[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01808711.6

[51] Int. Cl.
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 17/16 (2006.01)
C12P 17/18 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 22 日

[11] 授权公告号 CN 100480389C

[51] Int. Cl. (续)
C07D 313/00 (2006.01)
C07D 413/06 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)
C07D 493/06 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

[22] 申请日 2001.4.26 [21] 申请号 01808711.6

[30] 优先权

[32] 2000. 4.28 [33] US [31] 09/560,367
[32] 2000. 9.14 [33] US [31] 60/232,696
[32] 2000.12.21 [33] US [31] 60/257,517
[32] 2001. 4. 3 [33] US [31] 09/825,856
[32] 2001. 4. 3 [33] US [31] 09/825,876
[32] 2001. 4.13 [33] US [31] 60/269,020

[86] 国际申请 PCT/US2001/013793 2001.4.26
[87] 国际公布 WO2001/083800 英 2001.11.8
[85] 进入国家阶段日期 2002.10.28
[73] 专利权人 科塞生物科学有限公司
地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 R·L·阿尔斯拉尼安 G·阿什利 S·弗吕克曼 B·朱利恩 L·卡茨 C·科斯拉 J·劳 P·J·利卡里 R·雷根廷 D·桑蒂 L·唐
审查员 吴汀晨
[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 1 页 说明书 177 页 附图 16 页

[54] 发明名称

聚酮化合物的制备

[57] 摘要

重组粘球菌属宿主细胞可用于产生聚酮化合物，所述聚酮化合物包括可从发酵肉汤纯化并结晶的埃坡霉素和埃坡霉素类似物。

1、从产生埃坡霉素 D 的黄色粘球菌细胞中分离埃坡霉素 D 的方法，所述方法包括:

(a) 在油酸甲酯的存在下培养所述细胞;

(b) 在 XAD 树脂存在下培养所述细胞;

(c) 从所述 XAD 树脂洗脱埃坡霉素 D，由此产生含埃坡霉素 D 的洗脱液; 和

(d) 在二相溶剂系统中对埃坡霉素 D 进行结晶，其中水为强制溶剂。

2、权利要求 1 的方法，其中二相溶剂系统为乙醇和水。

3、从产生埃坡霉素 D 的纤维堆囊菌或黄色粘球菌细胞中制备埃坡霉素 D 的方法，所述方法包括:

(a) 在 XAD 树脂存在下培养所述细胞;

(b) 从所述 XAD 树脂洗脱埃坡霉素，以获得分离的埃坡霉素 D;

(c) 对所述分离的埃坡霉素 D 进一步进行层析; 和

(d) 在二相溶剂系统中对埃坡霉素 D 进行结晶，其中水为强制溶剂。

4、权利要求 3 的方法，其中二相溶剂系统为乙醇和水。

5、获得结晶形式的埃坡霉素 D 的方法，包括在二相溶剂系统中对埃坡霉素 D 进行结晶，其中水为强制溶剂。

6、权利要求 5 的方法，其中二相溶剂系统为乙醇和水。

聚酮化合物的制备

发明领域

本发明提供了用于在重组宿主细胞内制备聚酮化合物的重组方法和材料；提供了产生聚酮化合物的重组宿主细胞；提供了结构与埃坡霉素类(epothilones)相关的新聚酮化合物；提供了用于纯化埃坡霉素类的方法；以及提供了埃坡霉素 D 的晶体形式。在一个优选的实施方案中，本发明的重组宿主细胞来自孢囊杆菌亚目（Suborder Cystobacterineae），优选地来自粘球菌属（粘球菌）和标桩菌属（Stigmatella），这些菌已用编码组件式（modular）或迭代式(iterative)聚酮化合物合酶（PKS）基因的本发明的重组 DNA 表达载体转化。重组宿主细胞产生包括但不限于埃坡霉素及埃坡霉素衍生物的已知和新聚酮化合物。本发明涉及农业、化学、药用化学、医学、分子生物学和药学领域。

发明背景

聚酮化合物构成了一类结构各异的化合物，它们至少部分是由以二碳单位为结构单元的化合物经一系列克莱森缩合和随后的修饰而合成。聚酮化合物包括抗生素（如四环素和红霉素）、抗癌剂（如埃坡霉素和道诺霉素）和免疫抑制剂（如 FK506、FK520 和雷帕霉素）。聚酮化合物在多种生物体中天然存在，其中所述生物体包括真菌和丝状细菌。在体内聚酮化合物经聚酮化合物合酶合成，这类酶通常被称为 PKS 酶。已知两种主要类型的 PKS，它们的结构和合成聚酮化合物的方式不同。这两类酶通常被称为 I 型或组件式 PKS 酶和 II 型或迭代式（芳香）PKS 酶。

本发明提供了用于产生组件式和迭代式 PKS 酶的方法、重组表达载体和宿主细胞，以及由这些酶产生的聚酮化合物。组件式 PKS 酶一般为多蛋

白复合体，其中每种蛋白质包含多个活性位点，每个位点在碳链装配和修饰过程中只用一次。迭代式 PKS 酶一般为多蛋白复合体，其中每种蛋白仅含有一个或最多两个活性位点，每个位点在碳链装配和修饰过程中多次使用。如下文更详细描述的那样，已克隆了大量的组件式和芳香 PKS 酶的基因。

组件式 PKS 基因由编码一个装载组件、若干延伸组件和一个释放结构域的编码序列组成。如下文更详细描述的那样，这些结构域和组件中的每一个结构域和组件都与一条具有一种或多种特定功能的多肽相对应。通常，装载组件负责与用于合成聚酮化合物的第一个结构单元结合，然后将其转移至第一个延伸组件。用于形成复杂聚酮化合物的结构单元一般为酰基硫酯类，最通常地为乙酰、丙酰、丙二酸单酰、甲基丙二酸单酰、羟基丙二酸单酰、甲氧基丙二酸单酰和乙基丙二酸单酰 CoA。其它结构单元包括氨基酸和氨基酸样酰基硫酯类。PKSs 在酰基硫酯结构单元之间通过反复的脱羧克莱森缩合而催化聚酮化合物的生物合成。每一组件负责与一个结构单元结合，在该结构单元上行使一种或多种功能，并将所得的化合物转移至下一组件。下一个组件接下来负责结合下一个结构单元，并将生长的化合物转移至下一个组件，直至合成结束。此时，通常是具有硫脂酶(TE)活性的释放结构域将聚酮化合物从 PKS 上切割下来。

被称为 6-脱氧赤酮酸环内酯（6-deoxyerythronolide; B6-dEB）的聚酮化合物由原型的组件式 PKS 合成。称为 eryAI、eryAII 和 eryAIII 的基因编码用以合成 6-dEB 的称为脱氧赤酮酸环内酯 B 合酶或 DEBS 的多亚单位蛋白质（每个亚单位称作 DEBS1、DEBS2 和 DEBS3），这些基因在美国专利号 5, 672, 491、5, 712, 146 和 5, 824, 513 中已有描述，它们在此引用作为参考文献。

DEBS PKS 的装载组件由一个酰基转移酶(AT) 和一个酰基载体蛋白(ACP)组成。DEBS 装载组件的 AT 识别丙酰 CoA(其它装载组件的 ATs 能识别其它酰基 CoAs，例如乙酰、丙二酸单酰、甲基丙二酸单酰或丁酰 CoA)，并将其作为硫酯转移至装载组件的 ACP。与此同时，DEBS 六个延

