] SEQ ID NO:22 是寡核苷酸 CCRMNR。

[0104] SEQ ID NO:23 是用于表达肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 还原酶的 DNA 序列,在 bp 1-6 和 bp1389-1394 导入限制性酶切位点。

[0105] SEQ ID NO 24 是寡核苷酸 AK1。

[0106] SEQ ID NO 25 是寡核苷酸 AK2。

[0107] SEQ ID NO 26 是用于克隆的编码 ty1 AT5 的 DNA 片段,在 bp 1-6 和 bp967-972 导入了限制性酶切位点。

[0108] 发明详述

[0109] 培养物说明

[0110] 下表中鉴定了来源于刺糖多孢菌 NRRL18537 或刺糖多孢菌 NRRL18538 并产生本发明化合物的新菌株。该培养物已经根据布达佩斯条约在 Midwest Area Regional Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, 815 North University Street, Peoria, IL 61604 保藏。该菌株保藏于 2002 年 1 月 15 日,分配的保藏号如下表 4 详述。

[0111] 表 4

[0112]

保藏号	菌株	亲本菌株
NRRL30539	刺糖多孢菌 7D23	NRRL18538
NRRL30540	刺糖多孢菌 13E	NRRL18537
NRRL30541	刺糖多孢菌 21K2	NRRL18538
NRRL30542	刺糖多孢菌 36P4	NRRL18538

[0113] 培养特性

[0114] 来源于刺糖多孢菌 NRRL 18537 或刺糖多孢菌 NRRL 18538 并产生本发明化合物的新菌株具有下列培养特性：

[0115] 所有培养物在 ISP2 和 Bennett' s 琼脂上生长良好, 在使用的所有培养基中产生气生菌丝。气生孢子团以白色占优势(随年龄发展为浅粉色)。基底菌丝体为奶油色至浅褐色, 没有明显的区别性颜色。可溶的褐色色素释放到培养基中。在使用的任何培养基中没有观察到显著差异。

[0116] Spinosyn 途径和附属基因的操作

[0117] 为了促进 spinosyn 生物合成途径的操作, 获得了粘粒 pRHB9A6 和 pRHB3E11, 所述粘粒在美国专利 6, 274, 350B1 和 Waldron 等 (2001) 中描述。

[0118] 从 spinosyn 生物合成基因的序列不能直接明显知道 spinosyns 的产生是如何调节的。为了避免与基因簇调节相关的潜在复杂情况, 使用很多异源启动子来驱动全部或部分聚酮合酶部分(基因 spnA, spnB, spnC, spnD 和 spnE)。发现下列启动子至少在制备 spinosyn PKS 中与天然启动子同样有效(由终产物 spinosyn A, spinosyn D, spinosyn A C17-假糖苷配基和 spinosyn D C17-假糖苷配基的产生判断): 来自 *S. coelicolor* 的放线菌紫素生物合成簇的 actI 启动子, 与其相关活化剂 actII-ORF4 一起使用(如 W0 98/01546, W098/01571, Rowe 等 1998 所述); 和普那霉素抗性的启动子。以前报道了后者驱动 *S. erythrae* 的聚酮基因的过度表达(Blanc 等 1995; Sala-Bey 等 1995)。它是链霉菌物种中可由生理应力诱导的启动子。刺糖多孢菌中异源启动子的使用不限于上述的那些, 并且可包括预期在刺糖多孢菌中起作用的其它启动子。

[0119] 使用异源装载模块的杂化 spinosyn PKS

[0120] 在一个方面, 本发明提供了在刺糖多孢菌中起作用而产生被加工成生物活性 spinosyns 的聚酮化合物的杂化 PKSs。所得聚酮化合物延伸至与天然 spinosyns 相同的长度, 并通过交联和糖基化加工产生新的杀昆虫剂 spinosyns。优选的杂化 PKS 包含来自 spn PKS 的延伸模块以及异源装载模块, 可产生具有不同起始单位的 spinosyn 聚酮化合物。在异源装载模块之后含有 spn 延伸模块的杂化 spinosyn PKS 基因可提供在 C21 具有不同侧链的新 spinosyns。这个侧链的性质由被装载模块选择以启动聚酮化合物合成的起始单位决定。侧链中的改变可能改变所得 spinosyn 的物理特性或生物活性。尤其有用的是提供这样一种杂化 PKS 基因, 其中装载模块接受很多不同的羧酸, 包括非天然的酸。通过不同起始单位的整合, 这种基因可以用于产生很多不同的 spinosyns。例如, spn PKS 的装载模块可被已知接受多种起始单位(Dutton 等, 1991) 的 ave PKS 的装载模块取代。也已知 ery PKS 的装载模块也可以接受不同的起始单位(Peacey 等, 1998)。因此, 表达这种杂化 spinosyn PKS 基因的生物可产生新的 spinosyns, 其中在 C21 的侧链的性质由饲喂该生物的羧酸决定。该侧链可以是不同长度, 带有支链或环, 和 / 或含有杂原子。

[0121] 更优选地, 该杂化 PKS 包括接受很多不同羧酸的装载模块, 因此该杂化基因装配体可以用于产生很多不同的 spinosyns。特别有效的实例含有 spn 延伸模块, 以及来自红霉素(ery)PKS 的装载模块或来自阿弗菌素(ave)PKS 的装载模块。

[0122] 使用 ery 装载模块的杂化 spinosyn PKS

[0123] 红霉素生物合成簇(eryATOACP0)的装载模块管理丙酰-CoA 导入红霉素分子的

起始物。以前已经表明通过将游离酸补入制备培养基,不同的起始物可以并入红霉素分子(Pacey 等 1998)。

[0124] 如下列实施例所示,红霉素装载模块取代 spinosyn 装载模块的杂化 spnA 基因的产生导致可接受游离酸进入起始单位的 spinosyn PKS。在下列示例性实施例中,红霉素装载模块就在保守区中 KS 结构域内与 spinosyn KS1 起始处拼接。优选在结构域内或接近其边缘处于保守 DNA 序列中产生新的结构域或模块连接;然而,通过在结构域之间的区域改造拼接部位可替换性地产生活性聚酮合酶(WO 98/01546)。

[0125] ery 装载片段按照读码框克隆到 spnA 区域和其上游以允许与天然 spn PKS 的同源重组。ery 装载片段的上游是 actI 启动子(P_{actI})或普那霉素抗性的启动子(P_{ptr}),分别产生质粒 pLSB61 和 pLSB62。这些质粒基于 pKC1132,因此是安普霉素抗性的。它们也携带用于 DNA 接合转移到放线菌的 oriT(Bierman 等 1992, Matsushima 等 1994)。这些构建体通过接合转化入刺糖多孢菌 NRRL 18537。PCR 扩增证实接合后体在适当启动子下含有杂化 ery/spn PKS。

[0126] 刺糖多孢菌 NRRL 18537 :pLSB62 称作刺糖多孢菌 13E,并用于 spinosyn 制备的分析。

[0127] 如下列实施例证明,当在制备培养基中培养时,刺糖多孢菌 13E 主要产生大约等量的 spinosyn A 和 spinosyn E。Spinosyns 的总产量估计大约是野生型 spinosyn A 水平的 10-25%,这代表了 spinosyn E 产量大约增加 10 倍。这个产物比例的改变可能是 ery 装载模块相对于 spn 装载模块具有更宽松的特异性的反映,或刺糖多孢菌与红色糖多孢菌相比不同底物供应的反映,或二者的组合。当红霉素途径上调时,在红色糖多孢菌中观察到 ery 装载模块醋酸盐的整合(Rowe 等 1998)。菌株 13E 中 spinosyn E 产量增加超过野生型水平意味着这将是制备 spinosyn E 的优选菌株。

[0128] 很多羧酸补入刺糖多孢菌 13E,导致起始单位改变的新 spinosyn 类似物的产生。新 spinosyns 中鉴定的是 21-脱乙基-21-环丙基 spinosyns A 和 D(通过整合入环丙烷羧酸),21-脱乙基-21-环丁基 spinosyns A 和 D(通过整合入环丁烷羧酸)和 21-脱乙基-21-甲基硫代甲基 spinosyns A 和 D(来自甲基硫代乙酸)。新的类似物显示合理的层析截留时间,特征性 UV 发色团和 MS 片段化模式,准确的质量测定支持预测的结构。全 NMR 表征证实分离的 21-环丙基和 21-环丁基化合物的结构分配。分离的化合物在昆虫控制试验中有活性。

[0129] 刺糖多孢菌 13E 菌株的用途不限于制备这些化合物。预期通过补入其它酸可以鉴定很多其它 spinosyn 类似物,如用于制备新的红霉素的那些酸(Pacey 等 1998)。

[0130] 实施例 1pCJR81 的构建

[0131] 见图 1。质粒 pCJR81 是表达普那霉素抗性的启动子之下的聚酮化合物基因的载体。它构建如下:

[0132] 设计两个重叠寡核苷酸执行 PCR 反应,其中它们起引物和模板的作用。它们导入有整合了 ATG 起始密码子的 NdeI 限制性位点,使得可以以与核糖体结合位点最佳距离克隆基因。整合了 SpeI 限制性位点以促进进一步克隆。寡核苷酸是 PRIS1(SEQ ID NO:1)和 PRIS2(SEQ IDNO:2)。

[0133] 使用制造商的条件用 Pwo 耐热 DNA 聚合酶执行扩增以获得启动子片段。用 T4 多

核苷酸激酶磷酸化 112bp 片段,并克隆入用 SmaI 消化和去磷酸化的商业上可获得的 pUC18。测序含插入物的质粒。一个含有正确序列的质粒记做 pRIS4。

[0134] 来自 pRIS4 的 94bp 插入物被切除作为 SpeI/NdeI 片段 (SEQ ID NO :3) 并克隆进入先用 SpeI 和 NdeI 消化的 pCJR24(WO 98/01546, WO98/01571, Rowe 等 1998)。一个正确的质粒记做 pCJR81。

[0135] 实施例 2 用于来自刺糖多孢菌表达的质粒的构建

[0136] 见图 2。构建质粒 pLSB2 和 pLSB3 以进行聚酮化合物基因或附属基因在刺糖多孢菌中的表达。质粒 pLSB2 含有 actI 启动子 (P_{actI}) 及其相关活化剂即 actII-ORF4。质粒 pLSB3 含有普那霉素抗性的启动子 (P_{ptr})。这些质粒构建如下:

[0137] 质粒 pKC1132(Bieman 等 1992) 含有转移起点 ($oriT$),和用于在大肠杆菌和放线菌中选择的安普霉素抗性标记。因此它可以用于大肠杆菌中 DNA 操作,并允许最终质粒通过接合导入刺糖多孢菌。为了提供适当的 EcoRV/SpeI/NdeI/XbaI 限制性位点,用两个寡核苷酸 CR311(SEQ ID NO :4) 和 CR312(SEQ ID NO :5) 的接头取代 pKC 1132 的多接头 (polylinker)。

[0138] 用 PvuII 消化质粒 pKC 1132 并用虾碱性磷酸酶将末端去磷酸化。用 T4 多核苷酸激酶磷酸化寡核苷酸 CR311 和 CR312,退火并克隆进入 pKC1132-PvuII 而产生 pLSB1。从 pCJR24 分离含有放线菌紫素途径特异性活化剂即 actII-ORF4 和 actI 启动子的 SpeI/NdeI 片段 (WO98/01546, WO 98/01571, Rowe 等 1998) 和从 pCJR81 分离含有普那霉素抗性的启动子的 SpeI/NdeI 片段 (上述,实施例 1)。这些片段的每一个都分别克隆进入用 SpeI 和 NdeI 消化的 pLSB1 而产生 pLSB2 (含有 actII-ORF4 和 P_{actI}) 和 pLSB3 (含有 P_{ptr})。

[0139] 实施例 3 将红霉素聚酮合酶的装载模块整合入 spinosyn 聚酮合酶的载体的构建

[0140] 见图 3。将红霉素聚酮合酶的装载模块整合入 spinosyn 聚酮合酶的载体含有红霉素素装载模块 (AT0ACP0),随后是提供整合同源性的 spinosyn PKS 的第一个模块的区域。这个载体记做 pLSB62,并构建如下。

[0141] 使用 pCJR26 作为模板,以及寡核苷酸 SP28(SEQ ID NO :6) 和 SP29(SEQ ID NO :7) 通过 PCR 扩增红霉素装载模块 (Rowe 等 1998)。SP28 在 ery 序列的起始密码子处整合了 NdeI 位点,SP29 在 KS1 结构域起始处整合了 NheI 位点。

[0142] PCR 片段被磷酸化,凝胶纯化并克隆进入先用 SmaI 消化和去磷酸化的 pUC18。筛选具有插入物的克隆并测序。一个含有正确序列的克隆记做 pLSB44。它含有 NheI 位点接近多接头的 EcoRI 位点方向的插入物。从 NdeI 位点到 NdeI 位点的所用的红霉素装载模块片段序列如 SEQ ID NO8 所示。

[0143] 质粒 pLSB8 (实施例 11 中描述) 含有在 spnKS1 的 NheI 位点开始的 spnA 片段。从 pLSB44 切除含有红霉素装载模块的片段作为 NdeI/NheI 片段并克隆进入先用 NdeI 和 NheI 消化的 pLSB8,得到 pLSB56。pLSB56 中含有的片段含有按读码框与 spinosyn KS1 拼接的红霉素装载模块,并且具有足以发生整合的与 spnA 同源的区域。

[0144] 除去这个区域作为 NdeI/Xba I 片段并克隆进入 pLSB3 得到 pLSB62。这使新的 ery/spn 杂化片段在载体中置于 P_{ptr} 之下,该载体可以通过接合转移到刺糖多孢菌并使用安普霉素抗性标记进行选择。

[0145] 实施例 4 含有包含与 spinosyn PKS 的 KS1 融合的红霉素装载模块的杂化聚酮合

酶的刺糖多孢菌菌株的产生

[0146] 见图 4。通过大肠杆菌 S17-1 (Simon 等, 1983) 的接合 (Matsushima 等 1994) 用 pLSB62 转化刺糖多孢菌 NRRL 18537。选择转化体的抗安普霉素抗性并用 PCR 筛选。单一转化体记做菌株刺糖多孢菌 13E。

[0147] 实施例 5 刺糖多孢菌发酵的化学分析

[0148] 下列 HPLC 方法可有效分析制备天然 spinosyns 和新的非天然的工程改造的 spinosyns 的发酵。

[0149] 在 2ml Eppendorf 管中, 通过添加 20% 氨溶液 (ca. 20 μ l) 将发酵肉汤培养基等分部分 (1mL) 调节到 pH $\sim$ 10。乙基醋酸酯 (1mL) 添加到样品中并使用旋涡混合器有力混合 60 秒。在 microfuge 中离心分离混合物并将上相移取到清洁的 2ml Eppendorf 管。使用 Speed-vac 蒸发除去乙基醋酸酯。残留物溶于甲醇 (250 μ l) 并使用 microfuge 澄清。用下列 HPLC 系统分析:

[0150] 灌注体积: 50 μ l

[0151] 柱固定相: 150 $\times$ 4.6mm 柱, 碱灭活硅胶 3 μ m (Hypersil C₁₈-BDS)。

[0152] 流动相 A: 10% 乙腈: 90% 水, 含 10mM 醋酸铵和 0.15% 甲酸。

[0153] 流动相 B: 90% 乙腈: 10% 水, 含 10mM 醋酸铵和 0.15% 甲酸。

[0154] 流动相梯度: T = 0 分钟, 10% B; T = 1, 10% B; T = 25, 95% B; T = 29, 95% B; T = 29.5, 10% B。

[0155] 流速: 1mL/分。

[0156] 检测: 在 254nm UV; 超过 m/z 范围 100-1000 的 MS。

[0157] 实施例 6 刺糖多孢菌 13E 发酵产生的代谢产物

[0158] 用冰冻营养原液 (1 : 1CSM 培养物: 冷冻防腐剂, 其中冷冻防腐剂是溶于水的 10% 乳糖, 20% 甘油 w/v) 培养刺糖多孢菌 13E。初级预培养物生长于 CSM 培养基 (胰蛋白酶大豆肉汤培养基 30g/l, 酵母提取物 3g/l, 硫酸镁 2g/l, 葡萄糖 5g/l, 麦芽糖 4g/l; Hosted 和 Baltz 1996; 美国专利 5, 362, 634), 共 50mL 培养物, 250mL 带钢弹簧的 Erlenmeyer 瓶中, 在 30°C, 75% 相对湿度下, 250rpm 下两英寸来回振荡三天。这用于在营养培养基 (葡萄糖 10g/l, N-Z-胺 A 30g/l, 酵母提取物 3g/l, 硫酸镁 2g/l; Strobel 和 Nakatsukasa 1993; 美国专利 5, 362, 634) 中以 5% v/v 接种次级预培养物, 其在相同条件下培养另外 2 天。次级营养预培养物用于以 5% v/v 接种制备培养基 (葡萄糖 67g/l, Proflo 棉籽粉 25g/l, 脲化牛奶营养物 22g/l, 玉米浸泡液 12g/l, 甲基油酸酯 40g/l, 碳酸钙 5g/l, 用氢氧化钠使 pH 调至 7.0; Strobel 和 Nakatsukasa 1993)。在与预培养相同的条件下发酵小规模制备培养物, 但是进行 7-10 天。对于初始刺糖多孢菌 13E 生产, 小规模培养物在 250ml 带钢弹簧的 Erlenmeyer 瓶的 30ml 制备培养基中生长 7 天。

[0159] 对于产生的代谢产物的鉴定, 如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。通过与可信标准, 以及来自未转化的菌株刺糖多孢菌 NRRL 18537 的发酵提取物比较, 由刺糖多孢菌 13E 产生的主要化合物鉴定为 spinosyns A 和 E (产生的量大约相等) 和 spinosyn D (观察到少量产物)。刺糖多孢菌 13E 菌株的滴定度是 $\sim$ 10-15mg/l 的总 spinosyns。刺糖多孢菌 13E 的产物比例不同于 NRRL18537, 其 spinosynE 的相对产量明显增加。

[0160] 实施例 7 前体指导的从刺糖多孢菌 13E 产生新 spinosyns (化合物 1-6 的制备)

[0161] ery/spn 杂化 PKS 用于产生新的 spinosyn 代谢产物, 其中将羧酸补入制备培养基。ery 装载模块将羧酸整合入分子的起始物中。

[0162] 平行制备瓶 (30mL, 在带有弹簧的 250mL Erlenmeyer 瓶中) 如实施例 6 所述进行接种。24h 后, 这些中每一个补入羧酸 (溶于水形成的原液和用氢氧化钠将 pH 调节到 6.5), 终浓度 2-6mM。7 天后, 如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。UV 和 MS 层析谱中新峰的出现表明环丁基羧酸、环丙基羧酸和甲基硫代乙酸的整合产生了新的 C21 修饰的 spinosyns (表 5)。新化合物的 MS 谱提供 $[M+H]^+$ 离子和福洛氨糖 (forosamine) 片段离子。

[0163] 表 5

[0164]

补入的羧酸	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
环丙基羧酸	1	23.5	744.4 $[M+H]^+$; 142.4
环丙基羧酸	2	25.0	758.5 $[M+H]^+$; 142.3
环丁基羧酸	3	25.7	758.5 $[M+H]^+$; 142.3
环丁基羧酸	4	27.3	772.5 $[M+H]^+$; 142.2
甲基硫代乙酸	5	22.9	764.4 $[M+H]^+$; 142.3
甲基硫代乙酸	6	24.3	778.5 $[M+H]^+$; 142.3

[0165] 实施例 8 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyns A 和 D (化合物 3 和 4) 的制备和分离

[0166] 将刺糖多孢菌 13E 的冰冻营养原液接种到 CSM (50ml, 在带弹簧的 250mL Erlenmeyer 瓶中) 的初级营养预培养物中。如实施例 6 所述制备和孵育在营养培养基 (250ml, 在带弹簧的 2L Erlenmeyer 瓶中) 中的次级预培养物, 但是在 300rpm 下, 一英寸来回振荡。

[0167] 如实施例 6, 制备十二至 14L 制备培养基, 添加 0.01% v/v Pluronic L-0101 (BASF) 防泡剂。用次级营养预培养物以 5% v/v 接种制备培养基, 并允许在 20L 搅拌的生物反应器中 30℃ 发酵 7-10 天。气流设置在 0.75vvm, 超压设置在 0.5barg 或之下, 为了保持溶解氧压力处于或高于 30% 空气饱和度, 叶轮尖 (impeller tip) 速度控制在 0.39 和 1.57ms⁻¹ 之间。如果需要, 添加另外的 Pluronic L0101 (BASF) 控制发泡。在 25 小时, 向生物反应器中添加环丁基羧酸, 至终浓度 5mM。7 天后收集发酵肉汤培养基并离心使澄清, 从而提供上清和细胞。与等体积甲醇充分混合来提取细胞 (1L), 接着允许静置 30 分钟。离心细胞-甲醇浆液, 倾倒入上清。重复该步骤。添加 5N NaOH 调节发酵上清 (12L) 至 pH ~ 10, 在 0.75 体积的乙基醋酸酯下轻轻搅拌 8 小时。吸出除去上相并重复提取。乙基醋酸酯和乙醇馏分混合并真空除去溶剂, 产生黄色-棕色油/水混合物 (1L)。这与乙基醋酸酯 (2L) 混合并用 50mM 酒石酸 (3×1.5L) 溶液提取。混合酒石酸提取物, 用 5N NaOH 调节 pH ~ 10, 并用乙基

醋酸酯 (3×1.5L) 溶液提取。混合乙基醋酸酯提取物并真空除去溶剂,留下棕色含油残留物 (7.5g)。残留物溶于乙基醋酸酯 (500mL) 并用 50mM 酒石酸 (350mL) 提取三次。混合酒石酸馏分,调节至 pH ~ 10 并用乙基醋酸酯 (3×500mL) 再次提取。混合乙基醋酸酯馏分并真空除去溶剂产生棕色含油残留物 (0.5g)。

[0168] 含油残留物溶于甲醇 (1.5ml) 并以两等份进行层析,即:通过碱灭活的反相硅胶 (Hypersil C₁₈-BDS, 5 μm; 21×250mm), 以 20ml/ 分的流速用如下述流动相梯度洗脱。

[0169] 流动相梯度: T = 0 分钟, 15% B; T = 5, 35% B; T = 35, 90% B; T = 45, 95% B。

[0170] 流动相 A: 10% 乙腈 / 90% 水, 含 10mM 醋酸铵和 0.15% 甲酸。

[0171] 流动相 B: 90% 乙腈 / 10% 水, 含 10mM 醋酸铵和 0.15% 甲酸。

[0172] 每隔 30 秒收集馏分。混合来自最初分馏的含 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn A 的馏分, 真空除去溶剂。残留物通过反向硅胶 (Prodigy C₁₈, 5 μm; 10×250mm) 进行层析, 以 5ml/ 分的流速用如下述梯度洗脱。

[0173] T = 0, 55% B; T = 5, 70% B; T = 35, 95% B; T = 45, 95% B。

[0174] 每隔 30 秒收集馏分。混合含 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn A 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。混合最初粗分馏的含有 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn D 的馏分并真空除去溶剂。残留物通过反向硅胶 (Prodigy C₁₈, 5 μm; 10×250mm) 进行层析, 以 5ml/ 分的流速用如下述梯度洗脱。

[0175] T = 0 分钟, 25% B; T = 5, 55% B; T = 35, 95% B; T = 45, 95% B。

[0176] 每隔 30 秒收集馏分。混合含 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn D 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg 容量) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。

[0177] 通过分光镜方法, 包括核磁共振光谱 (NMR), 质谱分析法 (MS)、紫外线光谱法 (UV)、偶联高效液相色谱 - 质谱分析 (HPLC-MS), 和与已知化合物 spinosyns A, D, E 和 F 的光谱数据进行比较, 确定新的 spinosyns 的化学结构。

[0178] 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn A (化合物 3) 具有下列特征:

[0179] 分离产量: 3.1mg

[0180] 分子量: 757

[0181] 分子式: C₄₃H₆₇NO₁₀

[0182] UV (HPLC-MS 分析过程中通过二极管阵列检测): 245nm

[0183] 电喷 MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 758.5; 福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.2。

[0184] 准确 FT-ICR-MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 758.4830 (需要: 758.4838)。

[0185] 表 6 显示了 21- 脱乙基 -21- 环丁基 spinosyn A 在 CDCl₃ 中的 ¹H 和 ¹³CNMR 化学迁移数据。

[0186] 表 6

[0187]

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	—	172.8	21	4.80	
2a	2.43	33.8	22	2.34	
2b	3.12	33.8	23a	1.65	
3	3.01	47.5	23b	1.65	
4	3.54	41.7	24a	1.76	17.8
5	5.80	128.8	24b	1.76	—
6	5.88	129.3	25a	1.86	24.6
7	2.17	41.1	25b	1.86	—
8a	1.37	36.2	1'	4.85	95.4
8b	1.92	—	2'	3.49	77.7
9	4.31	76.0	3'	3.46	81.0
10a	1.33	37.3	4'	3.12	82.2
10b	2.26	—	5'	3.54	67.9
11	0.91	46.0	6'	1.28	17.8
12	2.88	49.4	2' -OMe	3.49	59.0
13	6.76	147.5	3' -OMe	3.50	57.7
14	—	144.2	4' -OMe	3.56	60.9
15	—	202.9	1''	4.42	103.4
16	3.26	47.8	2''a	1.47	30.8

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
16-Me	1.17	16.1	2''b	1.98	—
17	3.61	80.6	3''a	1.47	18.5
18a	1.49	34.4	3''b	1.98	—
18b	1.49	—	4''	2.26	64.8
19a	—	21.7	5''	3.84	73.5
19b	—	—	6''	1.26	19.0
20a	1.34	28.2	4''-NMe ₂	2.26	40.6
20b	1.44	—			

[0188] 化学迁移参照 CHCl₃ 在 7.26ppm 的质子。

[0189] 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn D(化合物 4) 具有下列特征：

[0190] 分离产量：~ 1mg

[0191] 分子量：771

[0192] 分子式：C₄₄H₆₉NO₁₀

[0193] UV(HPLC-MS 分析过程中通过二极管阵列检测)：245nm

[0194] 电喷 MS：[M+H]⁺ 的 m/z = 772.5；福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.2。

[0195] 材料量少妨碍对这个分子的详细 NMR 研究，但是所累积的数据与预期结构一致。通过与 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A 的数据比较来辅助这一分析。

[0196] 实施例 9 5,6-二氢-21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A(化合物 8) 和 5,6-二氢-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A(化合物 29) 的制备

[0197] 2mL 甲苯和 0.5ml 乙醇中的 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A(3.1mg, 0.004mmol) 用缓慢的氮流喷 20 分钟，接着添加 2mg 氯化三(三苯基膦)铑，在 60°C 和 1atm 下氢化溶液 16 小时。冷却和除去溶剂后，使用 10cm×2cm 硅胶柱层析残留物，分别用含 0%，2%，3%，4%，和 5% 的 MeOH 的 5×25mL 二氯甲烷洗脱。混合含产物的馏分并浓缩得到 2.1mg 5,6-二氢-21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A。MS M+760。

[0198] 使用相同步骤从 21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A(化合物 23) 制备 5,6-二氢-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A(化合物 29)。

[0199] 实施例 10 21-脱乙基-21-环丙基 spinosyns A 和 D(化合物 1 和 2) 的制备和分离

[0200] 将刺糖多孢菌 13E 的冰冻营养原液接种到 CSM(50ml，接种在带弹簧的 250mL

Erlenmeyer 瓶) 中的初级营养预培养物中。如实施例 8 所述制备和孵育在营养培养基 (250ml, 在带弹簧的 2L Erlenmeyer 瓶中培养) 中的次级预培养物。

[0201] 如实施例 6, 制备十四升制备培养基, 添加 0.01% v/v PluronicL-0101 (BASF) 发泡剂。用次级预培养物以 5% v/v 接种制备培养基, 并允许在 20L 搅拌的生物反应器中在实施例 8 所述条件下发酵 7-10 天。在 45 小时, 环丙基羧酸补入生物反应器中, 至终浓度 5mM。7 天后收集发酵肉汤培养基并如实施例 8 所述提取。

[0202] 含油残留物溶于甲醇 (1.5ml) 并如实施例 8 所述进行初次粗层析。混合含有 21- 脱乙基 -21- 环丙基 spinosyn A 的最初分离物的馏分并真空除去溶剂。残留物通过反相硅胶 (Prodigy C₁₈, 5 μ M; 10 $\times$ 250mm) 进行层析, 以 5ml/ 分的流速用如下述梯度洗脱。

[0203] T = 0 分钟, 55% B; T = 70% B; T = 30, 95% B; T = 35, 95% B。

[0204] 每隔 30 秒收集馏分。混合含 21- 脱乙基 -21- 环丙基 spinosyn A 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2 $\times$ 10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。

[0205] 21- 脱乙基 -21- 环丙基 spinosyn A (化合物 1) 具有下列特征:

[0206] 分离产量: $\sim$ 1mg

[0207] 分子量: 743

[0208] 分子式: C₄₂H₆₅NO₁₀

[0209] UV (HPLC-MS 分析过程中通过二极管阵列检测): 245nm

[0210] 电喷 MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 744.5; 福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.2。

[0211] 表 7 总结了 21- 脱乙基 -21- 环丙基 spinosyn A 在 CDCl₃ 中的 ¹H 和 ¹³CNMR 光谱数据。

[0212] 表 7

[0213]

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	—	—	20b	1.62	—
2a	2.43	34.0	21	4.18	79.3
2b	3.13	—	22	0.89	16.5
3	3.00	47.3	23a*	0.44	2.3
4	3.49	41.4	23b*	0.14	—
5	5.87	129.1	24a*	0.44	3.7
6	5.79	128.6	24b*	0.14	—

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
7	2.15	—	25	1.17	16.0
8a	1.34	36.0	1'	4.84	95.2
8b	1.91	—	2'	3.49	77.5
9	4.30	75.9	3'	3.45	80.9
10a	1.32	37.0	4'	3.10	82.1
10b	2.24	—	5'	3.54	67.7
11	0.89	45.9	6'	1.27	17.6
12	2.85	34.0	2' -OMe	3.49	58.8
13	6.74	147.4	3' -OMe	3.48	57.5
14	—	—	4' -OMe	3.55	60.7
15	—	—	1''	4.41	103.4
16	3.26	47.5	2'' a	1.47	30.8
17	3.62	80.6	2'' b	1.98	—
18a	1.51	34.2	3'' a	1.45	18.2
18b	1.51	—	3'' b	2.24	—
19a	1.18	22.0	4''	2.24	64.7
19b	1.74	—	5''	3.48	73.4
20a	1.62	30.9	6''	1.27	18.7
			4'' -NMe ₂	2.24	40.6

[0214] 化学迁移参照 CHCl₃ 在 7.26ppm 的质子。

[0215] * 这些标记 (assignment) 可互换。

[0216] 21-脱乙基-21-环丙基 spinosyn D(化合物 2) 具有下列特征:

[0217] 分离产量: ~ 0.5mg

[0218] 分子量: 757

[0219] 分子式: $C_{43}H_{67}NO_{10}$

[0220] Uv(HPLC-MS 分析过程中通过二极管阵列检测): 245nm

[0221] 电喷 MS: $[M+H]^+$ 的 $m/z = 758.5$; 福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 $m/z = 142.2$ 。

[0222] 材料量少妨碍对这个分子的详细 NMR 研究,但是所累积的数据与预期结构一致。通过与 21-脱乙基-21-环丙基 spinosyn A 的数据比较来辅助这一分析。

[0223] b. 使用 ave 装载模块的杂化 spinosyn PKS

[0224] 阿弗菌素生物合成簇的装载模块 (aveAT0ACP0) 管理 C-2 分支的起始单位导入阿弗菌素分子,其中该分子得自异丁酰-CoA 和 2-甲基丁酰-CoA。存在将这个装载结构域交换入红霉素 PKS 途径得到具有阿弗菌素系统起始单位特异性的新聚酮化合物的先例 (WO 98/01546, WO98/01571, Marsden 等 1998)。也已经表明阿弗菌素装载模块整合了来自制备培养基的广泛游离酸的 CoA-酯,在其天然环境中,或作为 ave/ery 杂化途径的一部分 (Pacey 等 1998)。文献中描述的阿弗菌素装载模块交换实际是阿弗菌素 AT0ACP0 取代红霉素 AT0ACP0。这产生起始密码子和 SpeI 位点之间阿弗菌素 AT0 上游的一段红霉素 DNA 序列。这包括在 ave/ery 实验中,因为 N 末端区域(同源 AT 结构域上游)在红霉素装载模块中比在阿弗菌素中大得多,而且对该蛋白的稳定性可能很重要。因为所得杂化体具有产出性,相同区域用于 ave/spn 杂化体。实际上,所得杂化基因是 ery/ave/spn 杂化体,但是由于它将阿弗菌素装载模块的特异性转移给 spinosyn PKS,因此它记做 ave/spn 杂化体。

[0225] 在 spnKS1 框内和上游, P_{actI} 或 P_{ptr} 控制下,从 pIG1 (WO 98/01546, WO98/01571, Marsden 等 1998) 克隆阿弗菌素装载模块 (AT0ACP0)。KS1 同源区域的起始边缘处的相同拼接位点用作上述的 ery 装载模块实验。合并来自 pRHB3E11 的用于整合的同源区域。所得质粒 pLSB29(杂化 PKS 区域在 P_{actI} 控制之下)和 pLSB30(杂化 PKS 区域在 P_{ptr} 控制之下)基于 pKC1132,因此含有在大肠杆菌和刺糖多孢菌中筛选的安普霉素抗性标记,以及用于从大肠杆菌到刺糖多孢菌的 DNA 接合转移的 $oriT$ (Bierman 等 1992, Matsushima 等 1994)。这些构建体通过接合转化到刺糖多孢菌 NRRL 18538 中。用 PCR 分析证实接合后体在适当启动子下含有杂化 ave/spn PKS 基因。

[0226] 刺糖多孢菌 NRRL 18538 :pLSB29 记做刺糖多孢菌 21K2。它通过将醋酸和丙酸并入装载模块而主要产生 spinosyns E, A 和 D。在 LC-MS 中观察到另外的小峰,质量与新的天然产物 21-脱乙基-21-异丙基 spinosyn A 和 21-脱乙基-21-仲丁基 spinosyn A 和等价 D 类似物一致。这些少量产物是由异丁酸和 2-甲基丁酸分别并入起始单位得到的。在阿弗菌素生物合成本身中,ave 装载模块仅招募这些支链起始单位。然而,当 ave 装载模块拼接至红霉素 PKS 中的 KS1 上游时,观察到较宽的产物谱,表明这种杂化体可合并醋酸和丙酸。因此我们观察到来自这个工程改造的刺糖多孢菌菌株的期望范围的产物。

[0227] NMR 表征证实了分离的 21-脱乙基-21-异丙基 spinosyn A 的结构。21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A 作为少量成分分离自 21-脱乙基-21-异丙基 spinosyn A 的制备培养物。21-正丙基类似物,推测是由装载模块从培养基中整合丁酸而制备的,也被完全

表征。二者在昆虫控制试验中都有效。

[0228] 以前已经将阿弗菌素 PKS 的装载模块的一些天然多能性转移到红霉素系统中,因此给刺糖多孢菌 21K2 补入广泛的游离酸以产生具有改变起始单位的 spinosyns。基于 UV 发色团、质量和质谱馏分,连同补入哪一种酸和由此预期每个实验的哪一种化合物的知识鉴定了新的 spinosyn 化合物。为了证实所作的结构预测,分离具有新 C21 起始基团的很多 spinosyn 类似物并充分描述其特征。

[0229] 可以这样使用的游离酸包括但不限于下列:环状有机酸,包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环己烯基和 2-甲基环丙基;含杂原子的环状有机酸,包括 2-糠酸、3-糠酸、噻吩羧酸和甲基噻吩羧酸;支链羧酸;和一些其它酸,包括甲基硫代乙酸、氯乙酸、氰基乙酸和甲氧基乙酸。

[0230] 这种补料实验产生 spinosyns 类似物 (spinosyn 是表 1 和 2 和通式 I 例举的类型的具有 22 员四环核心的大环内酯),其中 C21 带有非乙基的侧链,通常是 α -分支 C2-C5 烷基, C3-C8 环烷基或环烯基 (任选用如一个或多个羟基, C1-4 烷基或烷氧基或卤原子取代),或 3-6 员的含有 O 或 S 的杂环,饱和或完全或部分不饱和,任选取代 (如取代环烷基)。优选的 C21 取代基候选物是可用作 ery 或 ave 装载模块的底物的羧化物单位的基团。优选的底物包括环丁烷羧酸和环丙烷羧酸。其它可能性包括正丁酸、异丙基羧酸、2-(S)-甲基丁酸、2-甲基环丙烷羧酸、3-糠酸和甲基硫代乙酸。

[0231] 由于 ave 装载模块的正常特异性,补入支链酸异丙基和 2-甲基丙基羧酸不改变新的天然产物的产量。在刺糖多孢菌 21K2 的所有健康培养物中观察到低产量的这些产物。

[0232] ave 装载模块接受环丙基羧酸得到 A 和 D 类似物,和显著比例的 A 类似物的 C17 假糖苷配基。观察到的环丁基产物水平比杂化 ery/spn 系统中的高,其中 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A 为 $\sim 5-10\text{mg/升}$, 21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn D 的水平较低一点,但也是显著的,21-脱乙基-21-环丁基 spinosyn A 17-假糖苷配基为 $\sim 10-15\text{mg/升}$ 。环丙基羧酸补料也是成功的,产生 21-脱乙基-21-环丙基 spinosyns A 和 D。这两个环丁基类似物和环丙基 A 类似物显示出与从 ery 装载模块实验分离的纯化化合物等同。

[0233] 并入甲基硫代羧酸得到 21-脱乙基-21-甲基硫代甲基 spinosyn A,产量可以与上面环丁基实验相当。相对于用 ery 装载模块实验生产相同化合物而言,这在产量方面是一个显著的改进。也并入 2-糠酸和甲基环丙基羧酸得到预期的新产物。

[0234] 实施例 11 阿弗菌素聚酮合酶的装载模块并入 spinosyn 聚酮合酶的载体的构建

[0235] 见图 5。阿弗菌素聚酮合酶的装载模块并入 spinosyn 聚酮合酶的载体含有阿弗菌素装载模块 (AT0ACP0),后面是 spinosyn PKS 的第一模块区域以提供整合的同源性。该载体记做 pLSB29 并构建如下:

[0236] 以前阿弗菌素装载模块已经被拼接至红霉素模块 1 的上游 (W098/01546, W098/01571, Marsden 等 1998)。在这个 ave/ery 杂化体中,装载模块在开始处具有编码 ery 氨基酸序列的 DNA,后面是 ave PKS 的 AT0ACP0。这个杂化片段提供了阿弗菌素装载模块的特异性,尽管它包括少量 ery 序列。相同片段用于这个实验,并产生 ery/ave/spn 杂化蛋白。我们仅仅将它描述为 ave/spn 杂化体,因为在 spinosyn 途径中提供的是阿弗菌素装载模块的特异性。该片段以含有起始密码子的 NdeI 位点开始,并以 KS1 开始处的 NheI 位点结束。这将会使保守氨基酸改变 (Ile-Leu) 导入 spinosyn KS1 序列。

[0237] 为了导入 NheI 位点,使用 pRHB3E11(US 6,274,350B1, Waldron 等 2001) 作为模板,以及寡核苷酸 SP14(SEQ ID NO:9) 和 SP15(SEQ ID NO:10) 通过 PCR 扩增来自 KS1 起始处的 SpnA 区域。SP14 在碱基 24107-24112(编号参照 US 6,274,350 的 SEQ ID NO:1) 处引入 NheI 位点。SP15 结合下游大约 1500bp 的 BstEII 位点 (25646-25652)。NotI 位点也并入 SP15 用于随后克隆步骤。使用 Pwo 耐热聚合酶在标准条件下实施 PCR。

[0238] PCR 产物被磷酸化,凝胶纯化并克隆进入先用 SmaI 消化和去磷酸化的 pUC19。对很多含插入物的克隆测序。在载体中以 NheI 位点邻接 EcoRI 位点的方式含有插入物的一个克隆记做 pLSB5。

[0239] 为了提供大量足够用于整合的同源性区域,从 pRHB3E11 克隆大约 2.6kbp 的片段(从 BstEII 至 NotI) 进入 pLSB5,产生 pLSB8。

[0240] 接着从 pIG1(WO 98/01546, WO 98/01571, Marsden 等 1998) 克隆阿弗菌素装载模块作为 NdeI/NheI 片段并连接到先用 NdeI 和 NheI 消化的 pLSB8。使用的阿弗菌素装载模块片段的 DNA 序列,从 NdeI 位点至 NheI 位点,示于 SEQ ID NO 11。所得质粒记做 pLSB14。

[0241] pLSB14 中所含片段含有与 spinosyn KS 1 按读码框拼接的阿弗菌素装载模块,还具有足以用于发生整合的与 spnA 同源的区域。

[0242] 接着移出这个片段作为 NdeI/XbaI 片段并克隆进入 pLSB2 得到 pLSB29。这将新的 ave/spn 杂化片段在载体中置于 PactI 之下,该载体可通过接合转移进入刺糖多孢菌并接着使用安普霉素抗性标记进行选择。

[0243] 实施例 12 含杂化聚酮合酶的刺糖多孢菌菌株的产生,该合酶包含与 spinosyn PKS 的 KS1 融合的阿弗菌素装载模块

[0244] 见图 6。通过大肠杆菌 S17-1(Simon 等,1983) 的接合(Matsushima 等,1994) 用 pLSB29 转化刺糖多孢菌 NRRL18538。用安普霉素抗性选择转化体并用 Southern 印迹分析来筛选。显示正确杂交模式的单一转化体表明该质粒已通过同源重组整合进入染色体,并记做刺糖多孢菌菌株 21K2。

[0245] 实施例 13 通过刺糖多孢菌 21K2 发酵制备代谢产物(化合物 9-12 的生产)