伸组件上的每个 ATs 识别甲基丙二酸单酰 CoA(其它延伸组件的 ATs 能够识别其它 CoA，例如丙二酸单酰或α-取代的丙二酸单酰 CoAs，即丙二酸单酰、乙基丙二酸单酰和 2-羟基丙二酸单酰 CoA)，并将其转移至该组件的 ACP 以形成硫酯。一旦 DEBS 上装填了丙酰和甲基丙二酸单酰-ACPs，运载组件的酰基基团就会移动，以在第一个延伸组件的 KS 处形成硫酯(酯交换)；在此阶段，组件 1 具有一个靠近甲基丙二酸单酰 ACP 的酰基-KS。来源于 DEBS 装载组件上的酰基基团然后在伴随的脱羧反应驱动下与延伸基团的α-碳共价结合形成碳－碳键，并产生主链比加载单位多出两个碳(延长或延伸)的酰基－ACP。生长的聚酮化合物链由 ACP 转移至 DEBS 的下一个组件的 KS，并且反应继续进行。

由 DEBS 的每一个组件增加两个碳而生长的聚酮化合物链以共价结合的硫酯形式顺序地从一个组件至另一个组件以流水线样的方式传递。仅通过这种方法产生的碳链在每隔一个碳原子上拥有一个酮，形成了一种聚酮，聚酮化合物的名字由此而来。但一般而言，在已添加了二碳单元的聚酮化合物链转移至下一组件前，由其它的酶活性修饰该聚酮化合物链的β酮基。这样，除了含有形成碳－碳键所必须的 KS、AT 和 ACP 的最小组件外，组件还可含有一个使β酮基还原成醇的酮还原酶(KR)。组件也可含有一个 KR 外加一个使醇脱水形成双键的脱水酶(DH)。组件也可含有一个 KR、一个 DH 和一个用β碳原子行使亚甲基功能以使双键转化为饱和单键的烯酰还原酶(ER)。DEBS 组件包括那些仅有一个 KR 结构域、仅有一个失活 KR 结构域以及含全部三个 KR、DH 和 ER 结构域的组件。

一旦聚酮化合物链经过 PKS 的最后一个组件，它将遇到释放结构域，该结构域一般为硫酯酶，存在于大多数组件式 PKS 酶的羧基端。在此，聚酮化合物从酶上被切割下来，并且许多(但并非全部的)聚酮化合物被环化。聚酮化合物可被修整酶或修饰酶进一步修饰；这些酶在聚酮化合物的核心分子和／或其取代基上加上糖类基团或甲基基团，或进行如氧化、还原反应的其它修饰。例如，6-dEB 为羟基化和糖基化的，其中的一个糖基取代基被甲基化后，就在天然产生抗生素红霉素 A 的 Saccharopolyspora

erythraea 细胞中形成了人们熟知的该抗生素。

虽然以上描述通常适用于组件式 PKS 酶，且特别适用于 DEBS，自然界存在许多变异。例如，许多 PKS 酶包含的装载组件与 DEBS 的装载组件不同，前者含一个具有脱羧酶功能的“失活”KS 结构域。多数情况下，该失活的 KS 被称为 KS^Q，其中上标 Q 是谷氨酰胺的单字母缩写，表示酮合酶活性所必需的半胱氨酸活性位点的取代。埃坡霉素 PKS 的装载组件含一个半胱氨酸活性位点被酪氨酸取代的 KS^Y 结构域。此外，其它聚酮化合物的合成起始于与 DEBS 或埃坡霉素装载组件所结合的起始单位不同的起始单位。与这些起始单位结合的酶例如可包括诸如用于 FK520、FK506 和雷帕霉素生物合成的 AMP 连接酶、诸如用于 leinamycin 生物合成中的非核糖体肽合酶 (NRPS)或可溶性 CoA 连接酶。

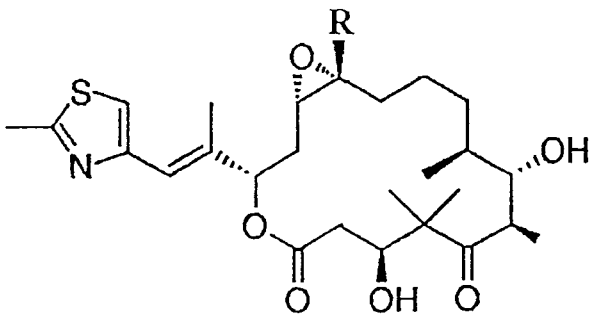
PKS 酶中的其它重要变异涉及作为延伸单元掺入的结构单元的类型。关于起始单元，一些 PKS 酶用一个或多个 NRPS 组件作为延伸组件来掺入氨基酸样酰基硫酯结构单元。埃坡霉素 PKS 例如包含一个 NRPS 组件。另一此类变异发现存在于 FK506、FK520 和雷帕霉素的 PKS 酶中，它们含有一个掺入 2-哌啶酸基(pipecolate)并也可用作 PKS 释放结构域的 NRPS。而另一变异涉及到延伸组件的其它活性。例如，埃坡霉素 PKS 的一个组件含甲基转移酶(MT) 结构域，该结构域向聚酮化合物中掺入一个甲基基团。

操作组件式和迭代式 PKS 基因的重组方法在美国专利号 5, 962, 290、5,672, 491、5,712,146、5,830,750 和 5,843,718 以及在 PCT 专利公开号 98/49315 和 97/02358 中已有描述，它们在此引用作为参考。这些和其它专利描述了异源产生聚酮化合物的重组表达载体以及组合产生新聚酮化合物的两种或多种不同 PKS 基因或基因簇的部分而装配的重组 PKS 基因。目前，此类方法已用来在生物体中产生已知或新聚酮化合物，所述生物体例如可天然产生聚酮化合物的链霉菌（Streptomyces）及不天然产生聚酮化合物的大肠杆菌（E. coli）和酵母(见美国专利号 6, 033, 883，在此引用作为参考)。在后两种宿主中，聚酮化合物的产生依赖于磷酸泛酰巯基乙胺转

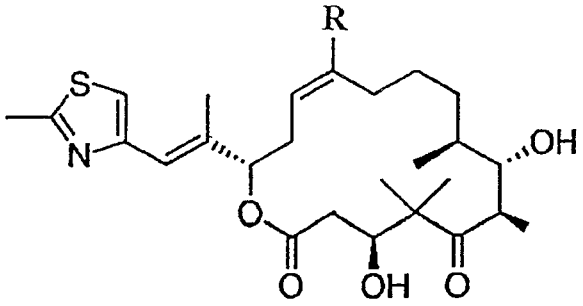
移酶的异源表达，该酶激活 PKS 的 ACP 结构域 (见 PCT 公开号 97/13845，在此引用作为参考)。

尽管这些方法重要且非常有用，但某些聚酮化合物在所用的异源宿主细胞中仅以非常低的水平表达，或者对所用的异源宿主细胞具有毒性。举一个例子，抗癌剂埃坡霉素 A、B、C 和 D 通过埃坡霉素 PKS 基因的异源表达而得以在链霉菌中产生(Tang 等，2000 年 1 月 28 日，埃坡霉素基因簇的克隆和异源表达，科学（Science），287：640-642，以及 PCT 公开号号 00/031247，它们在此引用作为参考)。埃坡霉素 A 和 B 的产量低于约 50－100 μg/L，并且似乎对生产细胞产生了毒性效应。

埃坡霉素 A 和 B 首先被鉴定为具有抗真菌活性，它们提取自粘球菌的纤维堆囊菌（Sorangium cellulosum）(见 Gerth 等，1996，抗生素杂志(J. Antibiotics) 49：560-563 和德国专利号 DE 4138 042，它们在此引用作为参考)，随后在微管蛋白聚合试验中发现具有活性(见 Bollag 等，1995，癌研究（Cancer Res）55：2325-2333，在此引用作为参考)。埃坡霉素 A 、B 和某些天然存在的和合成的衍生物从此作为癌症治疗中潜在的抗肿瘤剂被广泛研究。由纤维堆囊菌菌株 So ce 90 产生的埃坡霉素的化学结构已被描述，见文献：Hofle 等，1996，埃坡霉素 A 和 B—具有细胞毒性的新 16 元大环内酯：分离、晶体结构和溶液构象，Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (13/14)：1567-1569，在此引用作为参考。埃坡霉素 A (R = H) 和 B (R = CH_3)具有如下所示的结构，并显示广谱的抗真核细胞的细胞毒活性，以及对乳腺癌和结肠癌细胞系有明显的活性和选择性。



埃坡霉素 A 和 B 的脱氧对应物，也被称为埃坡霉素 C (R = H) 和 D (R = CH_3)，已从头化学合成，但它们在纤维堆囊菌（S. cellulosum）的发酵中也作为次要产物存在。埃坡霉素 C 和 D 的细胞毒性要低于埃坡霉素 A 和 B ；它们的结构为如下所示。



已描述了其它天然存在的埃坡霉素。它们包括埃坡霉素 E 和 F 以及许多其它埃坡霉素化合物（见 PCT 公开号 99/65913，在此引用作为参考），其中埃坡霉素 A 和 B 的噻唑部分的甲基侧链已分别被羟基化，以产生埃坡霉素 E 和 F。

由于埃坡霉素潜在的作为抗癌剂的用途，且由于天然的 So ce 90 菌株低水平产生埃坡霉素，许多研究小组致力于合成埃坡霉素的研究。如前所述，这种尝试已获成功(见 Balog 等, 1996, (-)-埃坡霉素 A 的全合成, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35 (23/24) : 2801-2803 ; Su 等, 1997, (-)-埃坡霉素 B 的全合成：铃木偶合法的扩展以及对埃坡霉素结构－活性关系的了解, Angew. Chem.Int. Ed. Engl. 36 (7) : 757-759 ; Meng 等, 1997, 埃坡霉素 A 和 B 的全合成, JACS 119 (42) : 10073-10092 ; 以及 Balog 等, 1998, 与 2－甲基－4－戊烯醛的一种新羟醇缩合以及其在改进的埃坡霉素 B 全合成中的应用, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 37 (19) : 2675-2678，它们在此引用作为参考)。尽管这些尝试获得成功，但埃坡霉素的化学合成是费力、费时而且昂贵的。实际上，认为这些方法对于用作抗癌剂的任何埃坡霉素的大规模药物研制都是不切实际的。

已在体内和体外对一些埃坡霉素衍生物以及埃坡霉素 A-D 进行了研究(见 Su 等, 1997, 埃坡霉素的结构－活性关系研究以及与紫杉醇的首次体

内比较, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 36 (19) : 2093-2096 ;和 Chou 等, 1998 年 8 月, 脱氧埃坡霉素 B :一种与埃坡霉素 B 有关的、具有所期望体内特性的有效的微管靶向的抗肿瘤剂, 美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 95 : 9642-9647, 它们于此处引用作为参考)。其它的埃坡霉素衍生物以及合成埃坡霉素类和埃坡霉素衍生物的方法在 PCT 公开号 00/23452、00/00485、99/67253、99/67252、99/65913、99/54330、99/54319、99/54318、99/43653、99/43320、99/42602、99/40047、99/27890、99/07692、99/02514、99/01124、98/25929、98/22461、98/08849 和 97/19086 ; 美国专利号 5, 969, 145 和德国专利公开号 DE 4138 042 中已有描述, 它们在此引用作为参考。

仍需要用实用的方法来产生不仅是天然存在的埃坡霉素类, 而且还有它们的衍生物或前体, 以及具有改进特性的新埃坡霉素衍生物。仍需要较天然生成者纤维堆囊菌更易操作和发酵的、产生埃坡霉素类或其衍生物的宿主细胞, 并且所述宿主细胞产生更多的所需聚酮化合物产物。本发明通过提供高水平产生聚酮化合物的宿主细胞满足这些要求, 且所述宿主细胞不仅用于产生埃坡霉素类 (包括本文描述的新埃坡霉素衍生物) 而且用于产生其它聚酮化合物。

发明概述

在一个实施方案中, 本发明提供了孢囊杆菌亚目的重组宿主细胞, 其中所述重组宿主细胞包含编码异源 PKS 基因的重组表达载体, 并产生由这些载体上的基因编码的 PKS 酶所合成的聚酮化合物。在一个优选的实施方案中, 宿主细胞来自粘球菌属或标桩菌属。在特别优选的实施方案中, 宿主细胞选自叶柄粘球菌 (M. stipitatus)、橙色粘球菌 (M. fulvus)、黄色粘球菌 (M. xanthus)、变绿粘球菌 (M. virescens)、直立标桩菌 (S. erecta) 和橙色标桩囊菌 (S. aurantiaca)。

在另一个实施方案中, 本发明提供了可在本发明的宿主细胞内进行染色体整合或染色体外复制的重组 DNA 载体。本发明的载体至少包含部分 PKS 编码序列, 并可在本发明的宿主细胞中指导功能 PKS 酶的表达。在

一个相关的实施方案中，本发明提供了以下的载体和宿主细胞，其中包含产生用于聚酮化合物生物合成的底物所需的基因及基因产物，所述底物在本发明的宿主细胞不产生或以低丰度产生。在一个实施方案中，基因及基因产物催化乙基丙二酸单酰 CoA 的合成。在另一个实施方案中，基因及基因产物催化丁酰 CoA 的合成。

在另外的实施方案中，本发明提供了在孢囊杆菌亚目的宿主细胞中产生聚酮化合物的方法，该聚酮化合物在所述宿主细胞中不能天然产生，所述方法包括转染了重组 DNA 载体的宿主细胞在一定条件下的培养，这样载体上编码的 PKS 基因得以表达并产生该聚酮化合物。在一相关的实施方案中，本发明提供了发酵本发明的导致聚酮化合物以高产量产生的宿主细胞的方法。

在一个优选的实施方案中，本发明的重组宿主细胞产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物。这样，本发明提供了产生所需埃坡霉素或埃坡霉素衍生物的重组宿主细胞。在一个优选的实施方案中，宿主细胞以等于或大于 10 mg/L 的量产生一种或多种埃坡霉素。在一个实施方案中，本发明提供了这样的宿主细胞，其产生一种或几种埃坡霉素的水平高于天然存在的产生埃坡霉素的生物体所产生的水平。在另一实施方案中，本发明提供了产生埃坡霉素类混合物的宿主细胞，其中所述混合物较天然存在的宿主细胞所产生的埃坡霉素类混合物的复杂性要低。本发明的重组宿主细胞也包括仅产生以一种所需埃坡霉素或埃坡霉素衍生物作为主要产物的宿主细胞。

在一个相关的优选实施方案中，本发明提供了编码全部或部分埃坡霉素 PKS 的重组 DNA 表达载体。这样，本发明提供了在本发明的宿主细胞中编码产生埃坡霉素 A、B、C 和 D 所需的蛋白质的重组 DNA 表达载体。本发明还提供了编码这些蛋白质的一部分的重组 DNA 表达载体。本发明也提供了编码杂合蛋白质的重组 DNA 化合物，该杂合蛋白质包括参与埃坡霉素生物合成的一种蛋白质的全部或一部分和参与另一种聚酮化合物或非核糖体来源肽生物合成的一种蛋白质的全部或一部分。