[0246] 冰冻营养原液培养的刺糖多孢菌 21K2 用于接种 CMS 培养基(Hosted 和 Baltz 1996;US 5,362,634)。这个预培养物生长在以 300rpm,一英寸来回振荡的瓶中,温度 30℃ 进行 3 天。这用于以 5% v/v 接种营养培养基(Strobel 和 Nakatsukasa 1993;美国专利 5,362,634) 并在相同条件下培养另外 2 天。该营养培养基(Strobel 和 Nakatsukasa 1993) 用于以 5% v/v 接种制备培养基。小规模制备培养物在与预培养物相同的条件下发酵,但是进行 7-10 天,以 250rpm,两英寸来回振荡和以 75% 相对湿度。最初小规模制备培养物在 6mL 制备培养基中在 25mL 带有弹簧的 Erlenmeyer 瓶中生长 7 天。

[0247] 为了鉴定产生的代谢产物,如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。通过与可信标准,以及与来自菌株刺糖多孢菌 NRRL 18538 的发酵提取物比较,由刺糖多孢菌 21K2 产生的主要化合物是 spinosyns A, D 和 E。spinosyn A 是产生的主要成分,且 spinosyn 总产量是 ~ 50mg/L。

[0248] 除了已知的 spinosyns A, D 和 E,清晰存在四个新的化合物。这些新化合物的层析截留时间和质谱数据(表 8) 与它们通过整合支链起始单位(异丙基羧酸和 2-甲基丁酸)的合成一致。新化合物的 MS 谱给出了 $[M+H]^+$ 种和福洛氨糖片段的离子(142.3)。补入异

丙基羧酸得到的化合物以比补入 2- 甲基丁酸得到的那些高 2-3 倍的水平存在。新化合物占存在的总 spinosyns 的至多 5%。

[0249] 表 8

[0250]

羧酸起始单位	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
异丙基羧酸	9	25.1	746.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
异丙基羧酸	10	26.3	760.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
2- 甲基丁酸	11	26.7	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.3
2- 甲基丁酸	12	27.5	774.5 [M+H] ⁺ ; 142.3

[0251] 实施例 14 前体指导的由刺糖多孢菌 21K2 产生的新 spinosyns (化合物 1-6 和 13-20 的产生)

[0252] 通过向制备培养基中补入羧酸, ave/spn 杂化 PKS 用于产生新的 spinosyn 代谢产物。阿弗菌素装载模块将羧酸整合入该分子的起始物中。

[0253] 如实施例 13 所述接种平行 6ml 制备瓶。24 小时后, 这些中的每一个补入羧酸 (溶于水的原液并用氢氧化钠调节 pH 至 6.5), 终浓度 3mM。7 天后, 如实施例 6 和 12 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分的发酵肉汤培养基。环丁基羧酸、环丙基羧酸、2- 甲基环丙基羧酸、甲基硫代乙酸和 3- 糠酸的并入提供了新的 C21 修饰的 spinosyns, 如 UV 和 MS 层析中新峰的出现所表明 (表 9)。新化合物的质谱给出了 [M+H]⁺ 种和福洛氨糖片段的离子 (142.3)。此外, 补入环丁基和环丙基羧酸也引起相应 17- 假糖苷配基的蓄积。

[0254] 表 9

[0255]

补入的羧酸	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
环丁基 CA	2	25.7	758.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
环丁基 CA	3	27.2	772.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
环丙基 CA	1	23.5	744.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
环丙基 CA	2	25.1	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
2- 甲基环丙基 CA	13	25.7	758.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
2- 甲基环丙基 CA	14	26.9	772.5 [M+H] ⁺ ; 142.4

补入的羧酸	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
甲基硫代醋酸	5	22.9	764.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
甲基硫代醋酸	6	24.4	778.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
3- 糠酸	15	22.9	770.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
3- 糠酸	16	24.3	784.5 [M+H] ⁺ ; 142.4
环丁基 CA	19	27.1	639.4 [M+Na] ⁺
环丁基 CA	20	28.6	653.4 [M+Na] ⁺

[0256] 与从 ery 装载模块菌株即刺糖多孢菌 13E 分离的的化合物相比,证实了 21- 环丁基化合物和环丙基化合物是正确的结构。

[0257] 实施例 15 从刺糖多孢菌 21K2 大规模发酵中分离新的代谢产物

[0258] 将刺糖多孢菌 21K2 的冰冻营养原液接种到 CSM(50ml, 在带弹簧的 250mL Erlenmeyer 瓶) 中的刺糖多孢菌 21K2 初级营养预培养物中。如实施例 6 所述制备和孵育在营养培养基 (250ml, 在带弹簧的 2LErlenmeyer 瓶) 中的次级预培养物。

[0259] 如实施例 6, 制备十四升制备培养基, 添加 0.01% v/v PluronicL-0101 (BASF) 防泡剂。用次级预培养物以 5% v/v 接种制备培养基, 并允许在 20L 搅拌的生物反应器中在实施例 8 所述条件下发酵 7-10 天。在 26 和 37.5 小时, 2- 甲基丁酸补入生物反应器至终浓度 2mM, 产生总的终浓度 4mM。7 天后收集发酵肉汤培养基并如实施例 8 所述提取。

[0260] 含油残留物溶于甲醇 (1.5ml) 并如实施例 8 所述进行初次层析。混合含有 21- 脱乙基 -21- 异丙基 spinosyn A 的最初分离物的馏分并真空除去溶剂。残留物通过反相硅胶 (Prodigy C₁₈, 5 μm; 10×250mm) 进行层析, 以 5ml/ 分的流速用如下述梯度洗脱。

[0261] T = 0, 55% B; T = 5, 70% B; T = 35, 95% B; T = 45, 95% B。

[0262] 每隔 30 秒收集馏分。混合含 21- 脱乙基 -21- 异丙基 spinosyn A 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。

[0263] 干燥的样品溶于甲醇 (0.5ml) 并通过反向碱失活硅胶 (hypersil-C18-BDS; 4.6×250mm; 5 μm) 进行层析。以 1ml/ 分的流速, 用醋酸铵 (10mM) - 甲醇 - 四氢呋喃 (40 : 45 : 15) 等梯度洗脱柱, UV 检测 (244nm) 后收集三个主要成分。在这些条件下, 截留时间如下: spinosyn-D : 64.4 分钟, 21- 脱乙基 -21- 异丙基 spinosyn A : 67.8 分钟和 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A : 75.3 分钟。真空干燥每个样品得到白色固体, 通过其 NMR 和质谱来鉴定它。

[0264] 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A (化合物 23) 具有下列特征:

[0265] 分子量 : 745

[0266] 分子式 : C₄₂H₆₇NO₁₀

[0267] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测):244nm

[0268] 电喷 MS:[M+H]⁺ 的 $m/z = 746.5$;福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 $m/z = 142.2$ 。

[0269] 表 10 总结了 21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A 在 $CDCl_3$ 中的 1H 和 ^{13}C NMR 化学迁移数据。

[0270] 表 10

[0271]

位置	1H	^{13}C	位置	1H	^{13}C
1	—	172.5	20a	1.56	30.7
2a	3.13	34.1	20b	1.50	—
2b	2.42	—	21	4.77	75.3
3	3.03	47.5	22a	1.50	37.8
4	3.50	41.5	22b	1.39	—
5	5.81	128.8	23	1.28	18.3
6	5.89	129.3	24	0.99	14.0
7	2.19	41.1	1'	4.88	95.4
8a	1.94	36.2	2'	3.51	77.7
8b	1.35	—	3'	3.49	81.0
9	4.32	76.0	4'	3.13	82.2
10a	2.29	37.3	5'	3.56	67.9
10b	1.35	—	6'	1.30	19.0
11	0.92	45.9	2'-OMe	3.51	59.0
12	2.88	49.4	3'-OMe	3.51	57.7
13	6.78	144.1	4'-OMe	3.57	60.9

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
14	—	147.5	1''	4.43	103.5
15	—	202.9	2'' a	1.99	30.9
16	3.30	47.6	2'' b	1.49	—
16-Me	1.20	16.2	3'' a	1.38	18.5
17	3.65	80.6	3'' b	1.50	—
18	1.55	34.3	4''	2.25	64.8
18b	1.55	—	5''	3.49	73.5
19a	1.78	21.6	6''	1.28	17.8
19b	1.21	—	4'' -NMe ₂	2.26	40.6

[0272] 化学迁移参照 CHCl₃ 在 7.26ppm 的质子。

[0273] 21-脱乙酰基-21-异丙基 spinosyn A (化合物 9) 具有下列特征：

[0274] 分子量：745

[0275] 分子式：C₄₂H₆₇NO₁₀

[0276] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测)：244nm

[0277] 电喷 MS：[M+H]⁺ 的 m/z = 746.5；福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.2。

[0278] 表 11 总结了 21-脱乙酰基-21-异丙基 spinosyn A 在 CDCl₃ 中的 ¹H 和 ¹³C NMR 化学迁移数据。

[0279] 表 11

[0280]

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	—	173	20a	1.52	27
2a	3.15	34	20b	1.52	—
2b	2.43	—	21	4.66	80
3	3.03	48	22	1.80	33

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
4	3.55	42	23	0.85	18
5	5.82	129	22-Me	0.83	18
6	5.90	129			
7	2.19	42	1'	4.87	96
8a	1.94	36	2'	3.51	78
8b	1.35	—	3'	3.47	81
9	4.32	76	4'	3.13	82
10a	2.28	37	5'	3.56	68
10b	1.38		6'	1.30	19
11	0.93	46	2'-OMe	3.51	59
12	2.90	50	3'-OMe	3.51	58
13	6.78	144	4'-OMe	3.58	61
14	—	147	1''	4.43	104
15	—	204	2''a	1.99	31
16	3.28	48	2''b	1.49	—
16-Me	1.19	16	3''a	1.38	19
17	3.63	81	3''b	1.50	—
18	1.52	35	4''	2.25	65
18b	1.52	—	5''	3.49	74
19a	1.80	22	6''	1.28	18

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
19b	1.19	-	4''-NMe ₂	2.26	41

[0281] 化学迁移参照 CHCl₃ 在 7.26ppm 的质子;来自 2D 实验的 ¹³C 数据。

[0282] 混合含推定的 21-脱甲基-21-仲丁基 spinosyn A 的最初馏分,真空除去乙腈,并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩。在重力下施加该样品,用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱,接着真空除去溶剂。

[0283] 推定的 21-脱甲基-21-仲丁基 spinosyn A (化合物 11) 具有下列特征:

[0284] 分子量:759

[0285] 分子式:C₄₃H₆₉NO₁₀

[0286] UV (HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测):244nm

[0287] 电喷 MS:[M+H]⁺ 的 m/z = 760.5;福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.2。

[0288] 肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 还原酶的共表达

[0289] 在另一个方面,本发明提供了工程改造的刺糖多孢菌宿主,它提供改变的底物供应,使得天然聚酮合酶产生新产物。例如,肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 还原酶与 spinosyn 生物合成途径共表达产生新产物,其中装载模块另外合并乙基丙二酰-CoA 产生 21-脱乙基-21-正丙基 spinosynsA 和 D,模块 8 的 AT 另外合并乙基丙二酰-CoA 产生 6-乙基 spinosyn A。此外,这两个 AT 结构域都可接受乙基丙二酰-CoA 产生 6-乙基-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn。

[0290] spinosyn 装载模块包含 KSqAT0ACP0,它主要使甲基丙二酰-CoA 脱羧基以合并丙酸。含 KSq 的装载模块通常比缺乏它们的模块更特异。因此 spinosyn 装载模块偶尔接受丙二酰-CoA (天然产生少量 spinosyn E) 有趣且罕见,且如这里公开,当存在乙基丙二酰-CoA 时,出人意料地接受它。

[0291] 支持这个观念的证据,见实施例 18 和就在实施例 22 之前的讨论部分。

[0292] 具有异源延伸模块的杂化 spinosyn PKS

[0293] 本发明的另一个方面提供了包含异源延伸模块或具有异源 AT 结构域 spinosyn 延伸模块的杂化 spinosyn PKS。

[0294] AT 结构域选择被并入正在生长的聚酮化合物链的延伸单位。在 spinosyn 生物合成中,延伸物主要是丙二酰-CoA。然而,模块 3 中的 AT 主要是甲基丙二酰-CoA 特异的。它偶尔合并丙二酰-CoA,导致作为天然少量成分的 spinosyn F 的蓄积。模块 8 中的 AT 显示不严紧的特异性,主要合并丙二酰-CoA (得到 spinosyn A),但也合并显著量的甲基丙二酰-CoA (得到大约 15% 的 spinosyn D)。在与甲基丙二酰-CoA 的选择相关的区域中,模块 8AT 的氨基酸序列类似于其它 AT 结构域。因此我们提出在这个位置主要合并丙二酰-CoA 是底物供应的反映,也是具有罕见不严紧特异性的 AT 结构域的反映。装载模块的 AT 对甲基丙二酰-CoA 具有高度选择性,但是 5-10% 的时间合并丙二酰-CoA (导致天然少量成分 spinosyn E 的产生)。

[0295] 用不同丙二酰-CoA 选择性的异源 AT 结构域取代现存 AT 结构域产生将添加、除去

或取代 spinosyn 聚酮化合物上的侧链的 PKS。当异源 AT 结构域可合并细胞内不容易得到的延伸物分子时,可以包括附属基因以提供共同底物(Stassi 等,1998)。例如,刺糖多孢菌基因组中没有明显编码巴豆酰-CoA 还原酶的基因(C. Waldron,未发表的观察结果),因此预期乙基丙二酰-CoA 的供应在这个生物中是严格受限的。

[0296] 构建一个系统以允许在 spinosyn 聚酮合酶的模块 3 内实施 AT 交换。模块 3 的 AT 天然合并甲基丙二酰-CoA 并将 16-甲基分支导入 spinosyn。影响 AT 交换的一个方法是通过取代,它将产生具有与天然 PKS 相同转录物的菌株。可供选择的方法是通过单一整合,它将完整质粒序列置于 spinosyn PKS 基因中并需要导入的启动子驱动整合位点下游的基因。

[0297] 下列实施例(实施例 16-19)描述了涉及使用酶 MscI 亚克隆片段的 AT 结构域交换实验。由于环绕该位点的序列,dcm 甲基化影响 MscI。需要用 MscI 消化的质粒因此通过大肠杆菌 ET12567 即 dcm⁻菌株传递而产生未被 dcm 甲基化的 DNA。

[0298] A. 使用雷帕霉素 PKS 的模块 2AT 代替 spinosyn 模块 3AT 的杂化 spinosyn PKS

[0299] 使用单一整合方法,产生了 spinosyn PKS,其中模块 3AT(甲基丙二酰-CoA 特异性的)被雷帕霉素模块 2AT(丙二酰-CoA 特异性的)取代。所得菌株记做刺糖多孢菌 7D23。7D23 的 PKS 基因含有在天然 spnA 启动子控制下的 spnA, spnB 和截短的 spnC,其后为质粒序列(包括安普霉素抗性标记)以及在引入的启动子控制下的杂化 spnC 和 spnD 和 spnE。在 7D23 中,使用的异源启动子是普那霉素抗性的启动子。也可以使用其它启动子,例如具有相关活化剂 actII-ORF4 的启动子 actI。

[0300] 刺糖多孢菌 7D23 产生了四个预测的 spinosyn 类似物:spinosyn F, spinosyn F 17-假糖苷配基,16-脱甲基 spinosyn D 和 16-脱甲基 spinosyn D 17-假糖苷配基。产量意外的高,仅比未工程改造的菌株低 3 倍(见实施例 20 内的表 12)。以前已经鉴定了 spinosyn F 化合物是未工程改造的菌株中的少量成分,但 PKS 基因的这个操作导致它们的产量急剧增加。

[0301] 假糖苷配基 F 的富足可能是福洛氨糖(forosamine)糖基转移酶对这个新底物的活性降低的反映。最终的糖基化发生在 C17,因此相邻的 C16 甲基可能对底物识别很重要。

[0302] 实施例 16 含具有侧翼限制性位点的 spinosyn 模块 3AT 的载体的构建

[0303] 见图 7a 和 7b。使用 pRHB3E11 作为模板以及引物 CR322(SEQ ID NO:12)和 CR323(SEQ ID NO:13)通过 PCR 扩增 spinosyn 模块 3AT 结构域。这些引物导入侧接 AT 结构域的 MscI 和 AvrII 位点(SEQ ID NOS:12 和 13 的 bp 3-8)。973bp PCR 产物被磷酸化并克隆进入先用 SmaI 消化和脱磷酸化的商业上可获得的 pUC18。筛选含正确方向插入物的转化体并进行测序。以 AvrII 位点邻近于多接头 HindIII 位点的方向含有正确序列插入物的一个转化体记做 pALK6。

[0304] 使用 pRHB3E11 作为模板以及引物 CR324(SEQ ID NO:14)和 CR332(SEQ ID NO:15)通过 PCR 扩增 Spinosyn 模块 3AT 下游的侧翼区域。在完全与 CR323 相同的位置,引物 CR324 导入 AvrII 位点(SEQ ID NO:14 的 bp 3-8),CR332 结合序列中天然存在的 PstI 位点下游。1557bpPCR 产物被磷酸化并克隆进入先用 SmaI 消化和脱磷酸化的商业上可获得的 pUC18。筛选含正确方向插入物的转化体并进行测序。以 AvrII 位点邻接多接头 HindIII 位点的方向含有正确序列插入物的一个转化体记做 pALK9。用 AvrII 和 PstI 消化 pALK9。对 1525bp 片段进行凝胶纯化并克隆入用 AvrII 和 PstI 消化的 pALK6,得到质粒 pALK11。

[0305] 构建 pALK12 来提供这个实验的合适多接头。用 NdeI 和 PstI 消化 pALK6 并与寡核苷酸 CR328(SEQ ID NO:16) 和 CR329(SEQ ID NO:17) 的退火接头连接。设计该接头是为了破坏 NdeI 位点和留下 XbaI, EcoRV 和 PstI 位点。用限制性酶消化分析含插入物的克隆,显示正确模式的单一克隆记做 pALK12。

[0306] 使用 pRHB3E11 作为模板以及引物 CR330(SEQ ID NO:18) 和 CR321(SEQ ID NO:19) 通过 PCR 扩增 spinosyn 模块 3AT 下游的侧翼区域。在 spnC 基因的 ATG 起始密码子处,引物 CR330 导入 NdeI 位点(SEQ ID NO:18 的 bp 18-23),在与 CR322 相同位置处,CR321 合并 MscI 位点(SEQ ID NO:19 的 bp 3-8)。1729bp PCR 产物被磷酸化并克隆进入先用 SmaI 消化和脱磷酸化的商业上可获得的 pUC18。筛选含正确方向插入物的转化体并进行测序。以 MscI 位点邻接多接头 HindIII 位点方向含有正确序列插入物的一个转化体记做 pALK23。用 PstI 和 XmnI 消化 pALK12,601bp 克隆进入 PstI/XmnI 消化的 pALK23 得到 pALK24。用 PstI 和 MscI 消化 pALK11,2488bp 片段连接入由 PstI 和 MscI 消化 pALK24 产生的 3777bp 主链得到 pALK25。为了确保进行整合的充分同源性,从 pRHB3E11 切除从 PstI 位点(美国专利 6,274,350B1 的 SEQ ID NO:1 的 bp 39607-39612)至 MscI 位点的 DNA 片段并克隆进入先用 PstI 和 EcoRV 消化的 pALK25 得到 pALK26。

[0307] 在实验中,pALK26 是产生在模块 3 具有 AT 交换的 spinosyn PKS 基因的中间质粒。它含有具有侧翼限制性位点的 spinosyn AT3, spnC 上游区域至起始密码子,和进行同源重组的区域下游。就在 AT 边缘 MscI 位点上游,它缺乏 407bp MscI-MscI 片段,该片段需要在完成 AT 交换后插入。

[0308] 实施例 17 可用于工程改造 spinosyn 生物合成途径而产生 C16 脱甲基 spinosyns 的载体的构建

[0309] 见图 8。质粒 pALK39 用于通过同源重组整合到刺糖多孢菌的染色体中。它被设计成能将雷帕霉素 AT2 并入 spinosyn 模块 3。这种工程改造的刺糖多孢菌菌株产生了 C-16 脱甲基 spinosyns 以及这个途径中的中间体。如下所述构建质粒 pALK39。

[0310] 从 pCJR26 切除雷帕霉素模块 2 作为 MscI/AvrII 片段(见 SEQ ID NO 20)并连接到先用 MscI 和 AvrII 消化的 pALK26,得到 pALK28。从 pALK24(实施例 16)切除这个构建体中缺乏的 407bp MscI 片段并连接入脱磷酸化、MscI 消化的 pALK28。筛选含有正确插入方向的克隆,在正确方向含插入物的单一克隆记做 pALK32。pALK32 含有 rap AT2 交换进入刺糖多孢菌模块 3 所需的片段,并在起始密码子处有 NdeI 位点和就在聚酮合酶序列外部有下游 XbaI 位点。这个区域切除作为 NdeI/XbaI 片段并克隆进入 pLSB3 得到 pALK39。因此新的模块 3 杂化片段在载体中置于 P_{ptr} 之下,该载体可通过接合转移给刺糖多孢菌并使用安普霉素抗性进行选择。

[0311] 实施例 18 能够过度表达丙二酰-CoA 还原酶的载体的构建

[0312] 见图 9。为了解决底物供应问题,构建过度表达来自肉桂链霉菌的丙二酰-CoA 还原酶(ccr)基因的 pALK21。pALK21 构建如下。

[0313] 使用引物 CCRMONF(SEQ ID NO:21) 和 CCRMONR(SEQ ID NO:22),通过 PCR 从肉桂链霉菌 ATCC 15413 分离的基因组 DNA 扩增肉桂链霉菌 ccr 基因。CCRMONF 引入了含有该基因起始密码子 ATG 的 NdeI 位点(SEQ ID NO:21 的 bp 7-12),CCRMONR 导入了终止密码子下游的 BamHI 位点(SEQ ID NO:22 的 bp 6-11)。在标准条件下使用 Pwo 耐热 DNA 聚合酶实施

扩增以获得 ccr 基因。用 T4 多核苷酸激酶磷酸化该片段,接着克隆进入用 SmaI 消化和脱磷酸的商业上可获得的 pUC18。对含插入物的质粒测序,含正确序列的一个质粒记做 pLSB46。质粒 pLSB46 以导入的 BamHI 位点邻接多接头 XbaI 位点的方向含有肉桂链霉菌 ccr 基因。SEQ ID NO 23 显示从起始密码子处的 NdeI 位点至终止密码子之后的 BamHI 位点的 ccr 基因。

[0314] 切除 ccr 基因作为 NdeI/XbaI 片段并克隆进入用 NdeI 和 XbaI 消化的表达载体 pLSB2(实施例 2),得到 pLSB59。质粒 pLSB59 含有 actI 启动子控制下的 ccr 基因,和活化剂 actII-ORF4。为了使 ccr 基因与工程改造的杂化 PKS 共表达,含 ccr 的片段连同 actII-ORF4 活化剂和 actI 启动子被转移到具有杂化 PKS 基因可利用的限制性位点的含第二个启动子(Pptr)的载体中。如下述完成此。

[0315] 用 NdeI 消化 pLSB59,使用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段补平末端。重新环化这个平末端片段得到 pALK19。从 pALK19 切除该基因和启动子作为 SpeI/XbaI 片段并克隆进入 SpeI 消化的 pLSB3(实施例 2)。这个步骤破坏了 ccr 基因末端处的 XbaI 位点。所得质粒记做 pALK21。质粒 pALK21 因此含有 P_{actI} 下的 ccr 基因,具有用于将杂化 PKS 基因导入 ptr 启动子下游的独特 NdeI 和 XbaI 位点。pALK21 是安普霉素抗性的并且含有用于接合转移 DNA 的 oriT。

[0316] 实施例 19 含有杂化聚酮合酶的刺糖多孢菌菌株的产生,该合酶含有雷帕霉素模块 2AT 取代 spinosyn 模块 3AT

[0317] 见图 11。通过大肠杆菌 S17-1(Simon 等,1983)的接合(Matsushima 等 1994)用 pALK39 转化刺糖多孢菌 NRRL 18538。选择转化体的抗安普霉素的抗性。Southern 印迹分析筛选大量转化体。显示正确杂交模式而表明该质粒已经通过同源重组整合到染色体的单一转化体记做刺糖多孢菌菌株 7D23。

[0318] 实施例 20-21 阐述了刺糖多孢菌 7D23 制备新的 spinosyns 的用途。

[0319] 实施例 20 16-脱甲基 spinosyns 的制备和分离 (spinosyn F, spinosyn F 假糖苷配基,和化合物 21 和 22 的制备)

[0320] 以前已经鉴定 16-脱甲基 spinosynA 是由大量刺糖多孢菌菌株制备的 spinosyns 家族的一员,并记做 spinosyn F(US 6, 274, 350B1)。这里我们示范了从刺糖多孢菌 7D23 的工程改造杂化途径制备 spinosynF 和 16-脱甲基 spinosyn D(化合物 21)。

[0321] 刺糖多孢菌 7D23 用于接种 CSM 培养基(Hosted 和 Baltz 1996;美国专利 5, 362, 634)。这个预培养物在带有 30cm 弹簧以辅助换气的 250ml 瓶中,两英寸 250rpm 来回振荡,30℃,75%相对湿度下生长 3 天。接着用于以 5% v/v 接种营养培养基,置于含 3×30ml 培养物的 250ml 瓶(Strobel 和 Nakatsukasa 1993;US Pat. No. 5, 362, 634)中,在相同条件下培养另外 2 天。营养培养物用于以 5% v/v 接种制备培养基,如上所述条件在含 3×30ml 培养物的 250ml 瓶中生长。刺糖多孢菌 7D23 的制备培养基生长 10 天。

[0322] 对于代谢产物的鉴定,如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。通过与可信标准相比,很明显存在 spinosyn F、16-脱甲基 spinosyn D,以及它们相应的糖苷配基(表 12)。

[0323] 表 12

[0324]

化合物	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)	产量 (mg/l)
SpinosynF	21.1	718.5 [M+H] ⁺ ; 142.4	102
16-脱甲基 spinosynD(化合物 21)	23.4	732.5 [M+H] ⁺ ; 142.3	38
spinosynF17-假糖苷配基	23.1	599.3 [M+Na] ⁺	125
16-脱甲基 spinosynD17-假糖苷配基(化合物 22)	24.6	613.3 [M+Na] ⁺	42

[0325] 离心澄清剩余的发酵肉汤培养基。用等体积甲醇提取细胞两次。用 5N NaOH 调节上清 (780ml) 至 pH ~ 10 并用乙基醋酸酯 (3×500ml) 提取两次。混合甲醇和乙基醋酸酯提取物并真空除去溶剂得到含油残留物。残留物溶于乙基醋酸酯 (250ml) 中并用 50mM 酒石酸 (3×200ml) 提取。用 5N NaOH 调节混合的酒石酸提取物至 pH ~ 10, 并用乙基醋酸酯 (3×300ml) 提取。混合提取物并真空除去溶剂, 得到棕色油 (200mg)。油溶于甲醇 (1mL), 其中一半如实施例 8 所述进行初次层析。

[0326] 混合含有 16-脱甲基 spinosyn D 和 spinosyn F 的来自初次分离物的主要馏分并真空除去溶剂。残留物通过相同柱层析, 以 21ml/ 分的流速用如下述梯度洗脱。

[0327] T = 0 分钟, 35% B; T = 35, 55% B; T = 45, 55% B。

[0328] 每隔 30 秒收集馏分。分别混合含 16-脱甲基 spinosyn D 或 spinosynF 的馏分。每个混合组的馏分接着运行如下: 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。

[0329] 16-脱甲基 spinosyn D(化合物 21) 具有下列特征:

[0330] 分离产量: 4.8mg

[0331] 分子量: 731

[0332] 分子式: C₄₁H₆₅NO₁₀

[0333] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测): 244nm

[0334] 电喷 MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 732.5; 福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.4。

[0335] 准确 FT-ICR-MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 732.4689 (需要: 732.4681)。

[0336] 表 13 总结了 16-脱甲基 spinosyn D 在 CDCl₃ 中的 ¹H 和 ¹³C NMR 化学迁移数据。

[0337] 表 13

[0338]

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	—	172.3	19b	1.67	21.5
2a	2.39	33.9	20a	1.51	29.7
2b	3.09	—	20b	1.51	—
3	2.97	47.7	21	4.65	76.9
4	3.37	42.1	22a	1.49	28.2
5	5.49	122.0	22b	1.49	—
6	—	136.3	23	0.82	9.3
6-Me	1.73	20.7	1'	4.85	95.5
7	2.19	44.5	2'	3.52	77.6
8a	1.41	34.8	3'	3.46	81.1
8b	1.93	—	4'	3.12	82.3
9	4.29	75.7	5'	3.54	67.9
10a	1.35	37.7	6'	1.28	17.8
10b	2.26	—	2' -OMe	3.51	59.1
11	1.01	45.6	3' -OMe	3.50	57.7
12	2.76	49.0	4' -OMe	3.56	61.0
13	6.75	148.7	1''	4.60	98.9
14	—	145.1	2'' a	1.67	30.0
15	—	198.0	2'' b	1.99	—
16a	2.47	45.1	3'' a	1.70	20.5

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
16b	3.17	—	3''b	2.16	—
17	4.05	74.4	4''	3.10	64.6
18a	1.56	33.7	5''	3.73	70.7
18b	1.56	—	6''	1.47	18.6
19a	1.17	21.5	4''-NMe ₂	未观察到*	未观察到*

[0339] 化学迁移参照 7.26ppm 的质子。

[0340] * 由于微量酸引起胺基质子化而未观察到。

[0341] spinosyn F 具有下列特征：

[0342] 分离产量：5.5mg

[0343] 分子量：717

[0344] 分子式：C₄₀H₆₃N₁₀O₁₀

[0345] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测)：244nm

[0346] 电喷 MS：MH⁺ 的 m/z = 718.5；福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.4。

[0347] 准确 FT-ICR-MS：[MH]⁺ 的 m/z = 718.4534 (需要：718.4525)。

[0348] 这个化合物累积的 NMR 数据与其建议的特性和公开的数据 (美国专利 5,362,634) 一致。

[0349] 实施例 21 16-脱甲基 spinosyn A 17-假糖苷配基 (化合物 22) 的制备和分离

[0350] 以前鉴定了 16-脱甲基 spinosyn A 17-假糖苷配基并已知是 spinosyn F 17-假糖苷配基。发现它是由刺糖多孢菌菌株制备的 spinosyns 家族的少数成员 (美国专利 6,274,350B1)。下述是从刺糖多孢菌 7D23 的工程改造杂化途径制备 spinosyn F 17-假糖苷配基和 16-脱甲基 spinosyn D 17-假糖苷配基的方法。

[0351] 将刺糖多孢菌 7D23 的冰冻营养原液用于在 CSM 培养基中接种初级营养预培养物 (50ml, 在带有弹簧的 250ml Erlenmeyer 瓶中培养)。如实施例 8 所述制备和孵育营养培养基 (250ml, 在带弹簧的 2L Erlenmeyer 瓶中培养) 中的次级预培养物。

[0352] 如实施例 6, 制备四升制备培养基, 添加 0.01% v/v Pluronic L-0101 (BASF) 发泡剂。用次级营养预培养物以 5% v/v 接种制备培养基, 并允许在 7L 搅拌的生物反应器中 30°C 发酵 7-10 天。气流设置在 0.75vvm, 为了保持溶解氧压力处于或高于 30% 空气饱和度, 叶轮尖速度控制在 0.68 和 1.1ms⁻¹ 之间。

[0353] 对于代谢产物的鉴定, 如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。通过与可信标准比较, 明显存在 spinosyn F, 16-脱甲基 spinosyn D 以及它们相应的假糖苷配基 (表 14)。

[0354] 表 14

[0355]

化合物	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
SpinosynF	21.4	718.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
16-脱甲基 spinosynD (化合物 21)	23.6	732.5 [M+H] ⁺ ; 142.3
SpinosynF17-假糖苷配基	23.2	599.3 [M+Na] ⁺
16-脱甲基 spinosynD17-假糖苷配基 (化合物 22)	24.3	613.3 [M+Na] ⁺

[0356] 离心澄清剩余的发酵肉汤培养基。用等体积甲醇提取细胞两次。用乙基醋酸酯 (2×1.5L) 提取上清 (3.2L)。混合甲醇和乙基醋酸酯提取物并真空除去溶剂。残留油溶于乙基醋酸酯 (1L) 中并用 50mM 酒石酸 (3×500ml) 洗涤。真空蒸发剩余乙基醋酸酯溶液。所得油通过快速硅胶 (6×13cm) 进行层析, 用含 5% 甲醇的氯仿洗脱。收集 10ml 体积的馏分。混合含假糖苷配基的馏分并真空除去溶剂得到棕色油。棕色油溶于甲醇 (1.5ml) 并如实施例 8 所述在碱失活的反相硅胶上进行层析。每隔 30 秒收集馏分。混合含相关产物的那些馏分, 并真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10mL) 洗涤并用甲醇 (2×10mL) 洗脱, 接着真空除去溶剂。

[0357] 16-脱甲基 spinosyn D 17-假糖苷配基 (化合物 22) 具有下列特征:

[0358] 分离产量: 3.3mg

[0359] 分子量: 590

[0360] 分子式: C₃₃H₅₀O₉

[0361] UV (HPLC-MS 分析过程中通过二极管阵列检测): 240nm

[0362] 电喷 MS: [M+Na]⁺ 的 m/z = 613.3。

[0363] 准确 FT-ICR-MS: [M+H]⁺ 的 m/z = 591.3517 (需要: 591.3528)。

[0364] 表 15 总结了 16-脱甲基 spinosyn D 17-假糖苷配基在 CDCl₃ 中的 ¹H 和 ¹³C NMR 质谱数据。

[0365] 表 15

[0366]

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
1	—	172.5	17	4.18	68.2
2a	2.40	34.0	18a	1.58	35.7
2b	3.13	—	18b	1.58	—

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
3	2.97	47.7	19a	1.20	21.1
4	3.37	42.4	19b	1.60	—
5	5.49	122.1	20a	1.45	30.5
6	—	136.3	20b	1.56	—
6-Me	1.73	20.7	21	4.68	76.3
7	2.19	44.5	22a	1.50	28.0
8a	1.42	34.5	22b	1.50	—
8b	1.93	—	23	0.83	9.4
9	4.30	75.6	1'	4.86	95.5
10a	1.36	37.7	2'	3.51	77.7
10b	2.28	—	3'	3.46	81.1
11	1.03	45.6	4'	3.12	82.3
12	2.76	48.9	5'	3.54	67.9
13	6.77	148.0	6'	1.28	17.8
14	—	145.1	2' -OMe	3.51	59.0
15	—	197.8	3' -OMe	3.51	57.7
16a	2.56	47.5	4' -OMe	3.56	60.9
16b	3.21	—			

[0367] b. 使用泰洛星 PKS 的 5AT 模块取代 spinosyn 模块 3AT 的杂化 spinosyn PKS

[0368] 以类似方法产生杂化 spinosyn PKS, 其中甲基丙二酰-CoA 特异性模块 3AT 结构域被乙基丙二酰-CoA 特异性泰洛星模块 5AT 结构域 (SEQ ID NO :26) 取代。产生的菌株记做

刺糖多孢菌 36P4。预期刺糖多孢菌中乙基丙二酰-CoA 不富足,因此在相同细胞中于 actI 启动子控制下表达编码巴豆酰-CoA 还原酶的肉桂链霉菌基因。这应该明显增加丁酰-CoA 的细胞内量,其中丁酰-CoA 是可提供乙基丙二酰-CoA 的短链脂肪酸羧化酶的底物。刺糖多孢菌 36P4 的 PKS 含有天然 spnA 启动子下的 spnA, spnB 和截短 spnC,后面为包括安普霉素抗性标记的质粒 DNA。ActI 启动子下肉桂链霉菌巴豆酰-CoA 和 actII-ORF4 活化剂也在该质粒序列中。这之后是普那霉素抗性的启动子控制下的杂化 spnC(spnC*) 基因。本领域技术人员将领会到可以交换异源启动子,或实际上领会可以选择很多其它启动子。

[0369] 刺糖多孢菌菌株 36P4 产生具有与期望 16-脱甲基-16-乙基 spinosyns A 和 D 一致的 UV 吸光度、层析特性、质量和片段化模式的少量成分。来自刺糖多孢菌菌株 36P4 的主要产物是 spinosyns A 和 D。奇怪的是,刺糖多孢菌 36P4 占优势的新发酵产物是 21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A 和 6-乙基 spinosyn A。21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A 产生的水平是 spinosyn D 的 10% 以内。分离这些化合物并用 MS 和 NMR 完全描述其特征。我们提出由于乙基丙二酰-CoA 的细胞内浓度增加而产生了它们,其中乙基丙二酰-CoA 由导入巴豆酰-CoA 还原酶基因造成。装载模块 AT 和模块 8AT 的低特异性允许合并这个新底物。6-乙基-21-脱乙基-21-正丙基 spinosyn A 也由刺糖多孢菌 36P4 产生,作为较少因素。这三个产物每个在 C16 都具有甲基,暗示在这个系统中,泰洛星模块 5AT 主要合并甲基丙二酰-CoA。因此预期在 ccr 基因存在下,未工程改造的 spinosyn PKS(具有天然 AT3)将产生 21-正丙基和 6-乙基 spinosyn 化合物。

[0370] 实施例 22 可用于工程改造 spinosyn 生物合成途径而产生 16-脱甲基-16-乙基 spinosyns 的载体的构建

[0371] 见图 10。质粒 pTB4 是基于 pUC18 的质粒,含有包括泰洛星模块 4 的大部分的泰洛星 PKS 的 BamHI 片段。这个插入物来自保藏序列 ty1G.embo(保藏号 U78289)的 bp 24125 和 24130 之间(从 KS4 开始处)的 BamHI 位点和 bp31597 和 31612 之间(从 KS5 开始处)的 BamHI 位点。

[0372] 使用 pTB4 作为模板以及引物 AK1(SEQ ID NO:24)和 AK2(SEQ ID NO:25)通过 PCR 扩增泰洛星模块 5。在 AT 结构域开始处,引物 AK1 导入 MscI 位点(SEQ ID NO:24 的 bp 3-8)和在 AT 结构域末端,引物 AK2 导入 AvrII 位点(SEQ ID NO:25 的 bp 3-8)。在标准条件下使用 Pwo 耐热 DNA 聚合酶实施 PCR 反应。用 T4 多核苷酸激酶磷酸化该片段并克隆进入用 SmaI 消化和去磷酸化的商业上可获得的 pUC18。分析含正确方向插入物的质粒并进行测序。鉴定了含有正确序列的一个质粒并记做 pALK17。它以 MscI 位点邻接多接头的 HindIII 位点的方向含有该 PCR 片段。从 pALK17 切除 ty1 AT5 作为 MscI/AvrII 片段并克隆进入用 MscI 和 AvrII 消化的 pALK26 得到 pALK27。从 pALK24(实施例 16)切除这个构建体中缺乏的 407bpMscI 片段并连接进入去磷酸化的 MscI 消化的 pALK27。含有正确方向插入物的单一克隆记做 pALK31。pALK31 含有将 ty1 AT5 交换导入刺糖多孢菌模块 3 所需的片段,并且在起始密码子处具有 NdeI 位点和就在聚酮合酶序列下游具有 XbaI 位点。切除这个片段成为 NdeI/XbaI 片段并克隆进入 pALK21 得到 pALK36。这将新的模块 3 杂化片段在载体中置于 P_{ptr} 之下,该载体从 actI 启动子共表达 ccr,并可以通过接合转移到刺糖多孢菌并使用安普霉素抗性进行选择。

[0373] 实施例 23 含有杂化聚酮合酶的刺糖多孢菌菌株的产生,该合酶含有泰洛星模块

5AT 取代 spinosyn 模块 3AT, 并提供适当的乙基丙二酰 -CoA 共底物

[0374] 见图 12。用 pALK36 转化刺糖多孢菌 NRRL 18538。选择转化体的安普霉素抗性并用 Southern 印迹分析来筛选。单一转化体记做刺糖多孢菌菌株 36P4。

[0375] 实施例 24 从刺糖多孢菌 36P4 制备和分离化合物

[0376] 将刺糖多孢菌 36P4 的冰冻营养原液接种到 CSM(50ml, 在 250ml 带有弹簧的 Erlenmeyer 瓶中孵育) 中的初级营养预培养物中。如实施例 8 所述制备和孵育营养培养基中的次级预培养物。

[0377] 如实施例 6, 制备十四升制备培养基, 添加 0.01% v/v PluronicL-0101 (BASF) 防泡剂。用次级营养预培养物以 5% v/v 接种制备培养基, 并允许在 20L 搅拌的生物反应器中在实施例 8 所述条件下发酵 7-10 天。

[0378] 对于代谢产物的鉴定, 如实施例 5 所述用 LC-MS 分析 1ml 等分部分发酵肉汤培养基。通过与可信标准, 以及与来自刺糖多孢菌菌株 NRRL18538 的发酵提取物比较, 证实了新 spinosyn 代谢产物的存在 (表 16)。用与 spinosyn D 类似但不同的截留时间洗脱得到了主要新成分, 并具有等同质量; 这个化合物下面鉴定为 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosynA。随后洗脱了第二个显著的新成分, 其质量比 spinosyn D 高 14 个单位; 该化合物下面称为 6- 乙基 spinosyn A。随后仍洗脱第三个明显峰并具有比 spinosyn D 高 28 个单位的质量; 据信这个化合物是 6- 乙基 -21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A。所有这些化合物的质谱显示 $[M+H]^+$ 离子加福洛氨糖 (forosamine) 片段。此外, 清晰存在几个其它新成分, 但以少量存在。在第一主要新成分之后洗脱了这些新成分之一并具有与 spinosyn D 等同的质量; 这个化合物可能是 16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosyn A。其它少量新成分显示高于 spinosyn D 14 个质量单位的 $[M+H]^+$ 离子以及与福洛氨糖 (forosamine) 片段一致的质量。这些少量新成分之一可能是 16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosyn D。