在另一实施方案中，本发明以相当纯的形式提供了用于农业、兽医和

医学的新埃坡霉素衍生物化合物。这些化合物包括埃坡霉素 A、B、C 和 D 的 16-去甲基、14－甲基、13－氧代、13－氧代－11，12－脱氢、12－乙基、13－羟基－10，11－脱氢、11－氧代、11－羟基、10－甲基、10,11－脱氢、9－氧代、9－羟基、8-去甲基、6-去甲基和 2-甲基类似物，以及天然存在的埃坡霉素类的甲基噻唑部分被替换为其它部分的一系列类似物。在一个实施方案中，化合物被用作杀真菌剂。在另一实施方案中，化合物在癌症化学治疗中用作抗癌剂。在一个优选的实施方案中，化合物是一种埃坡霉素衍生物，其在抗肿瘤细胞方面至少象埃坡霉素 B 或 D 一样有效。在另一实施方案中，化合物用作免疫抑制剂。在另一实施方案中，化合物用于制备另一化合物。在一个优选的实施方案中，化合物以混合物或溶液方式制剂，用来施与人或动物。

在另一实施方案中，本发明提供了纯化埃坡霉素的方法。在一个优选的实施方案中，埃坡霉素被从发酵培养基中纯化。

在另一实施方案中，本发明提供了高纯度形式的埃坡霉素化合物。在一个优选的实施方案中，埃坡霉素的纯度高于 95%。在一个更为优选的实施方案中，埃坡霉素的纯度高于 99%。在一个特别优选的实施方案中，本发明提供了晶体形式的埃坡霉素。在一个特别优选的实施方案中，本发明提供了结晶的埃坡霉素 D。

在另一实施方案中，本发明提供了治疗癌症的方法，该方法包括施用治疗有效量的本发明的新埃坡霉素化合物。本发明的化合物和组合物也用于治疗其它过度增生性疾病和病症，它们包括但不限于银屑病和炎症。

本发明的这些和其它实施方案在以下的描述、实施例和权利要求中将有更为详细的描述。

附图简述

图 1 显示了 N-乙酰基半胱胺硫酯衍生物的一系列前体化合物，这些化合物可被提供给 NRPS-样组件 1 或组件 2 的 KS 结构域已被失活的本发明的埃坡霉素 PKS，以产生新的埃坡霉素衍生物。还示出了产生此类化合物

的通用合成步骤。

图 2 显示的是质粒 pKOS35-82.1 和 pKOS35-82.2 的限制性位点和功能图谱。

图 3 显示的是质粒 pKOS35-154 和 pKOS90-22 的限制性位点和功能图谱。

图 4 显示了如实施例 2 中描述的将埃坡霉素 PKS 和修饰酶基因导入黄色粘球菌宿主细胞染色体的方法示意图。

图 5 示出了在实施例 2 中描述的 pBeloBACII 的图谱。

图 6 显示了在仅含 5 g/L 酪胨(一种胰的酪蛋白消化物)和 2 g/L 硫酸镁的简单生产培养基中的黄色粘球菌 K111-40-1 株的基线特性。图例：分批法中，在基本 CTS 培养基中的生长(●)、产量(■)和氨产生(▲)曲线；培养条件如在实施例 3 的材料和方法中所描述。

图 7 显示了 XAD-16 树脂对黄色粘球菌 K111-40-1 株在 CTS 生产培养基中的发酵特性的影响。图例：在分批法中将 20 g/L XAD-16 树脂加入到 CTS 生产培养基中的生长(●)和产量(■)曲线。

图 8 显示的是酪胨对生长和产物产量的影响。图例：酪胨浓度对生长(●)、产量(■)和比生产率(▲)的影响。

图 9 显示了痕量元素和较高的油酸甲酯浓度对生长和产物产量的影响。图例：油酸甲酯（●）和痕量元素(■)对产量的影响。

图 10A 示出了在分批发酵法中黄色粘球菌菌株在最佳浓度的油酸甲酯和痕量元素存在下的生长和产量。接种后的头两天发生了指数级生长。埃坡霉素 D 的产生始于稳定期的开始，并在第 5 天油酸甲酯耗尽、细胞裂解时停止。图 10B 示出了在分批发酵法中当存在最佳浓度的油酸甲酯和痕量元素时，黄色粘球菌菌株的生长和产生期间，对应于油酸甲酯的消耗和氨生成的时程。图例：A.)分批法中在 CTS 生产培养基中加入最佳浓度的油酸甲酯(7 mL/L)和痕量元素(4 mL/L)的生长(●)和产量(■)曲线。 B.)对应于油酸甲酯的消耗(●)和氨生成(■)的时程。

图 11A 示出了间歇补料分批法对黄色粘球菌菌株的生长和产量的影

响。图例：在摇瓶中，间歇补料分批法的生长(●)和产量(■)曲线。酪胨和油酸甲酯的补料速率分别为 2 g/L/天和 3 mL/L/天。图 11 B 示出了在发酵过程中油酸甲酯的恒定消耗速率和氨的恒定生成速率。图例：对应于加入到培养基中的油酸甲酯的总添加量(●)、油酸甲酯的总消耗量(■)和氨生成(▲)的时程。

图 12 示出了在 5-L 的生物反应器中，间歇补料分批法的生产曲线。酪胨和油酸甲酯的补料速率分别为 2 g/L/天和 3 mL/L/天。

图 13A 显示了连续补料对生长和产量的影响。图例:在 5-L 生物反应器中，连续补料分批法的生长(●)和产量（■）曲线。酪胨和油酸甲酯的补料速率分别为 2 g/L/天和 3 mL/L/天。图 13B 显示了在连续补料分批法中油酸甲酯的加入、消耗和氨生成的时程。图例：对应于加入到培养基中的油酸甲酯的总添加量(●)、油酸甲酯的总消耗量(■)和氨生成(▲)的时程；培养条件如在材料和方法中所描述的。

发明详述

有关本发明范围的陈述和此处所用术语的定义列出如下。这些定义适用于本说明书中单独用到的或作为一个较大组的一部分用到的术语，除非限定在某一特定的情况下。

本发明化合物的所有立体异构体，不管是纯化合物还是它的混合物，均包括在本发明的范围之内。单个的对映异构体、非对映立体异构体、几何异构体，以及它们的组合和混合物均包含在本发明中。此外，化合物的一些晶体形式可以多晶型物存在，且它们同样包括在本发明中。另外，一些化合物可以与水或普通有机溶剂形成溶剂合物 (例如与水形成水合物) ，此类溶剂合物也包括在本发明的范围内。

所发明化合物的被保护形式包括在本发明的范围内。大量的保护基已经公开，例如见 T. H. Greene 和 P. G. M. Wuts, 有机合成中的保护基（Protective Groups in Organic Synthesis），第三版，John Wiley & Sons，纽约 (1999)，在此全部并入作为参考。例如，本发明化合物的羟基被保护

形式为其羟基中至少有一个被羟基保护基保护的形式。羟基保护基的示例包括但并不仅限于四氢吡喃基；苯甲基；甲硫基甲基；乙硫基甲基；三甲基乙酰；苯磺酰基；三苯甲基；三取代甲硅烷基，例如三甲代甲硅烷基、三乙基甲硅烷基、三丁基甲硅烷基、三异丙基甲硅烷基、叔丁基二甲基甲硅烷基、三叔丁基甲硅烷基、甲基二苯基甲硅烷基、乙基二苯基甲硅烷基、叔丁基二苯基甲硅烷基等；酰基和芳酰基，例如乙酰基、三甲基乙酰苯甲酰基、4－甲氧苯甲酰基、4－硝基苯甲酰基和脂族酰芳基等。本发明化合物中的酮基基团可同样地被保护。