[0379] 表 16

[0380]

化合物	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosynA	23	25.4	746.5 $[M+H]^+$; 142.3
6- 乙基 spinosynA	24	27.1	760.5 $[M+H]^+$; 142.4
6- 乙基 -21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosynA	25	29.1	774.5 $[M+H]^+$; 142.3
16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosynA	26	26.4	746.5 $[M+H]^+$; 142.3

化合物	化合物编号 (见表 3)	截留时间 (分钟)	主要质谱数据 (m/z)
推定的 16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosynD	27	26.7	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
推定的 16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosynD	27	27.3	760.4 [M+H] ⁺ ; 142.4
推定的 16- 脱甲基 -16- 乙基 spinosynD	27	27.5	760.5 [M+H] ⁺ ; 142.3

[0381] 离心澄清剩余的发酵肉汤培养基 (12L) 并如实施例 8 所述进行提取。残留物溶于甲醇 (10ml), 水 (2ml) 和甲酸 (100 μ l)。过滤整个样品并在重力下施加到 C₁₈-BondElute SPE 筒 (70g, 150ml)。使用 FlashMaster Personal 系统 (Jones Chromatography, Wales UK) 用含 0.1% 甲酸的 10% 步长的乙腈水溶液梯度 (100ml 每步骤) 处理该筒。最后用甲醇 (2 $\times$ 100ml) 洗涤柱。混合含 746amu 或更高质量的 spinosyn 样分子的馏分并真空除去溶剂。残留油 (3ml) 溶于甲醇 (1.5ml)。如实施例 8 所述以两个等分对这个样品进行初次层析。

[0382] 混合来自最初分离物对的含有 6- 乙基 spinosyn A 和 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn D (m/z = 760) 的馏分并真空除去溶剂。该残留物溶于甲醇 (1ml) 并通过反相硅胶 (Hypersil C₁₈-BDS, 5 μ m; 21 $\times$ 250mm) 进行层析, 以 21ml/ 分的流速, 用如下所述的梯度洗脱。

[0383] T = 0 分钟, 40% B; T = 80, 50% B。

[0384] 每隔 30 秒收集馏分。混合主要含有 6- 乙基 spinosyn A 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品, 用水 (10ml) 洗涤并用甲醇 (2 $\times$ 10ml) 洗脱, 并真空除去溶剂。混合来自最初分离物对的主要含 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A (m/z = 746) 的馏分并真空除去溶剂。残留物溶于甲醇: 水 (7 : 3, 1ml) 并通过相同柱进行层析, 用下列梯度以 21ml/ 分洗脱。

[0385] T = 0 分钟, 40% B; T = 45, 80% B。

[0386] 每隔 30 秒收集馏分。混合仅含 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A 的馏分。分别混合含这个化合物与 spinosyn D 的混合物的样品, 真空除去溶剂, 残留物如上所述再次层析。接着仅含 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A 的馏分与第一次运行所得的那些混合。混合含这两种化合物的混合物的馏分并执行另一轮层析。

[0387] 混合这三次运行所得的仅含 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A 的馏分, 真空除去乙腈, 并使用 C₁₈-BondElute 筒 (200mg) 浓缩样品。在重力下施加该样品, 用水 (10ml) 洗涤, 用甲醇 (2 $\times$ 10ml) 洗脱, 真空除去溶剂。

[0388] 6- 乙基 spinosyn A (化合物 24) 具有下列特征:

[0389] 分离产量: 4.8mg

[0390] 分子量 :759

[0391] 分子式 : $C_{43}H_{69}NO_{10}$

[0392] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测) :244nm

[0393] 电喷 MS : MH^+ 的 $m/z = 760.5$;福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 $m/z = 142.4$ 。

[0394] 准确 FT-ICR-MS : $[MNa]^+$ 的 $m/z = 782.4818$ (需要 782.4814)。

[0395] 表 17 总结了 6- 乙基 -spinosyn A 在 $CDCl_3$ 中的 1H 和 ^{13}C NMR 化学迁移数据。

[0396] 表 17

[0397]

位置	1H	^{13}C	位置	1H	^{13}C
1	—	172.6	21	4.67	76.6
2a	2.42	34.0	22a	1.49	28.4
2b	3.13	—	22b	1.49	—
3	2.97	47.9	23	0.82	9.3
4	3.44	41.9	24a	2.05	27.4
5	5.46	120.3	24b	2.05	—
6	—	141.8	25	1.03	12.6
7	2.23	44.4	26	1.17	16.1
8a	1.42	34.5	1'	4.85	95.5
8b	1.95	—	2'	3.50	77.7
9	4.30	75.8	3'	3.47	81.0
10a	1.35	37.7	4'	3.12	82.3
10b	2.26	—	5'	3.55	67.9
11	1.00	45.9	6'	1.28	17.8
12	2.77	49.1	2' -OMe	3.50	59.0

位置	¹ H	¹³ C	位置	¹ H	¹³ C
13	6.76	147.7	3'-OMe	3.50	57.7
14	—	144.4	4'-OMe	3.56	60.9
15	—	202.9	1''	4.43	103.4
16	3.28	47.7	2''a	1.50	30.8
17	3.63	80.6	2''b	1.99	—
18a	1.52	34.3	3''a	1.47	18.6
18b	1.52	—	3''b	1.88	—
19a	1.20	21.7	4''	2.28	64.9
19b	1.77	—	5''	3.49	73.4
20a	1.52	30.0	6''	1.28	19.0
20b	1.52	—	4''-NMe ₂	2.28	40.6

[0398] 化学迁移参照 CHCl₃ 在 7.26ppm 的质子。

[0399] 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn D(化合物 28) 具有下列特征：

[0400] 分离产量：~ 1mg

[0401] 分子量：759

[0402] 分子式：C₄₃H₆₉NO₁₀

[0403] 这个化合物以少量成分存在，与 6- 乙基 spinosyn A 成 4：1 的混合物。不能区别这两个化合物的累积 UV 和 MS 数据。使用 NMR 方法，从该混合物的 COSY 光谱观察到的相关性可分配 21- 正丙基旋转系统。甲基 H24(δ_H 0.87, dd, 7.3Hz, 7.3Hz) 与亚甲基 H23(δ_H 1.23, m) 相关。H23 与亚甲基 H22(δ_H 1.43, m) 相关，H22 依次与 H21(δ_H 4.73, m) 相关。在混合物的 ¹H NMR 谱中可见 H21 共振是分离的多重峰。

[0404] 21- 脱乙基 -21- 正丙基 spinosyn A(化合物 23) 具有下列特征。

[0405] 分离产量：5.1mg

[0406] 分子量：745

[0407] 分子式：C₄₂H₆₇NO₁₀

[0408] UV(HPLC 分析过程中通过二极管阵列检测)：244nm

[0409] 电喷 MS：MH⁺ 的 m/z = 746.5；福洛氨糖 (forosamine) 片段离子在 m/z = 142.4。

[0410] 这个化合物的累积 NMR 数据等同于实施例 15 中这个化合物描述的那些。

[0411] 通过 spn 延伸模块内其它 AT(酰基转移酶) 结构域的取代而构建的杂化 PKS 基因可用于产生在聚酮化合物上的其它位置具有改变侧链的新 spinosyns。例如,在与上述类似的方法中,可构建杂化聚酮合酶来产生 spinosyns,其中 C18 或 C20 具有除氢以外的侧链(通常是甲基或乙基)。主要合并甲基丙二酰-CoA 的天然 AT 结构域(如 spn AT3) 可被优选合并丙二酰-CoA(如雷帕霉素 AT2) 或乙基丙二酰-CoA(如泰洛星 AT5) 的异源结构域取代。然而,本领域技术人员将意识到这些杂化聚酮合酶的供体结构域或模块可从各种 I 型聚酮合酶簇获得,并且不以任何方式限于来自红霉素、阿弗菌素、雷帕霉素和泰洛星生物合成的结构域或模块。

[0412] 也预期组合操作应该产生多产性生物合成途径,以及具有两个或更多新区域的 spinosyns。

[0413] 可能需要另外的生物合成基因来提供通常不并入 spinosyns 的前体的足够供应,如 ccr 基因来增加乙基丙二酰-CoA 供应。通过提供合并入其它 spn AT 结构域的非自然前体,这个基因修饰也可以导致新的 spinosyns 的产生。其它 spn AT 结构域的取代将产生杂化 PKS 基因,它导致在 C6 具有乙基,或在 C18 或 C20 具有甲基或乙基侧链的 spinosyns 的合成。负责每个 β -酮基团(KR, DH 或 ER) 的修饰程度的 spn PKS 结构域也可以被异源结构域取代而产生杂化 PKS 基因,进而产生具有不同的饱和键,羟基或双键的 spinosyns。

[0414] 总之,我们证明了这里要求保护的杂化 spinosyn PKS 基因可有效制备新的杀昆虫活性的 spinosyns。该杂化基因是由与其它 I 型 PKS 基因的一部分或多部分组合的 spn PKS 基因得到的。W098/01546 "Polyketides and their synthesis" 中描述的策略用于选择该 DNAs 被拼接在一起的位点。该杂化基因可以可操作连接异源启动子,如来自放线菌紫素生物合成基因 actI 的那些(连同编码其相关活化剂的 actII-ORF4 基因,见 W0 98/01546),或来自普那霉素抗性基因 ptr 的(Blanc 等,1995)。该杂化 PKS 基因在也含有产生生物活性 spinosyn 所需的非 PKS 功能的生物中表达。可以使用常规方案(如美国专利 5,362,634 所述)培养本发明提供的修饰菌株以提供 spinosyns。

[0415] 可想到本发明的杂化 spinosyn PKSs 不仅可以在刺糖多孢菌中表达,而且可以在其它宿主生物表达,例如红色糖多孢菌,来产生杀昆虫活性的 spinosyns。属于放线菌类别,优选链霉菌类别的其它原核生物细胞也是合适的宿主生物。白色链霉菌(*Streptomyces albus*) 是具体实例。

[0416] 新 spinosyns 的杀虫活性

[0417] 这里要求保护的化合物可有效控制昆虫和螨。包括该化合物的所有异构体,和该化合物及其异构体的任何酸加成盐。也包括美国专利 6,001,981 所述制备其它修饰的 spinosyns 的方法制成的半合成衍生物。

[0418] 该化合物显示抗很多昆虫和螨的活性。更特别地,该化合物显示抗鳞翅目昆虫成员的活性,如甜菜夜蛾,烟芽夜蛾,苹蠹蛾和菜尺蛾。它们也显示出抗鞘翅目(甲虫和象虫)和双翅目(蚊蝇)成员的活性。该化合物也显示出抗半翅类(truss bugs),同翅目(蚜虫和螨),缨翅目(蓟马),直翅目(蟋蟀),蚤目(跳蚤),isoptera(白蚁)和膜翅目 Formicidae(蚂蚁)成员的活性。该化合物也显示出抗二点叶螨的活性,它是蛛形纲蜱螨目的成员。

[0419] 本发明的进一步方面涉及抑制昆虫或螨的方法。在一个优选实施方案中,本发明

涉及抑制易感昆虫的方法,包括给植物应用灭活昆虫有效量的根据本发明的化合物。要求保护的化合物以组合物形式应用,该组合物也是本发明的一部分。这些组合物包括惰性载体中的灭活昆虫或螨有效量的化合物。该活性成分可以以要求保护的单一化合物,两个或更多化合物的混合物或任何化合物连同产生它的发酵培养基的干燥部分的混合物而存在。根据农业或控制害虫领域中的常规步骤和方案制备组合物,但该步骤和方案是新的和重要的,因为存在本发明的一个或更多化合物。该化合物可以是浓缩制剂,它分散于水中或可以是粉剂、饵或颗粒制剂形式,可以不进一步处理而使用。

[0420] 通过添加其它,例如杀昆虫、杀螨和 / 或杀线虫活性的成分,根据本发明的组合物的作用可以得到增强。例如,一个或更多下列化合物可以合适地与本发明化合物组合:有机磷化合物、氨基甲酸酯、拟除虫菊酯、酰基脲、其它类型的昆虫生长调节剂和昆虫激素类似物、neonicotinoids 和其它尼古丁、大环内酯和其它杀昆虫、杀螨、molluscicidal 和杀线虫化合物或活性剂。WO 00/56156 的 " Synergistic Insecticide Mixtures " 公开了某些已知 spinosyn 化合物与尼古丁乙酰胆碱受体的激动剂或拮抗剂组合控制动物害虫的用途。WO 00/35282 的 " Combination of Active Ingredients " 公开了多杀菌素与杀真菌活性化合物组合的用途。WO 00/35286 的 " Combinations of Active Ingredients " 公开了多杀菌素与其它化合物组合控制动物昆虫和真菌。WO 99/60856 的 " Use of Spinosyns as Soil Insecticides " 公开了某些已知 spinosyns 通过土壤或通过灌溉处理种子和应用给植物而控制昆虫的用途。WO 99/33343 的 " Use of Macrolides in Pest Control " 公开了 spinosyns 控制转基因庄稼的用途, spinosyns 在保护较晚形成的植物繁殖材料和植物器官以防害虫攻击中的用途,和 spinosyns 控制木材害虫和软体动物的用途。通式 I 的化合物也可以用于这些目的。

[0421] 本发明的化合物也可以有效控制节肢动物来治疗动物,即昆虫和蛛形纲动物包括各种蝇和蝇幼虫、跳蚤、虱、螨和蜱,它们是动物上的害虫。递送杀外寄生虫剂 (ectoparasiticide) 的技术是本领域技术人员熟知的。通常,本化合物通过喷雾、浸剂 (dip) 或粉剂应用于动物的外表面。也可以使用美国专利 4,265,876 中公开的传递方法即耳签将该化合物传递给动物。

[0422] 仍在另一个实施方案中,该化合物可以用于控制是牛和其它动物粪便中害虫的昆虫和蛛形纲动物。在这个实施方案中,该化合物可以经口给予,且该化合物移动通过肠道并出现在粪便中。粪便中昆虫的控制间接保护动物不受害虫的侵害。

[0423] 本发明的化合物也可以有效作为人药物来控制寄生虫,例如虱。该化合物也可以用于例如 WO 00/01347 中公开的控制虱的制剂。

[0424] 实施例 25 新纯化的 spinosyns 是杀昆虫剂的证明

[0425] 局部试验表明了本发明化合物的生物活性,在该试验中该化合物以 1 微克 / 幼虫的比率应用于实验室养育的幼虫 (平均体重 22mg)。含每个化合物的丙酮溶液 (1mg/ml) 沿着六只烟芽夜蛾 (*Heliothis virescens*) 幼虫和六只甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 幼虫的背部应用。处理的幼虫接着在 21°C, 60% RH, 六孔塑料培养皿中保持 2 天。在处理后的两天间隔期间,给每只幼虫供应 1cm³ 的基于琼脂的鳞翅目饮食来维持。在两天期末确定死亡率百分比 (表 18)。

[0426] 表 18

[0427]

化合物	化合物编号(见表3)	烟芽夜蛾		甜菜夜蛾	
		比率(微克/幼虫)	死亡率(%)	比率(微克/幼虫)	死亡率(%)
只有溶剂		0	0	0	0
21-环丙基	1	1	100	1	33
21-环丁基	3	1	83	1	83
21-环丁基, 6-甲基	4	1	100	1	83
21-环丁基, 5, 6-二氢	8	1	100	1	83
21-异丙基	9	1	100	1	100
21-正丙基	23	1	100	1	100

[0428] 通式(I)的化合物可以在US 6,001,981中公开的方法中用作中间体来制备半合成spinosyn类似物,也预期该类似物具有杀昆虫剂活性。

[0429] 参考文献

[0430] 1) Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R. 和 Schoner, B.E. (1992) " Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. " *Gene* 116 :43-49.

[0431] 2) Bisang, C., Long, P.F., Cortès, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A.L., Cox, R.J., Simpson, T.J., Staunton, J. 和 Leadlay, P.F. (1999) " A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. " *Nature* 401 :502-505.

[0432] 3) Blanc, V., Salah-Bey, K., Folcher, M. 和 Thompson, C.J. (1995) " Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. " *Mol. Microbiol.* 17 :989-999.

[0433] 4) Broughton, M.C., Huber, M.L.B., Creemer, L.C., Kirst, H.A. 和 Turner JR. (1991) " Biosynthesis of the macrolide insecticidal compound A83543 by *Saccharopolyspora spinosa*. " *Proceedings of Amer. Soc. Microbiol.*, Washington D.C.

[0434] 5) Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J. 和 Katz, L. (1991) " Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. " *Science* 252 :675-679.

[0435] 6) Donadio, S.A., Stassi, D., McAlpine, J.B., Staver, M.J., Sheldon, P.J.,

Jackson, M. , Swanson, S.J. , Wendt-Pienkowski, E. , Wang, YG. , Jarvis, B. , Hutchinson, CR. 和 Katz, L. (1993) " Recent developments in the genetics of erythromycin formation. " In Industrial microorganisms : basic and applied molecular genetics. (Baltz, RH. , Hegeman, GD. 和 Skatrud, PL. , eds), pp. 257-265. Amer. Soc. Microbiol, Washington D. C.

[0436] 7) Dutton, C.J. , Gibson, S.P. , Goudie, A.C. , Holdom, K.S. , Pacey, M.S. , Ruddock, J.C. , Bu' Lock, J.D. 和 Richards, M.K. (1991) " Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. " J Antibiot. 44 :357-365.

[0437] 8) Hosted, T.J. 和 Baltz, R.H. (1996) " Mutants of *Streptomyces roseosporus* that express enhanced recombination within partially homologous genes. " Microbiology 142 :2803-2813.

[0438] 9) Hunziker, D. , Yu, T.W. , Hutchinson, C.R. , Floss, H.G. 和 Khosla, C. (1998) " Primer unit specificity in rifamycin biosynthesis principally resides in the later stages of the biosynthetic pathway. " J. Am. Chem. Soc. 12 :1092-1093.

[0439] 10) Kirst, H.A. , Michel, K.H. , Martin, J.W. , Creemer, L.C. , Chio, E.H. , Yao, R.C. , Nakatsukasa, W.M. , Boeck, L.D. , Occolowitz, J.L. , Paschal, J.W. , Deeter, J.B. , Jones, N.D. 和 Thompson, G.D. (1991) " A83543A-D, unique fermentation-derived tetracyclic macrolides. " Tetrahedron Letts 32 :4839-4842.

[0440] 11) Marsden, A.F.A. , Wilkinson, B. , Cortès, J. , Dunster, N.J. , Staunton, J. 和 Leadlay, P.F. (1998) " Engineering broad specificity into an antibiotic-producing polyketide synthases. " Science 279 :199-202.

[0441] 12) Matsushima, P. , Broughton, M.C. , Turner, J.R. 和 Baltz, R.H. (1994) " Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa* : effects of chromosomal insertion on macrolide A83543 production. " Gene 146 :39-45.

[0442] 13) Pacey, M.S. , Dirlam, J.P. , Geldart, R.W. , Leadlay, P.F. , McArthur, H.A.I. , McCormick, E.L. , Monday, R.A. , O' Connell, T.N. , Staunton, J. 和 Winchester, T.J. (1998) " Novel erythromycins from a recombinant *Saccharopolyspora erythraea* strain NRRL 2338 pIGI. Fermentation, isolation and biological activity, " J. Antibiot. 51 :1029-1034.

[0443] 14) Rowe, C.J. , Cortés, J. , Gaisser, S. , Staunton, J. 和 Leadlay, P.F. (1998) " Construction of new vectors for high-level expression in actinomycetes, " Gene 216 :215-223.

[0444] 15) Salah-Bey, K. , Blanc, V. 和 Thompson, C.J. (1995) " Stress-activated expression of a *Streptomyces pristinaespiralis* multidrug resistance gene (ptr) in various *Streptomyces* spp. and *Escherichia coli*. " Mol. Microbiol. 17 :1001-1012.

[0445] 16) Simon, R. , Preifer, U. 和 Pühler, A. (1983) " A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. " Bio/Technology 1 :784-791.

[0446] 17) Stassi, DL., Kakavas, SJ, Reynolds, KA, Gunawardana, G., Swanson, S., Zeidner, D., Jackson, M., Liu, H., Buko, A. 和 Katz, L. (1998) " ethyl-substituted erythromycin derivatives produced by directed metabolic engineering. " Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :7305-7309.

[0447] 18) Strobel, RJ. 和 Nakatsukasa WM. (1993) " Response surface methods for optimizing *Saccharopolyspora spinosa*, a novel macrolide producer. " J. Indust. Microbiol. 11 :121-127.

[0448] 19) Waldron, C., Matsushima, P., Rosteck, PR., Jr., Broughton, MC., Turner, J., Madduri, K., Crawford, KP., Merlo, DJ. 和 Baltz, RH. (2001) " Cloning and analysis of the spinosad biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora spinosa*. " Chem. Biol. 8 :487-499

[0449] 序列表

[0450] <110> Martin, Christine J.

[0451] Burns, Lesley S.

[0452] Graupner, Paul R.

[0453] Lewer, Paul

[0454] Vousden, William A.