本发明化合物的前体药物也包括在本发明范围之内。一般而言，这些前体药物是化合物的功能衍生物，在体内易于转化为所需的化合物。这样在本发明的治疗方法中，术语“施用”包含用明确公开的化合物或用可能未明确公开的化合物对多种所述疾病的治疗，其中所述未明确公开的公合物在施用于需要此类治疗的受试者后，在体内转化为所说明的化合物。例如在“前体药物的设计”（“Design of Prodrugs”） H. Bundgaard 编辑，Elsevier，1985 一书中描述了筛选和制备适宜前体药物衍生物的常规方法。

此处所用术语“脂族”是指可在一个或多个位置处任意取代的饱和和不饱和的直链、支链、环状或多环烃。脂族基的示例包括烷基、链烯基、炔基、环烷基、环链烯基和环炔基部分。术语“烷基”是指直链或支链饱和烃取代基。“链烯基”是指具有至少一个碳－碳双键的直链或支链烃取代基。“炔基”是指具有至少一个碳－碳三键的直链或支链烃取代基。

术语“芳基”是指具有至少一个芳香环结构的单环或多环基团，其中所述芳香环结构任选地含有一个或多个杂原子，且优选地包括 3 到 14 个碳原子。芳基取代基可任选地在一个或多个位置进行取代。芳基的示例包括但不仅限于：呋喃基、咪唑基、2,3-二氢化茚基、茚基、吲哚基、异噁唑基、异喹啉基、萘基、噁唑基、噁二唑基、苯基、吡嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、吡唑基、喹啉基、喹握啉基、四氢萘基、四唑基、噻唑基、噻吩基、苯硫基等。

脂族（即烷基、链烯基等）和芳族部分可任选地用一个或多个取代基

取代，取代基优选地为 1 个到 5 个，更为优选地为 1 个到 3 个，最为优选地为 1 个到 2 个取代基。对分子内某特定部位的任一取代基或变量的定义不受该分子内其它部位处对其定义的限制。应当理解可以用一种本领域中常用技术选择本发明化合物的取代基和取代方式，以提供化学稳定的、且可用本领域公知技术及在此所示的方法易于合成的化合物。合适取代基的实例包括但不限于：烷基、链烯基、炔基、芳基、卤素；三氟甲基；三氟甲氧基；羟基；烷氧基；环烷氧基；杂环氧基；氧代；烷酰基(-C (=O)-烷基也被称为“酰基”))；芳氧基；烷酰氧基；氨基；烷基氨基；芳基氨基；芳烷基氨基；环烷基氨基；杂环氨基；双取代胺，其中两个氨基取代基选自烷基、芳基或芳烷基；烷酰基氨基；芳酰基氨基；芳烷酰基氨基；取代烷酰基氨基；取代芳基氨基；取代芳烷酰基氨基；硫醇；烷硫基；芳硫基；芳烷硫基；环烷硫基；杂环硫基；烷基硫羰；芳基硫羰；芳烷基硫羰；烷基磺酰基；芳基磺酰基；芳烷基磺酰基；磺酰氨基 (如 SO_2NH_2)；取代磺酰氨基；硝基；氰基；羧基；氨甲酰基(如 $CONH_2$)；取代氨甲酰基(例如-C(=O) NRR'，其中 R 和 R'每一个为独立的氢、烷基、芳基、芳烷基等)；烷氧羰基、芳基、取代芳基、胍基以及杂环，例如吲哚基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噻唑基、吡咯烷基、吡啶基、嘧啶基等。根据需要，取代基可进一步被诸如烷基、烷氧基、芳基、芳烷基、卤素、羟基等取代。

术语“烷基芳基”或“芳基烷基”是指带有脂族取代基的芳基，其通过脂族基结合到化合物上。烷基芳基或芳基烷基的示例是苯甲基，为具有一个甲基的苯基，通过甲基结合到化合物上（$-CH_2Ph$，其中 Ph 为苯基）。

术语“酰基”是指 -C (=O) R，其中 R 为脂族基，优选地为 C_1-C_6 基。

术语“烷氧基”是指-OR，其中 O 是氧，且 R 为脂族基。

术语“氨基烷基”是指-RNH_2，其中 R 为脂族基。

术语“卤素”、“卤”或“卤化物”是指氟、氯、溴和碘。

术语“卤烷基”是指 -RX ，其中 R 为脂族基，且 X 为一种或多种卤素。

术语“羟烷基”是指-ROH，其中 R 为脂族基。

术语“氧代”是指一个羰基氧 (=O)。

除了对以上描述的基团进行明确取代外，本发明的化合物根据需要可包括其它取代。例如，内酯或内酰胺主链或主链取代基可另外地（例如通过取代一个氢或通过衍生一个非氢基团）被一个或多个以下取代基取代，诸如 C_1-C_5 脂族基、C_1-C_5 烷氧基、芳基或功能基团。合适的功能基团的示例包括但不限于：缩醛、醇、醛、酰胺、胺、硼化物、氨基甲酸酯、烷氧羰基、碳酸盐、碳二亚胺、羧酸、羟腈、二硫化物、烯胺、酯、醚、卤素、肼、腙、二酰亚胺、亚氨基、亚胺、异氰酸盐、酮缩醇、酮、硝基、肟、膦、膦酸酯、膦酸、季铵、氧硫基、硫化物、砜、磺酸、硫醇等。

此处在提到本发明的化合物时所用的术语“分离的”是指通过人为干预使其从天然状态发生“改变”。例如，如果化合物是天然存在的，则它已经发生改变或从其最初环境分开，或两种情况均存在。换言之，在活生物体中天然存在的化合物不是“分离的”，如在此应用的术语所示，从其天然状态的共存材料中分离的同一化合物却是“分离的”。术语“分离的”也可指在一种基本无污染或无不需要物质的制品中的化合物。至于在自然界中发现的化合物，“分离的”是指基本不存在与该化合物或组合物在天然状态下相关的物质。

在提到化合物时所用术语“纯化的”是指在这样一种制品中的化合物，其中该化合物组成了该制品的主要成分，例如化合物在制品组成中的重量占到约 50%、约 60%、约 70％、约 80％、约 90％、约 95％或更多。

此处所用术语“受试者”是指成为治疗、观察或实验对象的一种动物，该动物优选地为哺乳动物，且最优选地为作为治疗和／或观察对象的人。

此处所用术语“治疗有效量”意指在研究者、兽医、内科医生或其它临床医生所应用的组织系统、动物或人中引起生物学或医学反应的活性化合物或药物制剂的剂量，其中所述反应包括受治疗疾病或紊乱症状的缓解。

术语“组合物”指含有特定剂量的特定组分的产品，以及由特定剂量的特定组分组合直接或间接产生的任一产品。

术语“可药用盐”是指一种或多种本发明化合物的盐。化合物的合适

可药用盐包括酸加成盐，其例如可通过将化合物的溶液和可药用酸的溶液混合而形成，所述可药用酸诸如盐酸、硫酸、富马酸、顺丁烯二酸、琥珀酸、乙酸、苯甲酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸或磷酸。此外，当本发明的化合物带有一个酸性部分时，其合适的可药用盐可包括碱金属盐(例如钠盐或钾盐)；碱土金属盐 (例如钙盐或镁盐)；以及与合适的有机配体所形成的盐 (例如用如卤化物、氢氧化物、羧酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、烷基磺酸盐和芳基磺酸盐的反荷阴离子形成的铵、季铵和胺阳离子)。可药用盐的示例包括但不限于：醋酸盐、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、碳酸氢盐、硫酸氢盐、酒石酸氢盐、硼酸盐、溴化物、丁酸盐、乙二胺四乙酸钙、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、右旋樟脑磺酸、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、克拉维酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐(digluconate)、二氢氯化物、十二烷基硫酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、丙烯酯十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐（gluceptate）、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、谷氨酸盐、甘油磷酸盐、乙醇酰阿散酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、间苯二酚己酯、海巴明、氢溴酸盐、氢氯化物、氢碘化物、2-羟基-乙烷磺酸盐、羟基萘甲酸盐、碘化物、异硫代硫酸盐、乳酸盐、乳糖醛酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、扁桃酸盐、甲磺酰盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、2－萘磺酸盐、napsylate、烟酸盐、硝酸盐、N-甲基葡糖胺铵盐、油酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、棕榈酸盐、泛酸盐、pectinate、过硫酸盐、丙酸3－苯酯、磷酸盐／二磷酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、聚半乳糖醛酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、硫酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、鞣酸盐、酒石酸盐、8－氯茶碱、苯甲磺酸盐、三乙基碘、十一酸酯、戊酸盐等。

术语“可药用载体”是用于制备所需要的本发明化合物剂型的介质。可药用载体包括溶剂、稀释剂或其它液体载体；分散助剂或悬浮助剂；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。Remington 药物科学（Remington 's Pharmaceutical Sciences），第 15 版，

E. W. Martin (Mack 出版公司, Easton, Pa., 1975)和药物赋形剂手册（Handbook of Pharmaceutical Excipients），第 3 版，A. H.Kibbe,编辑(Amer. Pharmaceutical Assoc. 2000)，公开了多种用于制备药学组合物的载体以及制备它们的公知技术，二者在此全部并入作为参考。

术语“可药用酯”是指可在体内水解成本发明的化合物或其盐的酯。合适的酯基团的示例包括例如衍生自可药用的脂族羧酸的酯基团，诸如甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯盐、丁酸酯、丙烯酸酯和琥珀酸乙酯。

本发明提供了用于在重组宿主细胞中产生聚酮化合物的重组方法和材料；提供了产生聚酮化合物的重组宿主细胞；提供了结构上与埃坡霉素类相关的新聚酮化合物；提供了纯化埃坡霉素类的方法；以及提供了埃坡霉素 D 的晶体形式。

在一个实施方案中，本发明提供了来自孢囊杆菌亚目的重组宿主细胞，该细胞含有编码异源 PKS 基因的重组表达载体，并可由这些载体编码的 PKS 酶产生聚酮化合物。如此处所用，术语重组指通过人类干预产生的细胞、化合物或组合物，这种干预一般是通过对基因或部分基因进行特异且定向的操作来实现。孢囊杆菌亚目是粘球菌目中的两个成员之一（另一成员是堆囊菌亚目，其包括埃坡霉素的生成者纤维堆囊菌属）。孢囊杆菌亚目包括粘球菌科、孢囊杆菌科。粘球菌科包括囊球菌属（Angiococcus）(即碟形囊球菌（A. disciformis）)、粘球菌属和软骨球菌属（Corallococcus）(即大孢软骨球菌（C. macrosporus）、珊瑚软骨球菌（C. corralloides）和 C. exiguus)。孢囊杆菌科包括孢囊杆菌属（Cystobacter）(即深褐孢囊杆菌（C. fuscus），锈色孢囊杆菌（C. ferrugineus），小孢囊杆菌（C. minor），C. velatus 和 C. violaceus)、蜂窝囊菌属（Melittangium）（即牛肝菌蜂窝囊菌（M. boletus）和栖地衣蜂窝囊菌（M. lichenicola）、标桩菌属（即直立标桩菌和橙色标桩囊菌）和原囊菌属（Archangium）（即过渡原囊菌（A. gephyra））。本发明特别优选的宿主细胞为这样的宿主细胞，其产生聚酮化合物的产量等于或大于 10 至 20 mg/L，更优选地等于或大于 100 至 200 mg/L，且最优选地等于或大于 1 至 2 g/L。

在一个优选的实施方案中，本发明的宿主细胞来自粘球菌属或标桩菌属。在特别优选的实施方案中，宿主细胞选自叶柄粘球菌、橙色粘球菌、黄色粘球菌、变绿粘球菌、直立标桩菌和橙色标桩囊菌。特别优选的本发明的粘球菌宿主细胞为这样的宿主细胞，其产生聚酮化合物的产量等于或大于 10 至 20 mg/L，更优选地等于或大于 100 至 200 mg/L，最优选地等于或大于 1 至 2 g/L。特别优选黄色粘球菌宿主细胞，其在此水平产生。可用于本发明的黄色粘球菌宿主细胞包括但不限于 DZ1 细胞系(Campos 等，1978，分子生物学杂志（J. Mol. Biol.）119 : 167-178，在此引用作为参考)，产生 TA 的细胞系 ATCC 31046，DK1219 细胞系(Hodgkin 和 Kaiser, 1979，分子普通遗传学（Mol. Gen. Genet.）171 : 177-191，在此引用作为参考)，以及 DK1622 细胞系(Kaiser, 1979，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci. USA ）76 : 5952-5956，在此引用作为参考)。

本发明的宿主细胞包含重组 DNA 表达载体，且在另一个实施方案中，本发明提供的重组 DNA 载体能够在这些宿主细胞内进行染色体整合和染色体外复制。本发明的载体至少包含部分的 PKS 编码序列，并能够在本发明的宿主细胞内指导功能 PKS 酶的表达。如此处所用，术语表达载体指任一可导入宿主细胞内的核酸。表达载体能够在细胞中稳定地或瞬时存在，不管是作为染色体的一部分还是作为细胞内或任一细胞腔区室内的其它 DNA，例如细胞质中的复制载体。表达载体也包含用于指导 RNA 合成的基因，该 RNA 在细胞或细胞提取物中被翻译成多肽。这样，载体或者含有启动子以促进基因表达，或是整合到染色体的某一位点以实现基因表达。此外，表达载体一般包含额外的功能元件，如用作选择标记的抗性赋予基因和增强启动子活性的调节基因。

一般而言，表达载体含一个或多个标记基因，含该载体的宿主细胞可通过这些基因进行鉴定和／或筛选。用于本发明载体的抗生素抗性赋予基因的示例包括 ermE (赋予红霉素和林可霉素抗性)、tsr (赋予硫链丝菌肽抗性)、aadA (赋予壮观霉素和链霉素抗性)、aacC4 (赋予阿泊拉霉素、卡那霉素、庆大霉素、遗传霉素 (G418)和新霉素抗性)、hyg (赋予潮霉素抗性)，

以及 vph (赋予紫霉素抗性)抗性赋予基因。用于黄色粘球菌的选择标记包括卡那霉素、四环素、氯霉素、zeocin、壮观霉素以及链霉素抗性赋予基因。

表达载体的各种组分差异很大，这取决于载体的特定用途。特别是组分取决于载体将要用到的宿主细胞，以及它发挥作用的方式。例如，本发明的某些优选的载体是整合载体：载体整合到宿主细胞的染色体 DNA 中。这些载体可包含一个噬菌体附着位点或与宿主细胞染色体 DNA 片段互补的 DNA 片段以指导整合。此外，如此处所示，一系列的此类载体可用于在宿主细胞内构建 PKS 基因簇，而每个载体仅包含完整 PKS 基因簇的一部分。这样，本发明的重组 DNA 表达载体可仅含有部分的 PKS 基因或基因簇。也可用同源重组方法来缺失、破坏或改变基因，其中所述基因包括先期导入宿主细胞的异源 PKS 基因。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了表达载体和重组粘球菌宿主细胞，优选地黄色粘球菌宿主细胞，这些宿主细胞含有产生聚酮化合物所需的那些表达载体。目前，在黄色粘球菌中染色体外进行复制的载体还未见发表，尽管已有一篇未发表的报道涉及到一种基于 Mx4 噬菌体复制子的人工质粒。但是，已知有很多噬菌体整合到黄色粘球菌的染色体 DNA，所述噬菌体包括 Mx8、Mx9、Mx81 和 Mx82。可将这些噬菌体的整合和附着功能导入质粒，以构建出可整合到黄色粘球菌染色体 DNA 的基于噬菌体的表达载体。其中，噬菌体 Mx9 和 Mx8 优选地用于本发明。质粒 pPLH343 是在大肠杆菌中复制的质粒，且包含编码附着和整合功能的噬菌体 Mx8 基因，在 Salmi 等, 1998 年 2 月，温和的黄色粘球菌噬菌体 Mx8 的免疫及整合的遗传决定部位，细菌学杂志（J. Bact.）180 (3) : 614-621 中已有描述。