[0455] Wilkinson, Barrie

[0456] Waldron, Clive

[0457] <120> 新的产生 spinosyn 的聚酮合酶

[0458] <130> 62069

[0459] <140>

[0460] <141>

[0461] <150> US 60/358075

[0462] <151> 2002-02-19

[0463] <160> 26

[0464] <170> PatentIn Ver. 2.0

[0465] <210> 1

[0466] <211> 61

[0467] <212> DNA

[0468] <213> 人工序列

[0469] <220>

[0470] <223> 人工序列描述 : 寡核苷酸 PRIS1

[0471] <400> 1

[0472] ggggaattca ctagtccgcg gagaaatagc gctgtacagc gtatgggaat ctcttgtacg 60

[0473] g 61

[0474] <210> 2

[0475] <211> 68

[0476] <212> DNA

- [0477] <213> 人工序列
- [0478] <220>
- [0479] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 PRIS2
- [0480] <400>2
- [0481] gggggatccc atatgggctc cttgtacggt gtacgggaag atactcgtac accgtacaag 60
- [0482] agattccc 68
- [0483] <210>3
- [0484] <211>94
- [0485] <212>DNA
- [0486] <213> 始旋链霉菌
- [0487] <400>3
- [0488] actagtccgc ggagaaatag cgctgtacag cgtatgggaa tctcttgtag ggtgtacgag 60
- [0489] tatcttcccg tacaccgtac aaggagccca tatg 94
- [0490] <210>4
- [0491] <211>44
- [0492] <212>DNA
- [0493] <213> 人工序列
- [0494] <220>
- [0495] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR311
- [0496] <400>4
- [0497] cagatatcac tagttcggac gcatatgctg caagtatcta gaac 44
- [0498] <210>5
- [0499] <211>44
- [0500] <212>DNA
- [0501] <213> 人工序列
- [0502] <220>
- [0503] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR312
- [0504] <400>5
- [0505] gttctagata cttgcagcat atgcgtccga actagtata tctg 44
- [0506] <210>6
- [0507] <211>32
- [0508] <212>DNA
- [0509] <213> 人工序列
- [0510] <220>
- [0511] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 SP28
- [0512] <400>6
- [0513] aggacacata tggcggacct gtcaaagctc tc 32
- [0514] <210>7
- [0515] <211>34

[0516]	<212>DNA	
[0517]	<213> 人工序列	
[0518]	<220>	
[0519]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 SP29	
[0520]	<400>7	
[0521]	cccgcctagcg gttegcgcggg cgccgcttcg ttgg	34
[0522]	<210>8	
[0523]	<211>1685	
[0524]	<212>DNA	
[0525]	<213> 红色糖多孢菌	
[0526]	<400>8	
[0527]	catatggcgg acctgtcaaa gctctccgac agtcggactg cacaacctgg gaggatcggtt	60
[0528]	cgctccgtggc ccctgtcggg gtgcaatgaa tccgccttgc gggcccgtgc gcgccaattg	120
[0529]	cgtgcacatc tccatcgatt tcccgatgcc ggtgtcgaag gtgtcggggc cgcgctcgcg	180
[0530]	cacgacgagc aggcggacgc cggctccgat cgcgcggtcg tcgtcgctc ctcgacctcc	240
[0531]	gagctgctcg acggcctggc cgccgtcgcc gacggccggc cgcacgcctc ggtgggtccgc	300
[0532]	ggcgtggccc ggccgtccgc gccggtgggtg ttctgtcttc cgggccaggg cgcgcaatgg	360
[0533]	gccgggatgg cgggcgaact cctcggcgag tcaagggttt tcgccccgc gatggacgcg	420
[0534]	tgcgcgcggg cgttcgagcc cgtgaccgac tggacgctgg cgcaggctct ggactctccc	480
[0535]	gagcagtcgc gccgcgtcga ggtcgtccag ccgcacctgt tcgcggtgca gacgtcgctg	540
[0536]	gccgcgctct ggccgtcctt cggcgtgacc ccgcacgcc tggtgggcca cagcatcggc	600
[0537]	gagctggccg ccgcgcacgt gtgcggtgcg gccggtgcc cgcacgccgc gcgcgccgcc	660
[0538]	gcgctgtgga gccgcgagat gattccgttg gtgggcaacg gcgacatggc agccgtcgcg	720
[0539]	ctctccgccg acgagatcga gccgcgcatc gcccggtggg acgacgacgt ggtgctggcc	780
[0540]	ggggtcaacg gtccgcgctc ggttctgctg accgggtcgc cggaaccggt cgcgcgccgg	840
[0541]	gtccaggagc tctcggccga gggggtccgc gcacagggtc tcaatgtgtc gatggcggcg	900
[0542]	cactcggcgc aggtcgacga catcgccgag gggatgcgct cggccctggc gtggttcgcg	960
[0543]	cccgttggt cggaggtgcc cttctacgcc agcctcaccg gaggtgcggt cgacacgcgg	1020
[0544]	gagctggtgg ccgactactg gcgccgcagc ttccggctgc cgggtgcgctt cgacgaggcg	1080
[0545]	atccggtccg ccctggaggt cgggtcccgc acgttcgtcg aagegagccc gcacccggtg	1140
[0546]	ctggccgccg cgctccagca gacgtcgac gccgagggt cctcgccgc ggtgggtccg	1200
[0547]	acgttgcaac gcgggcaggg cggcatgcgg cggttcctgc tggccgcggc ccaggcggtt	1260
[0548]	accggcggcg tggccgtcga ctggaccgcc gcctacgacg acgtgggggc cgaaccggc	1320
[0549]	tctctgccgg agttcgcgcc ggccgaggag gaagacgagc cggccgagtc cggcgtcgac	1380
[0550]	tggaacgcgc caccgcacgt gctgcgcgag cggctgctcg cggtcgtcaa cggcgagacc	1440
[0551]	gccgcgttgg cgggccgcga agccgacgcc gaggccacgt tccgcgagct ggggctggac	1500
[0552]	tcggtgctgg ccgcgcagct gcgcgccaaag gtgagcgccg cgatcgggcg cgaggtcaac	1560
[0553]	atcgccctgc tctacgacca ccgactccg cgtgcgctcg cggaagcact cgcggcggga	1620
[0554]	accgaggtcg cacaacggga aaccgcgcgc cggaccaacg aagcggcgcc cggcgaaccg	1680

[0555]	ctagc	1685
[0556]	<210>9	
[0557]	<211>32	
[0558]	<212>DNA	
[0559]	<213> 人工序列	
[0560]	<220>	
[0561]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 SP14	
[0562]	<400>9	
[0563]	aagctagccg tgatcgggat gggctgtcgg tt	32
[0564]	<210>10	
[0565]	<211>39	
[0566]	<212>DNA	
[0567]	<213> 人工序列	
[0568]	<220>	
[0569]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 SP15	
[0570]	<400>10	
[0571]	atagcggccg cccccagccc ccacagatcc ggtcaccaa	39
[0572]	<210>11	
[0573]	<211>1694	
[0574]	<212>DNA	
[0575]	<213> 除虫链霉菌	
[0576]	<400>11	
[0577]	catatggcgg acctgtcaaa gctctccgac agtcggactg cacaacctgg gaggatcggtt	60
[0578]	cgctccgtggc ccctgtcggg gtgcaatgaa tccgccttgc gggcccgtgc gcgccaattg	120
[0579]	cgtgcacatc tcgatcgatt tcccgatgcc ggtgtcgaag gtgtcggggc cgcgctcgcg	180
[0580]	cacgacgagc aggcggacgc cggctccgat cgcgcggtcg tcgtcgcctc ctcgacctcc	240
[0581]	gagctgctcg acggcctggc cgccgtcgcc gacggccggc cgcacgcctc ggtgggtccgc	300
[0582]	ggcgtggccc ggccgtccgc gccactagtc ttctgttttc ccgggcaggg cccgcaatgg	360
[0583]	ccgggcatgg gaagggaact tctcgacgct tccgacgtct tccgggagag cgtccgcgcc	420
[0584]	tgcgaagccg cgttcgcgcc ctacgtcgac tggtcgggtg agcagggtgtt gcgggactcg	480
[0585]	ccggacgctc ccgggctgga ccgggtggac gtcgtccagc cgacctgtt cgccgtcatg	540
[0586]	atctccctgg ccgccctctg gcgctcgcaa ggggtcgagc cgtgcgcggt gctgggacac	600
[0587]	agcctgggcg agatcgcggc agcccacgtc tcgggaggcc tgtccctggc cgacgccgca	660
[0588]	cgcgtggtga cgctttggag ccaggcacag accacccttg ccgggaccgg cgcgctcgtc	720
[0589]	tccgtcgccg ccacgcggga tgagctcctg ccccgaaatcg ctccgtggac cgaggacaac	780
[0590]	ccggcgcggc tcgccgtcgc agccgtcaac ggaccccgga gcacagtcgt ttccggtgcc	840
[0591]	cgcgaggccg tcgcggacct ggtggccgac ctaccgccg cgcagggtgcg cacgcgcatg	900
[0592]	atcccggtgg acgttccccg ccaactcccc ctgatgtacg ccatcgagga acgggtcgtc	960
[0593]	agcggcctgc tgcccatcac cccacgcccc tcccgcctcc ctttccactc ctcggtgacc	1020

[0594]	ggcggccgcc tcgacacccg cgagctagac gcggcgtact ggtaccgcaa catgtcgagc	1080
[0595]	acgggtccggt tcgagcccgc cgcccggctg cttctgcagc agggggccaa gacgttcgtc	1140
[0596]	gagatgagcc cgcacccggt gctgaccatg ggcctccagg agctcgccgc ggacctgggc	1200
[0597]	gacaccaccg gcaccgccga caccgtgate atgggcacgc tgcgcccgcg ccagggcacc	1260
[0598]	ctggaccact tcctgacgtc tctcgcccaa ctacgggggc atggtgagac gtcggcgacc	1320
[0599]	accgtcctct cggcacgcct gaccgcgctg tccccacgc agcagcagtc gctgctcctg	1380
[0600]	gacctggtgc gcgccacac catggcggtg ctgaacgacg acggaaacga gcgcaccgcg	1440
[0601]	tcggatgccg gcccatcggc gagtttcgcc cacctcggtc tcgactccgt catgggtgtc	1500
[0602]	gaactgcga accgcctcag caaggccacg ggcctgcggt tgcccgtgac gctcatcttc	1560
[0603]	gaccacacca cgccggccgc ggtcgccgcg cgccttcgga ccgcggcgct cggccacctc	1620
[0604]	gacgaggaca ccgcgcccggt accggactca ccagcggcc acggaggcac ggcagcggcg	1680
[0605]	gacgaccgc tagc	1694
[0606]	<210>12	
[0607]	<211>33	
[0608]	<212>DNA	
[0609]	<213> 人工序列	
[0610]	<220>	
[0611]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR322	
[0612]	<400>12	
[0613]	aatggccagg gctggcagtg ggccggtatg gca	33
[0614]	<210>13	
[0615]	<211>31	
[0616]	<212>DNA	
[0617]	<213> 人工序列	
[0618]	<220>	
[0619]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR323	
[0620]	<400>13	
[0621]	aacctaggaa cgccacggcc cagtcacagg t	31
[0622]	<210>14	
[0623]	<211>29	
[0624]	<212>DNA	
[0625]	<213> 人工序列	
[0626]	<220>	
[0627]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR324	
[0628]	<400>14	
[0629]	aacctaggcg cgggccgacg gctggacct	29
[0630]	<210>15	
[0631]	<211>26	
[0632]	<212>DNA	

[0633]	<213> 人工序列	
[0634]	<220>	
[0635]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR325	
[0636]	<400>15	
[0637]	cgacacgcac gtctcactct ggtcaa	26
[0638]	<210>16	
[0639]	<211>29	
[0640]	<212>DNA	
[0641]	<213> 人工序列	
[0642]	<220>	
[0643]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR328	
[0644]	<400>16	
[0645]	tatcactcta gaccagatat ccagctgca	29
[0646]	<210>17	
[0647]	<211>23	
[0648]	<212>DNA	
[0649]	<213> 人工序列	
[0650]	<220>	
[0651]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR329	
[0652]	<400>17	
[0653]	gctggatatac tggctctagag tga	23
[0654]	<210>18	
[0655]	<211>38	
[0656]	<212>DNA	
[0657]	<213> 人工序列	
[0658]	<220>	
[0659]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR330	
[0660]	<400>18	
[0661]	ttcctggagg gaaacgccat atgtcgatg aagagaag	38
[0662]	<210>19	
[0663]	<211>34	
[0664]	<212>DNA	
[0665]	<213> 人工序列	
[0666]	<220>	
[0667]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CR321	
[0668]	<400>19	
[0669]	tttgccagg gaagacgaag acgacctgc cgtc	34
[0670]	<210>20	
[0671]	<211>837	

- [0672] <212>DNA
- [0673] <213> 吸水链霉菌
- [0674] <400>20
- [0675] tggccagggg tgcagcgtg ctggtatggg tgaggaactg gccgccgctg tccccgtctt 60
- [0676] cgcgcggate catcagcagg tgtgggatct gctggatgtg cccgatctcg atgtgaatga 120
- [0677] gaccgggtat gccagccgg ccctgttcgc ttgcaggtg gctctgttcg ggttgctgga 180
- [0678] atcgtggggt gtacggccgg atgcggtggg cggtcactct gtcggtgagc tcgccgccgg 240
- [0679] atacgtctcc gggttgtggt cgttggagga tgccctgact ttggtgtcgg cgcgggctcg 300
- [0680] tctgatgcag gctctgcctg cgggtggggg gatggtcgct gtcccggctc cggaggatga 360
- [0681] ggctcgggcc gtgctgggtg aggggtgtgga gatcgccgcg gtcaacgggc cgctcgtcgg 420
- [0682] ggttctctcc ggtgatgagg ccgccgtgct gcaggccgcg gaggggctgg ggaagtggac 480
- [0683] gcggctggcg accagtcacg cgttccattc cgcccgatg gaaccgatgc tggaggagtt 540
- [0684] ccgggcggtc gctgaaggcc tgacctaccg gacgccgcag gtcgccatgg ccgctggtga 600
- [0685] tcaggtgatg accgctgagt actgggtgcg gcagggtccg gacacggtc ggttcggcga 660
- [0686] gcagggtggc tcgttcgagg atgcggtgtt cgtcgagctg ggtgccgacc ggtcactggc 720
- [0687] ccgcctggtc gatggcatcg cgatgctgca cggtgaccat gaggcgcagg ccgctgtcgg 780
- [0688] tgccctggct cacctgtacg tgaacggcgt gagtgtcgag tggtcgcgg tcctagg 837
- [0689] <210>21
- [0690] <211>30
- [0691] <212>DNA
- [0692] <213> 人工序列
- [0693] <220>
- [0694] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CCRMONF
- [0695] <400>21
- [0696] ggcaaacata tgaaggaaat cctggacgcg 30
- [0697] <210>22
- [0698] <211>32
- [0699] <212>DNA
- [0700] <213> 人工序列
- [0701] <220>
- [0702] <223> 人工序列描述 :寡核苷酸 CCRMONR
- [0703] <400>22
- [0704] tccgcggate ctcaagtgcg tcagatcagt gc 32
- [0705] <210>23
- [0706] <211>1394
- [0707] <212>DNA
- [0708] <213>Streptomyces cinnamonensis
- [0709] <400>23
- [0710] catatgaagg aaatcctgga cgcgattcag gccagaccg cgaccgcgag cggcaccgcc 60

[0711]	gcggtcacgt cgcgcgactt cgccgctctc cccctgcccc actcgtaccg cgcgatcacc	120
[0712]	gtgcacaagg acgagacgga gatgttcgcg ggccctcgagt cccgtgacaa ggacccccgc	180
[0713]	aagtcgctcc atctggacga cgtgccgate cccgaactcg gccccgggtga ggccttggtg	240
[0714]	gccgtcatgg cctcctcggt caactacaac tccgtgtgga cctcgatctt cgagccccgc	300
[0715]	tccaccttca gcttcttgga gcggtacggc cggtcagcg acctgagcaa gcgccacgac	360
[0716]	ctgccgtacc acatcategg ctccgacctg gcgggcgctg tgctgcgcac cgggccccgc	420
[0717]	gtgaacgcct ggaacccggg cgacgaggtc gtcgcgcaact gcctgagcgt cgagctggag	480
[0718]	tcctccgacg gccacaacga cacgatgctc gacccccgagc agcgcactctg gggcttcgag	540
[0719]	accaacttcg gcggtctcgc cgagatcgcg ctctgcaagt ccaaccagct catgccgaag	600
[0720]	cccggtcacc tgagctggga ggaggccgcc tcgcccggcc tggatgaact caccgcgtac	660
[0721]	cgccagctgg tgtcccga cggcgccggc atgaagcagg gcgacaacgt gctgatctgg	720
[0722]	ggcgcgagcg gcggactcgg gtctgtacgc acgcagttcg cgctcgccgg cggcgccaac	780
[0723]	cccatctgtg tcgtctccag cccccagaag gcggagatct gccgcgcgat gggcgccgag	840
[0724]	gcgatcatcg accgcaacgc cgagggtac aagttctgga aggacgagca gaccaggac	900
[0725]	cccaaggagt ggaagcgctt cggcaagcgc atccgcgagc tcaccggcgg cgaggacatc	960
[0726]	gacatcgtct tcgagcacc cggccgcgag accttcggcg cctcgggtcta cgtcacgcgc	1020
[0727]	aaggcgcgca ccatcaccac ctgcgcctcg acctcgggct acatgcacga gtacgacaac	1080
[0728]	cgctacctgt ggatgtccct gaagcgcac atcggtcgc atttcgcaa ctaccgcgag	1140
[0729]	gcgtgggagg ccaaccgcct gatcgccaag ggcaagatcc acccgacgct ctccaagacg	1200
[0730]	taccgcctgg aggacaccgg ccaggccgcc tacgacgtcc accgcaacct ccaccagggc	1260
[0731]	aaggtcggcg tcctcgccct cgcgcccag gagggcctgg gcgtgcgcga cccggagaag	1320
[0732]	cgggcccagc acatcgacgc gatcaaccgt ttccgcaacg tctgaacgca ctgatctgaa	1380
[0733]	cgcactgagg atcc	1394
[0734]	<210>24	
[0735]	<211>34	
[0736]	<212>DNA	
[0737]	<213> 人工序列	
[0738]	<220>	
[0739]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 AK1	
[0740]	<400>24	
[0741]	aatggccagg gctcgcagtg gccgtcgatg gccc	34
[0742]	<210>25	
[0743]	<211>36	
[0744]	<212>DNA	
[0745]	<213> 人工序列	
[0746]	<220>	
[0747]	<223> 人工序列描述 :寡核苷酸 AK2	
[0748]	<400>25	
[0749]	ttcctaggaa gagggcttct ccgtcgatct ccagtc	36

[0750] <210>26
 [0751] <211>972
 [0752] <212>DNA
 [0753] <213> 弗氏链霉菌
 [0754] <400>26
 [0755] tggccagggc tgcagtgge cgtcgatggc ccgggacctg ctcgaccgcg cgcccgccctt 60
 [0756] ccgcgagacg gcgaaggcct gcgacgccgc gctgagcgtc catctggact ggtccgtgct 120
 [0757] cgatgtcctc caggagaage cggacgcgcc gccgctgagc cgggtcgacg tgggtgcagcc 180
 [0758] cgtgctgttc acgatgatgc tgtegcctgc cgctgctgg cgggacctcg gcgtccaccc 240
 [0759] ggccgccgtg gtgggccact cccagggaga gatcgcggcg gcctgcgtgg ccggcgcgct 300
 [0760] ctccctggag gacgcggcgc ggatcgtggc gctgcgcagc cgggcatggc tcacactggc 360
 [0761] cggcaagggc ggcatggccg ccgtctccct gccggaagcc cggctgcgcg agcggatcga 420
 [0762] gcggttcggg cagcggctgt cgggtggccgc ggtgaacagc ccgggcacgg cggcggtcgc 480
 [0763] cggtgacgtg gacgcgctgc gggaactgct ggcgagctg accgcggagg gcatccgggc 540
 [0764] caagccgate cccggcgtgg acacggccgg ccactccgcg cagggtggacg gcctgaagga 600
 [0765] gcatctcttc gaggtgctgg cgccggtctc cccgcgctcc tcggacatcc cgttctactc 660
 [0766] gacggtgacg ggcgcgccgc tggacaccga gcggctggac gccgggtact ggtaccgcaa 720
 [0767] catgcgggag cccgtggagt tcgagaaggc cgtcagggca ctgatcgccg acggctacga 780
 [0768] cctgttcctg gactgcaacc cgcacccgat gctcgccatg tcgctggacg agacactcac 840
 [0769] cgacagcggc ggccacggca ccgtgatgca caccctccgc cggcagaagg gcagcgccaa 900
 [0770] ggacttcggc atggcgctct gcctcgcta tgtcaacgga ctggagatcg acggagaagc 960
 [0771] cctcttcccta gg 972