大量的启动子可用于本发明的优选的粘球菌表达载体。见以下的实施例 8。例如，纤维堆囊菌埃坡霉素 PKS 基因的启动子(见 PCT 公开号 00/031247，在此引用作为参考)在黄色粘球菌宿主细胞中行使功能。埃坡霉素 PKS 基因启动子可在重组宿主细胞内驱动一个或多个埃坡霉素 PKS

基因或其它 PKS 基因产物的表达。另一个用于在黄色粘球菌宿主细胞内表达本发明的重组 PKS 的优选启动子是黄色粘球菌的 pilA 基因启动子。该启动子以及两株黄色粘球菌在 Wu 和 Kaiser, 1997 年 12 月，pilA 基因在黄色粘球菌中的表达调控，细菌学杂志 179 (24) : 7748-7758 一文中已有有描述，在此引用作为参考，上述两株黄色粘球菌为 pilA 缺失株和 pilS 缺失株，可由被 pilA 启动子控制的基因表达高水平的基因产物。本发明也提供了同时含有 pilA 和 pilS 缺失的重组粘球菌宿主细胞。另一优选的启动子是 sdeK 基因的饥饿依赖启动子。

本发明提供了用于制备重组的黄色粘球菌表达载体的优选表达载体，以及提供了本发明的宿主细胞。命名为质粒 pKOS35-82. 1 和 pKOS35-82. 2 (图 2)的这些载体能够在大肠杆菌宿主细胞内复制并整合到黄色粘球菌的染色体 DNA 中。这些载体包含 Mx8 附着和整合基因以及 PilA 启动子，且在下游方便地带有限制性酶识别位点。两种载体相互间的不同仅为载体上 pilA 启动子的方向不同，并可容易地改变为包含本发明的埃坡霉素 PKS 和修饰酶基因，或包含其它 PKS 和修饰酶基因。载体的构建在实施例 1 中描述。

在另一个实施方案中，本发明提供了在不能天然产生聚酮化合物的孢囊杆菌亚目宿主细胞中制备聚酮化合物的方法，该方法包括转染了本发明的重组 DNA 载体的宿主细胞的培养，培养条件为使载体上编码的 PKS 基因得以表达，且产生该聚酮化合物。用此方法可制备出由组件式或迭代式 PKS 酶所产生的任何一种聚酮化合物的多样化成员。此外，用此方法也可制备由杂合或其它重组 PKS 基因所产生的新聚酮化合物。在一个优选的实施方案中，PKS 基因编码一个杂合组件式 PKS。

已克隆了大量的组件式 PKS 基因，并可立即应用于本发明的载体和方法。由 PKS 酶产生的聚酮化合物经常由聚酮化合物修饰酶（该酶也称修整酶）进一步修饰，以使 PKS 的聚酮化合物产物发生羟化、环氧化、甲基化和／或糖基化。根据本发明的方法，这些基因也可导入宿主细胞以制备出经过修饰的目标聚酮化合物。下列表格列出了阐述 PKS 基因和相应的 PKS

酶的参考文献，这些基因和酶可用于构建本发明的重组 PKSs 和编码它们的相应 DNA 化合物。也列出了描述聚酮化合物修整酶和修饰酶，以及可用于制备本发明的重组 DNA 化合物的相应基因的多个参考文献。

PKS 和聚酮化合物修整酶基因

除虫菌素

美国专利号 5,252,474 ； 美国专利号 4,703,009 ； 和 EP 公开号 118,367 （Merck）。

MacNeil 等, 1993, 工业微生物学: 基础和应用分子遗传学（Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics）, Baltz, Hegeman, 和 Skatrud 编辑(ASM), 245-256 页，除虫菌素、红霉素和 Nemadectin 的聚酮化合物合酶编码基因的比较。

MacNeil 等，1992, 基因（Gene），115: 119-125, Streptomyces avermitilis 编码除虫菌素聚酮化合物合酶的基因的复杂组织。

Ikeda 和 Omura, 1997, 化学研究（Chem. Res.）97 : 2599-2609, 除虫菌素的生物合成。

杀假丝菌素 (FR008)

Hu 等, 1994, 分子微生物学（Mol. Microbiol.） 14 : 163-172.

埃坡霉素

PCT 公开号 99/66028（Novartis）。

PCT 公开号 00/031247（Kosan）。

红霉素

PCT 公开号 93/13663 ；美国专利号 6,004,787 ； 和美国专利号 5,824,513（Abbott）。

Donadio 等, 1991, 科学（Science） 252 : 675-9。

Cortes 等, 1990 年 11 月 8 日，自然（Nature） 348 : 176-8，红色糖多孢菌（Saccharopolyspora erythraea），产生红霉素的聚酮化合物合酶中一类异常巨大的多功能多肽。

糖基化酶

PCT 公开号 97/23630 和美国专利号 5, 998, 194（Abbott）。

FK-506

Motamedi 等, 1998, 免疫抑制剂 FK-506 大环内酯环的生物合成基因簇，欧洲生物化学杂志（Eur. J. biochem.）256 : 528-534。

Motamedi 等, 1997, 参与大环内酯类免疫抑制剂 FK-506 生物合成的多功能聚酮化合物合酶的结构组织，欧洲生物化学杂志 244 : 74-80。

甲基转移酶

美国专利号 5, 264, 355 和美国专利号 5, 622, 866（Merck）。

Motamedi 等, 1996, 参与免疫抑制剂 FK506 和 FK-520 生物合成的甲基转移酶和羟化酶的特征，细菌学杂志 178 : 5243-5248。

FK-520

PCT 公开号 00/20601 to Kosan。

Nielsen 等, 1991，生物化学（Biochem.）30 : 5789-96。

洛伐他汀

美国专利号 5, 744, 350（Merck）。

Nemadectin

MacNeil 等, 1993，同上。

尼达霉素

PCT 公开号 98/51695（Abbott）。

Kakavas 等, 1997, 来自天青链霉菌（Streptomyces caelestis）的尼达霉素聚酮化合物合酶基因的鉴定及特征，细菌学杂志 179 : 7515-7522。

夹竹桃霉素

Swan 等, 1994, 具有罕见编码序列的编码I 型聚酮化合物合酶的一种抗生链霉菌（Streptomyces antibioticus）基因的特征，分子普通遗传法 242 : 358-362。

PCT 公开号 00/026349（Kosan）。

Olano 等, 1998, 参与夹竹桃霉素生物合成的抗生链球菌染色体区域

的分析，该区域编码负责大环内酯环糖基化的两种糖基转移酶，分子普通遗传学 259 (3) : 299-308。

PCT 公开号 99/05283（Hoechst）。

苦霉素

PCT 公开号 99/61599（Kosan）。

PCT 公开号 00/00620（明尼苏达大学）。

Xue 等, 1998, 在委内瑞接链霉菌（Streptomyces venezuelae）中大环内酯 YC-17 和冥菌素的羟化由编码 pikC 的细胞色素 P450 介导, 化学和生物学（Chemistry & Biology）5 (11) : 661-667。