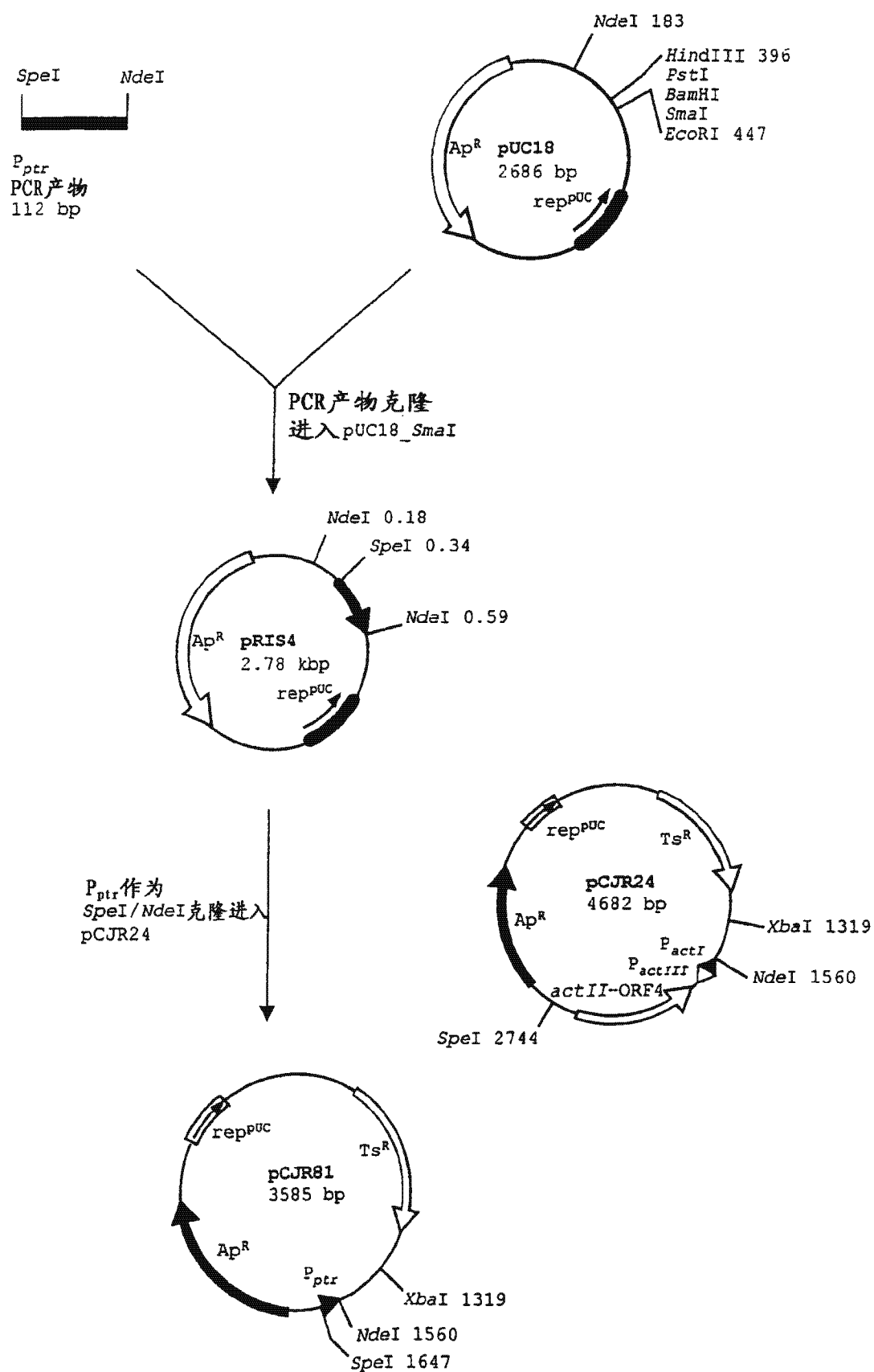


图 1

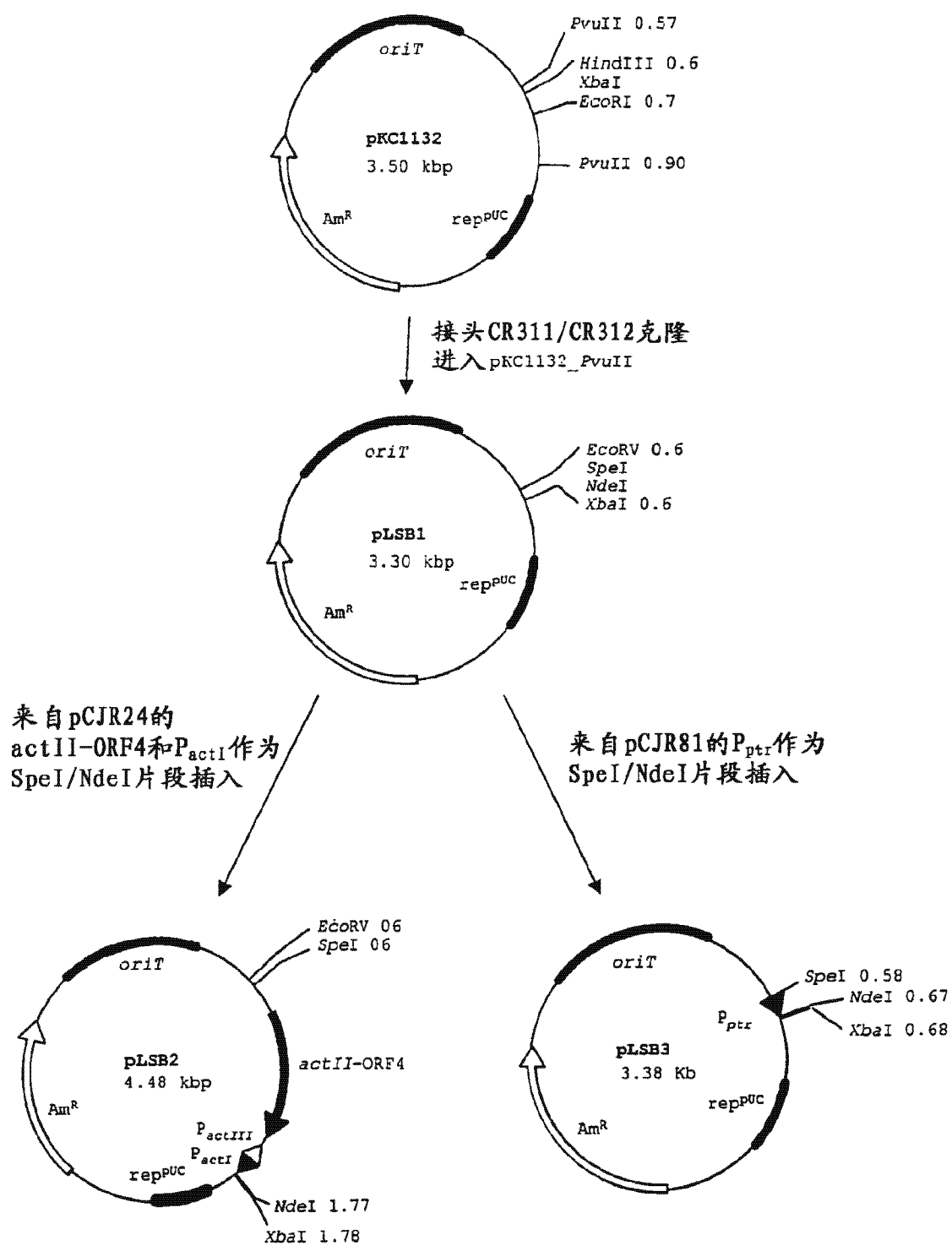


图 2

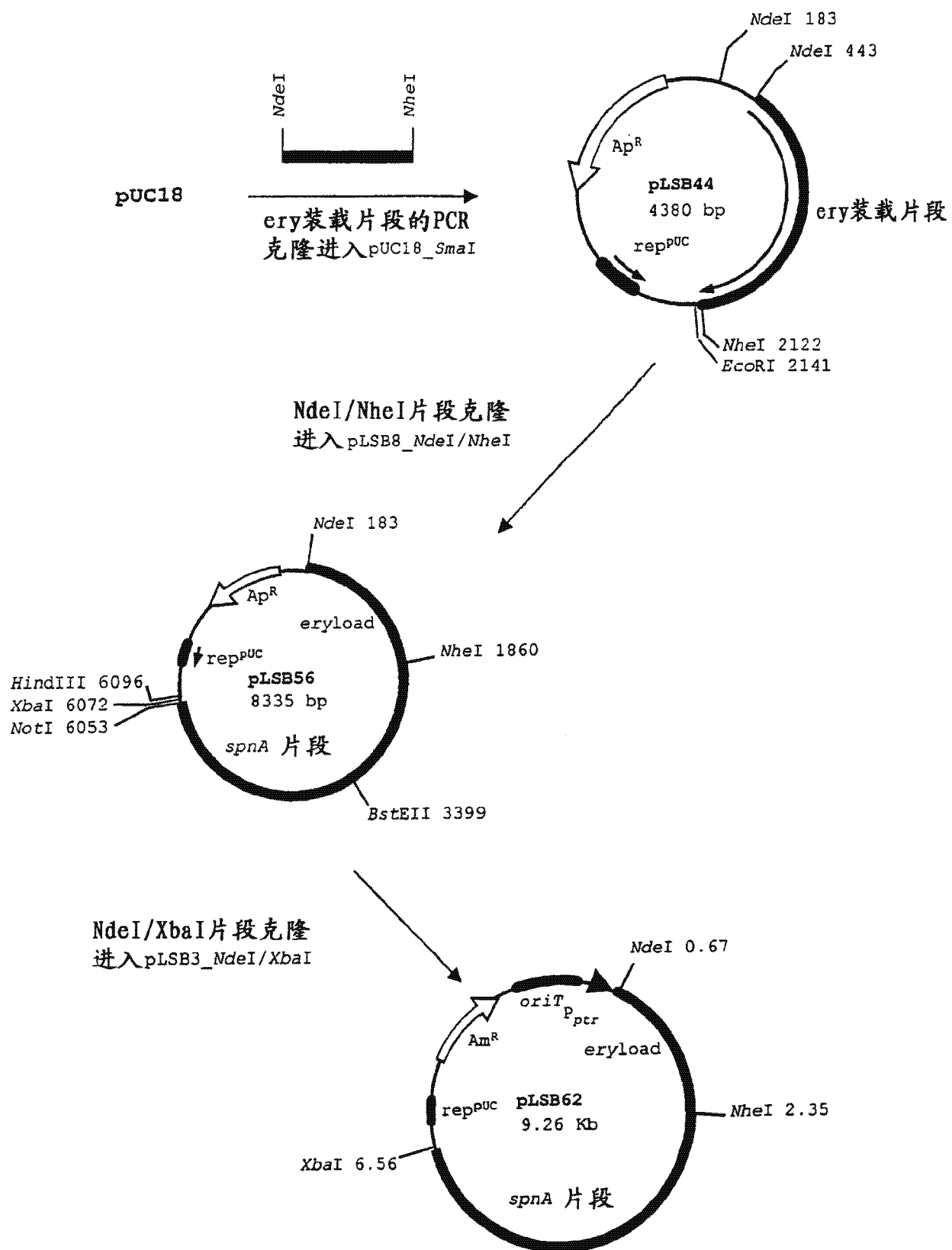


图 3

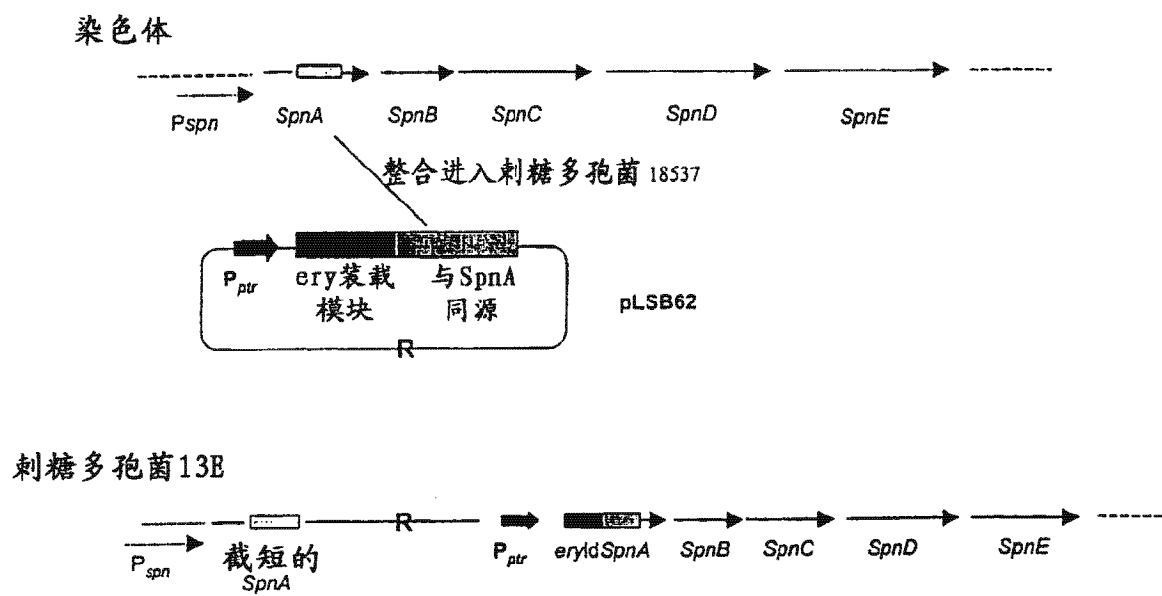


图 4

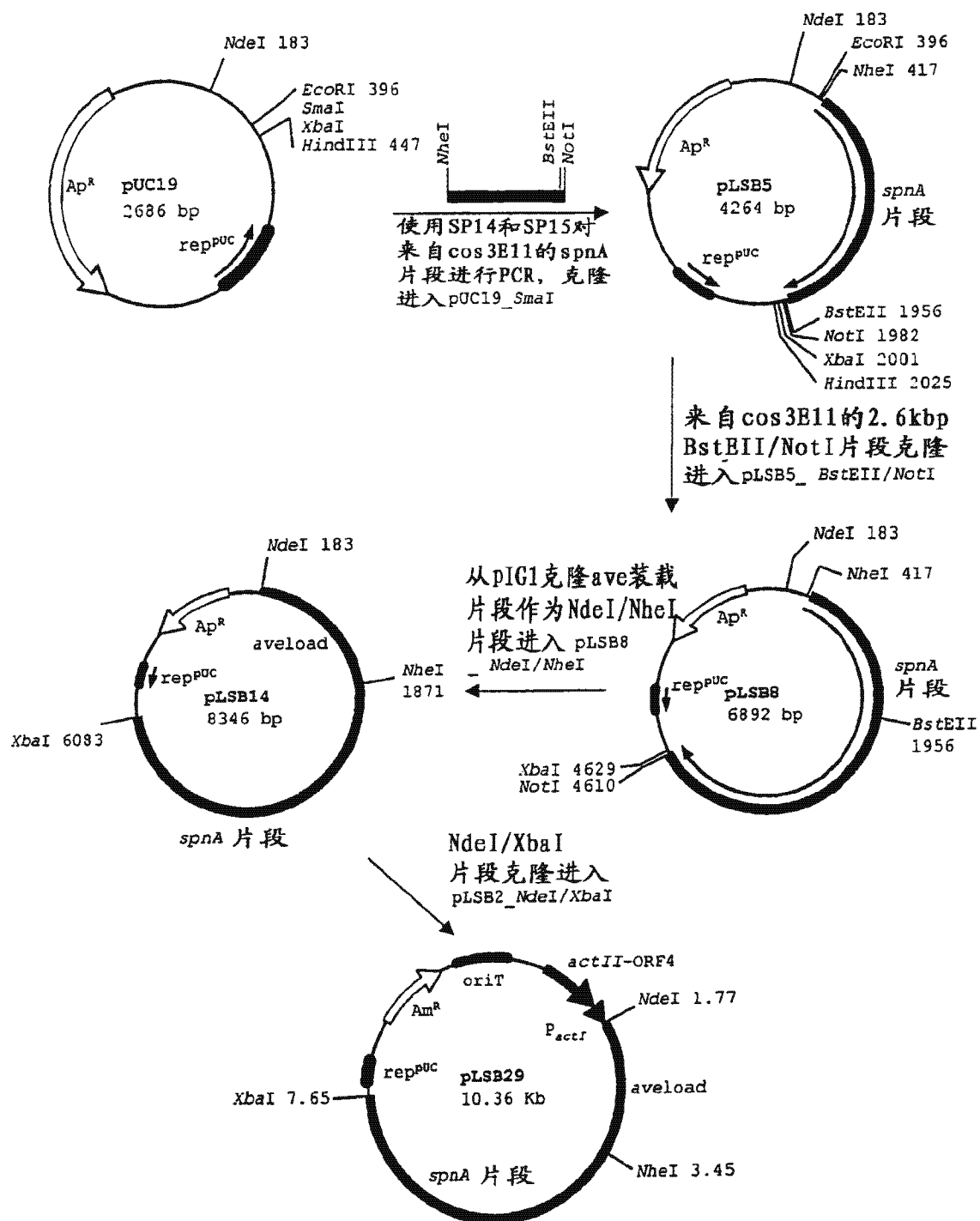


图 5

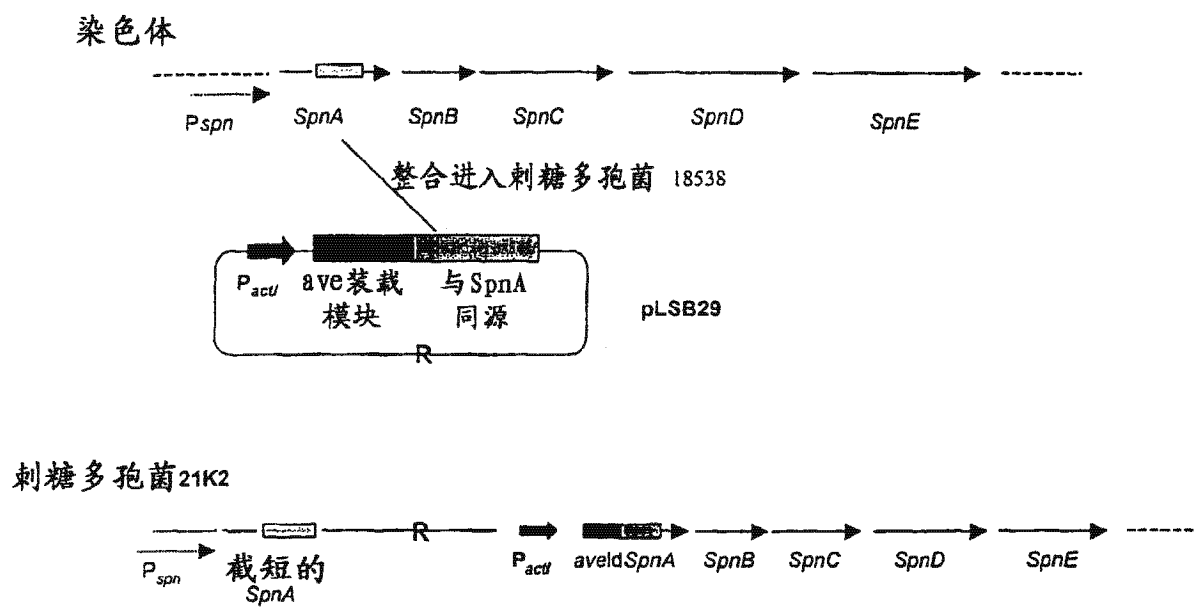


图 6

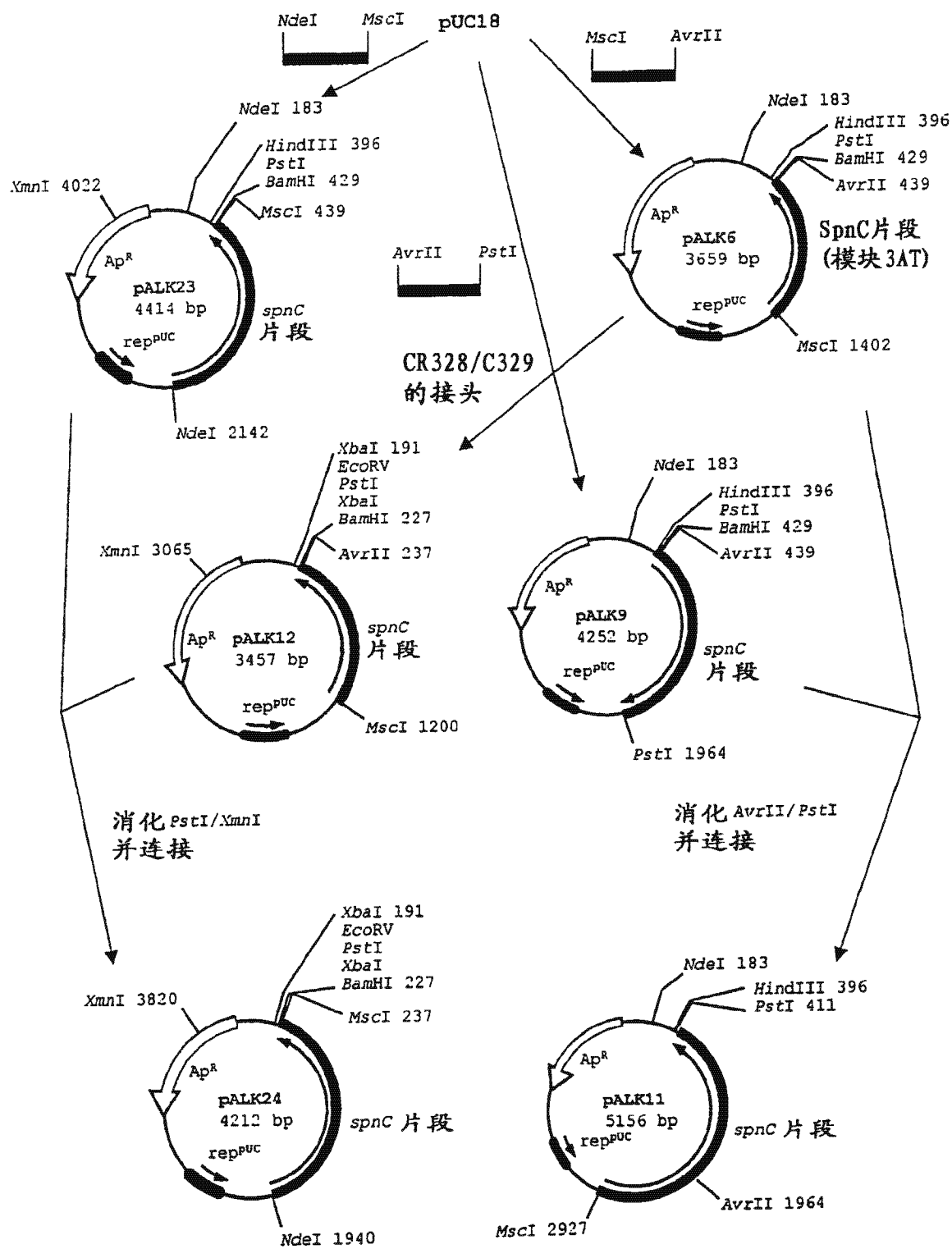


图 7a

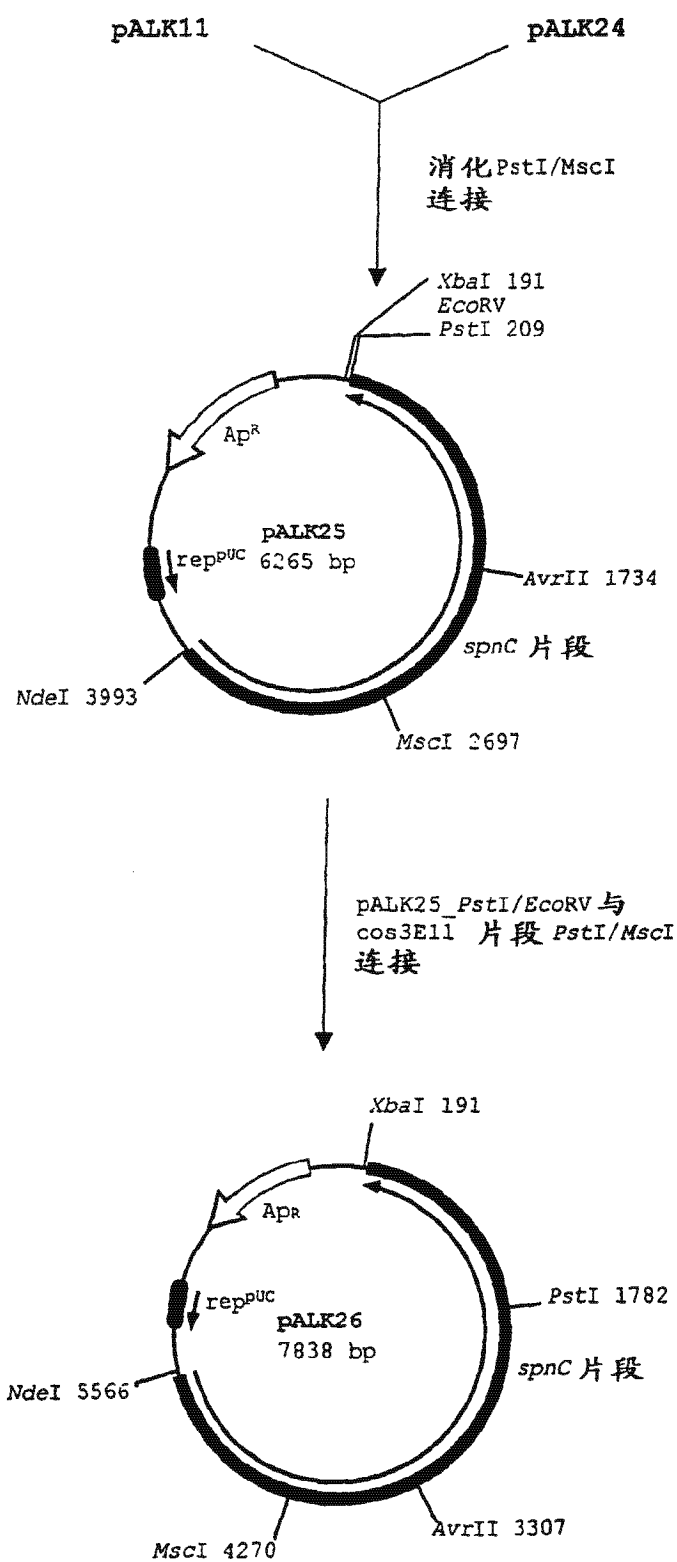


图 7b

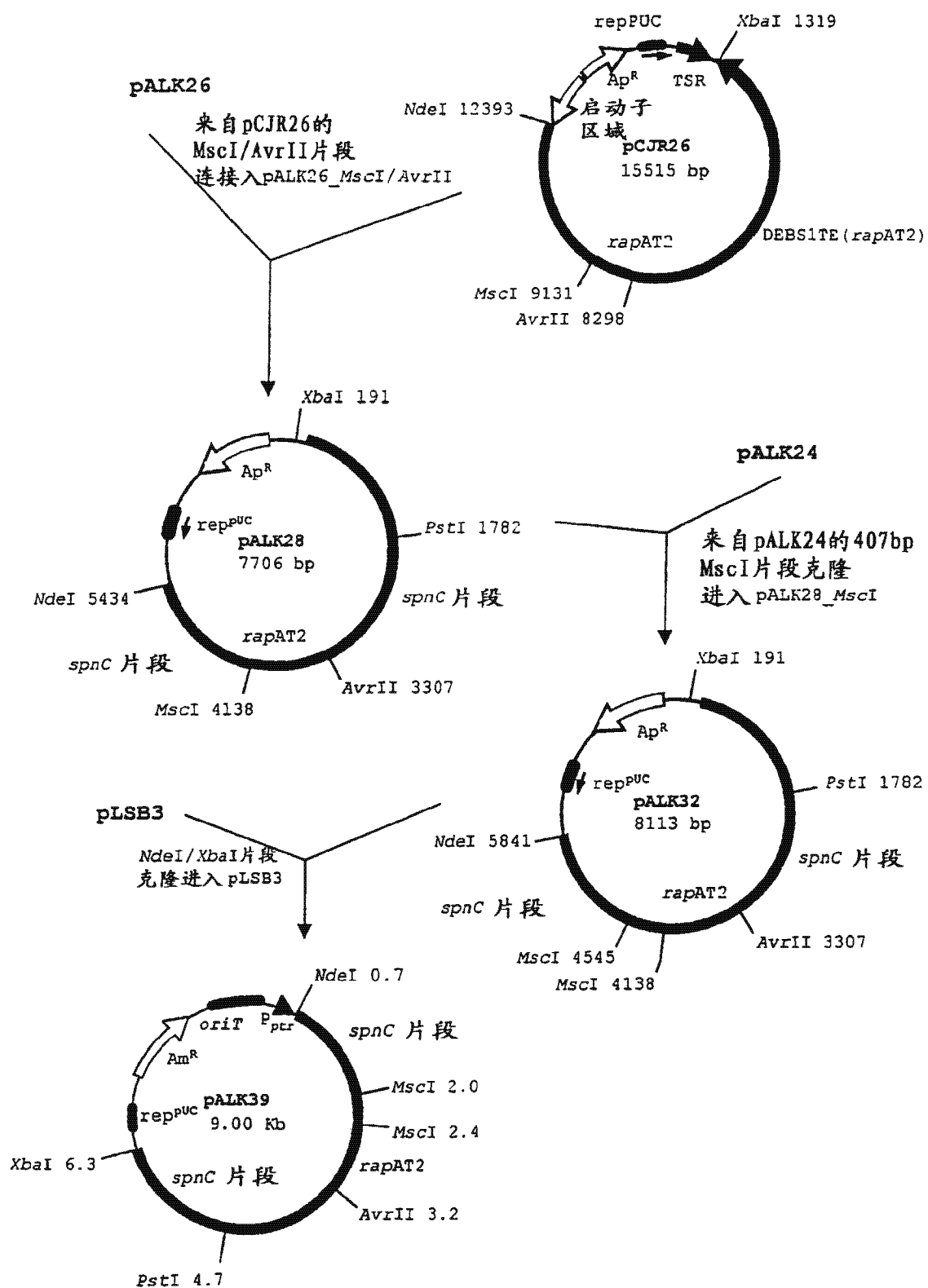


图 8

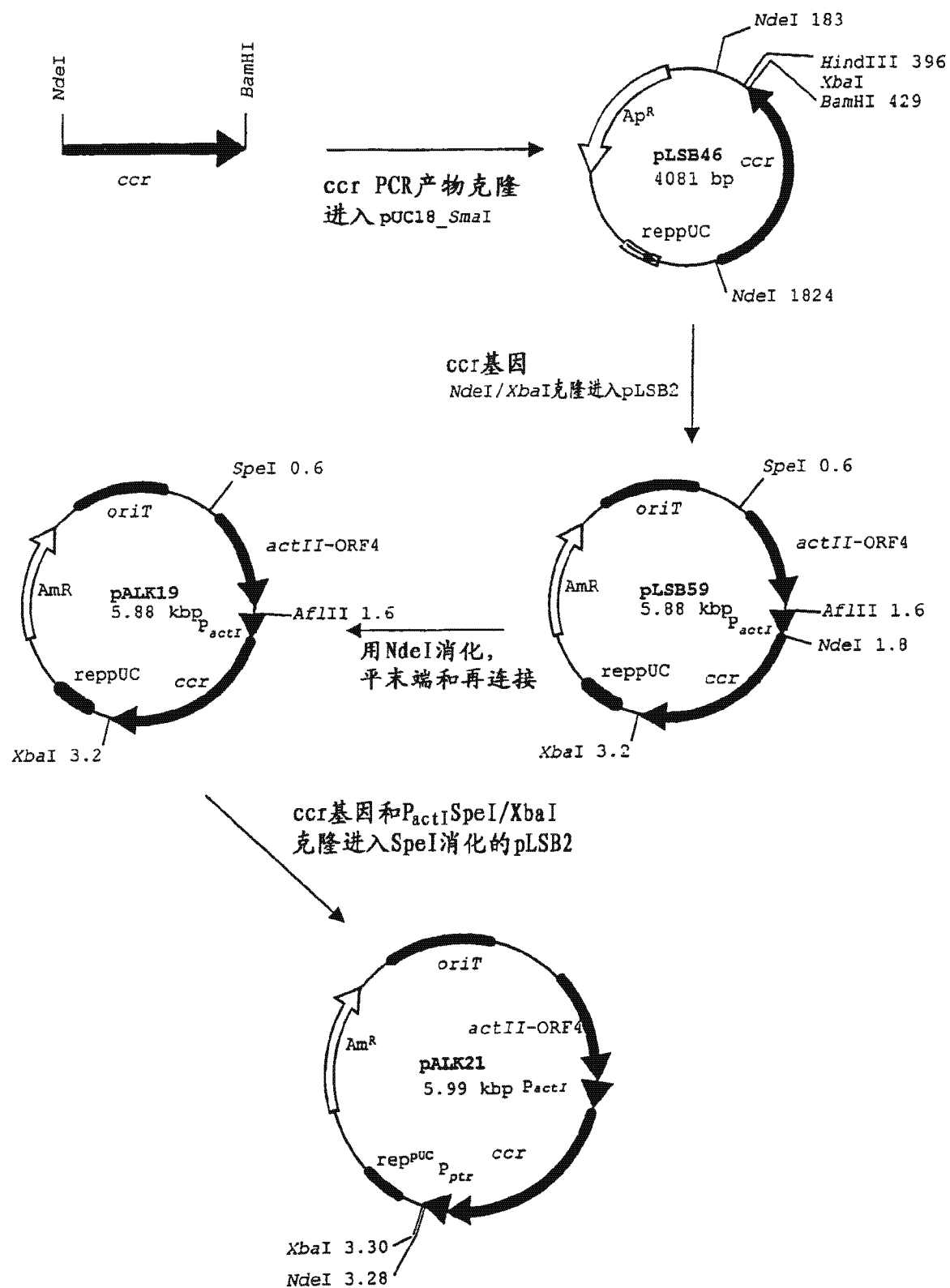


图 9

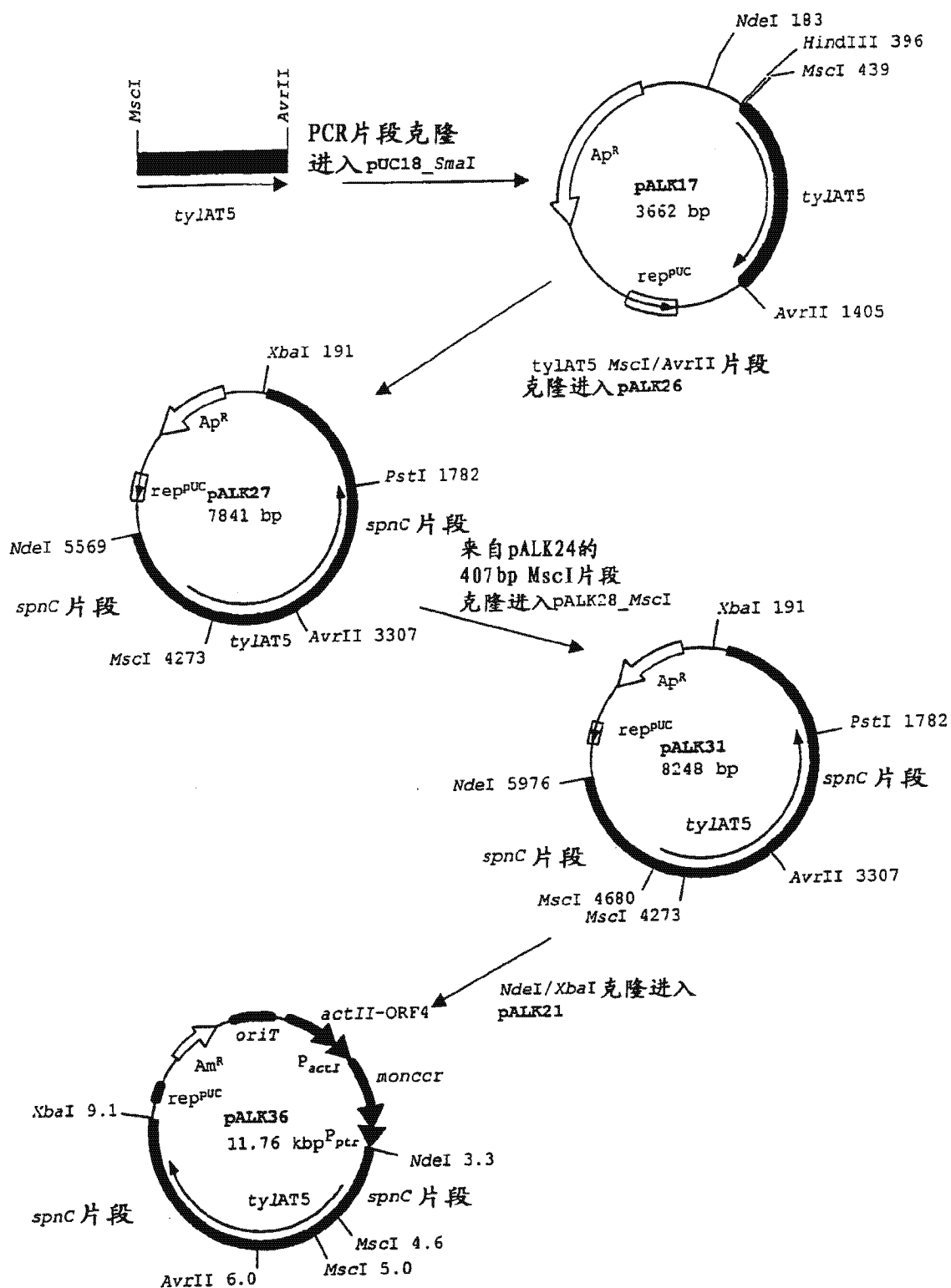


图 10

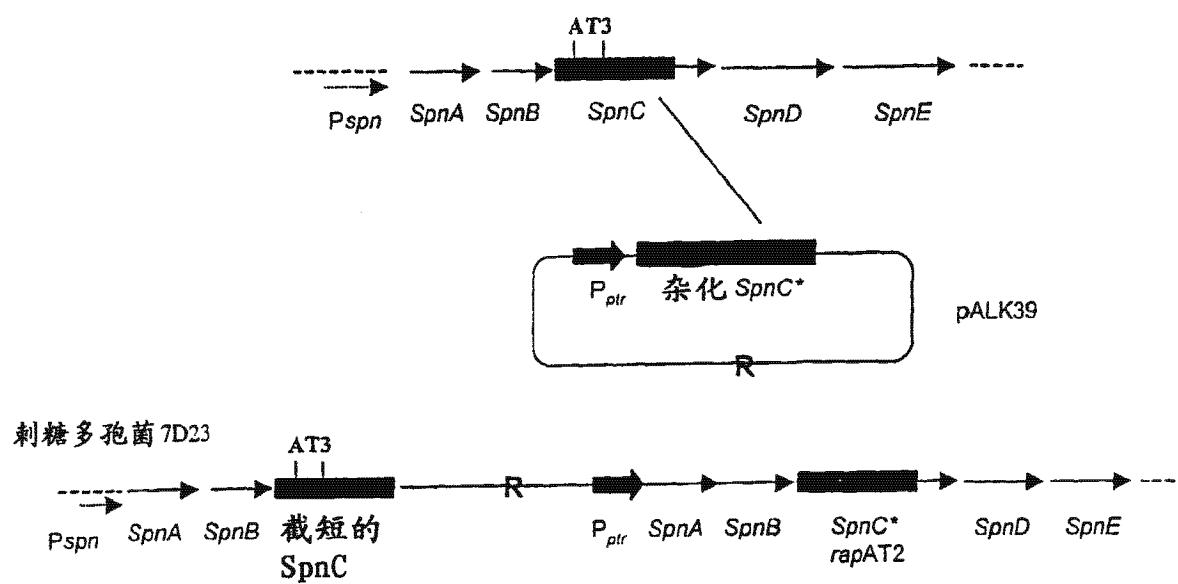


图 11

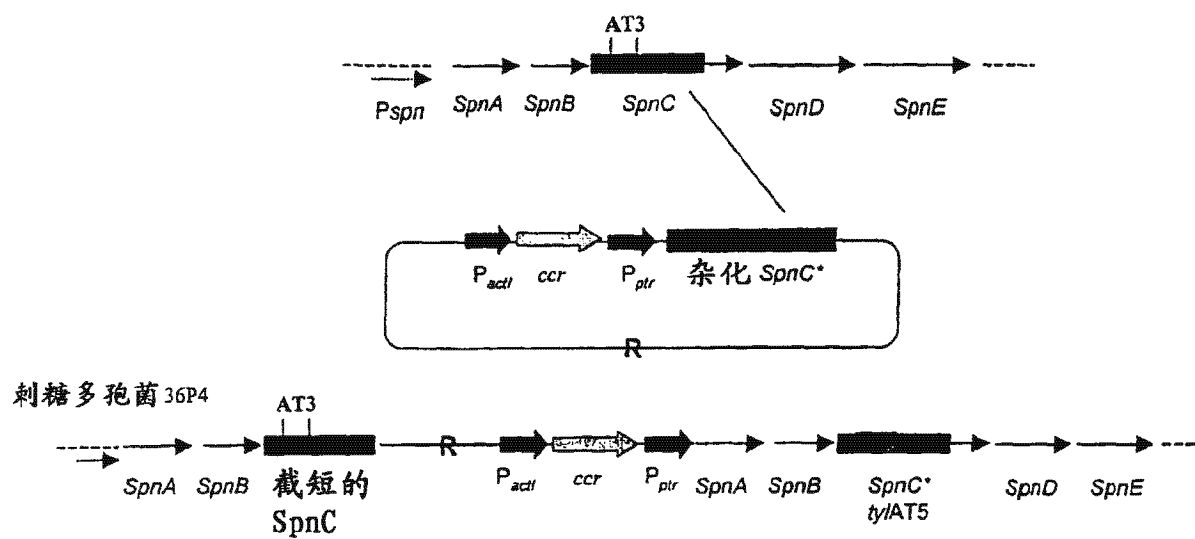


图 12