Xue 等, 1998 年 10 月, 委内瑞拉链霉菌中用于大环内酯类抗生素生物合成的基因簇: 代谢多样性的体系结构, 美国国家科学院院刊 95 : 12111-12116。

Platenolide

欧洲公开号 791, 656; 和美国专利号 5, 945, 320 to Lilly。

雷帕霉素

Schwecke 等, 1995 年 8 月, 用于聚酮化合物雷帕霉素生物合成的基因簇, 美国国家科学院院刊 92 : 7839-7843。

Aparicio 等, 1996, 吸水链球菌（Streptomyces hygroscopicus）中雷帕霉素生物合成基因簇的组织: 组件式聚酮化合物合酶的酶活性结构域分析, 基因（Gene） 169 : 9-16。

利福霉素

PCT 公开号 98/07868（Novartis）。

August 等, 1998 年 2 月 13 日, 袢霉素（ansamycin）抗生素利福霉素的生物合成: 推导自 Amycolatopsis mediterranei S669 的 rif 生物合成基因簇的分子分析, 化学和生物学, 5 (2) : 69-79。

堆囊菌属 PKS

美国专利号 6, 090, 601（Kosan）。

Soraphen

美国专利号 5, 716, 849（Novartis）。

Schupp 等, 1995, 细菌学杂志（J. Bacteriology） 177 : 3673-3679. 用于大环内酯类抗生素 Soraphen A 生物合成的纤维堆囊菌 (粘球菌)基因簇: 克隆、特征及与来自放线菌纲的聚酮化合物合酶基因的同源性。

Spinocyn

PCT 公开号 99/46387（DowElanco）。

螺旋霉素

美国专利号 5, 098, 837（Lilly）。

激活基因

美国专利号 5, 514, 544（Lilly）。

泰乐菌素

美国专利号 5, 876, 991 ; 美国专利号 5, 672, 497 ; 美国专利号 5, 149, 638 ; 欧洲公开号 791, 655 ;和欧洲公开号 238, 323（Lilly）。

Kuhstoss 等, 1996, 基因（Gene）183 : 231-6，通过构建杂合聚酮化合物合酶产生新聚酮化合物。

修整酶

Merson-Davies 和 Cundliffe, 1994, 分子微生物学，13 : 349-355。来自弗氏链霉菌（Streptomyces fradiae）基因组 tylBA 区域中 5 种泰乐菌素生物合成基因的分析。

带有或不带有用于聚酮化合物修饰的基因的以上任何基因可用于本发明的重组 DNA 表达载体。此外,可通过用多种载体转化来构建本发明的宿主细胞，其中所述每种载体含所需 PKS 和修饰酶基因簇的一部分; 见美国专利号 6, 033, 883, 在此引用作为参考。

为提高聚酮化合物在本发明的宿主细胞（包括粘球菌宿主细胞）中的产量，可转化细胞，以表达异源磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶。PKS 蛋白质需要装载和延伸组件的 ACP 结构域以及任何 NRPS 的 PCP 结构域进行磷酸泛酰巯基乙胺化作用。磷酸泛酰巯基乙胺化作用由称为磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPTases)的酶介导。为了在不天然表达可作用于所需 PKS 酶

的 PPTase 的宿主细胞中产生功能 PKS 酶，或增加 PPTase 有限存在的宿主细胞中功能 PKS 酶的量，可导入异源 PPTase，所述 PPTase 包括但不限于 Sfp，如在 PCT 公开号 97/13845 和 98/27203，以及美国专利号 6,033,883 中所述，它们在此引用作为参考。另一个可用于此目的合适的 PPTase 为来自橙色标桩囊菌的 MtaA。

本发明提供的在任一生物体中提高聚酮化合物产量的另一方法是筛选链霉素、利福平和/或庆大霉素的抗性细胞，其中所述的任一生物体包括但不限于粘球菌属、链霉菌属和堆囊菌属宿主细胞。在一个优选的实施方案中，生成聚酮化合物的宿主依次用这些化合物(或结构与其类似的化合物)中的每一个进行筛选，分离聚酮化合物产生能力提高的抗性细胞，并用于下一轮的筛选。以这种方式可获得例如（但不限于）以高水平产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物并对链霉素、利福平和庆大霉素具有抗性的黄色粘球菌宿主细胞。

本发明的宿主细胞不仅可用于产生天然存在的聚酮化合物，也可用于产生由重组 PKS 基因产物和修饰酶所产生的聚酮化合物。在一个重要的实施方案中，本发明提供了包含杂合 PKS 的重组 DNA 表达载体。对本发明而言，杂合 PKS 为重组 PKS，其包含第一种 PKS 的一个或多个延伸组件、装载组件和硫酯酶/环化酶结构域的全部或一部分，以及第二种 PKS 的一个或多个延伸组件、装载组件和硫酯酶/环化酶结构域的全部或一部分。

本领域技术人员将认识到：无需从天然存在源中分离本发明的杂合 PKS 中的第一种或第二种 PKS 的全部或部分。例如，AT 结构域中仅一小部分决定它的特异性。见 PCT 公开号 00/001838，在此引用作为参考。DNA 合成技术的陈述使得技术人员可从头合成大小足以构建 PKS 组件或结构域的有用部分的 DNA 化合物。对于本发明，这样的合成 DNA 化合物被视为 PKS 的一部分。

如上表所示，存在有大量的作为易于获得的 DNA 源的 PKS 基因和序列信息用于构建本发明的编码杂合 PKS 的 DNA 化合物。构建编码杂合 PKS 的 DNA 化合物的方法在美国专利号 6,022,731；5,962,290；5,672,

491；和 5,712,146 以及 PCT 公开号 98/49315；99/61599；和 00/047724 中已有描述，它们均在此引用作为参考。本发明的编码杂合 PKS 的 DNA 化合物可为两种以上 PKS 基因的杂合体。即使仅应用两种基因时，在该杂合基因中往往有两个或更多组件，其中组件的全部或一部分来自第二种 PKS 基因。本领域的技术人员将会理解，本发明的杂合 PKS 包括但不限于任一下列类型的 PKS: (i) PKS 包含一个这样的组件，其中至少有一个结构域来自异源组件；(ii) PKS 包含一个来自异源 PKS 的组件；(iii) PKS 含有一种来自异源 PKS 的蛋白质；以及 (iv)以上的组合。

本发明的杂合 PKS 酶往往这样构建：通过将第一种 PKS 的一个组件的一个或多个结构域的编码序列替换为来自第二种 PKS 的一个组件的一个或多个结构域的编码序列而构建重组编码序列。一般而言，此处谈到的插入或替换 KR、DH 和／或 ER 结构域，包括对组件进行相关 KR、DH 或 ER 结构域的替换，通常是该组件的相对应结构域替换，从而获得插入或替换结构域。如果需要或有利的话，任何组件的 KS 和／或 ACP 也可用另一 KS 和／或 ACP 进行替换。例如，如果由于组件中的变化而导致埃坡霉素衍生物化合物的产量降低，则可通过改变随后组件的 KS 和／或 ACP 结构域来提高产量。在这些替换或插入的每一种替换或插入中，异源 KS、AT、DH、KR、ER 或 ACP 编码序列可来自相同或不同 PKS 的另一组件的编码序列或来自化学合成，以获得杂合 PKS 编码序列。

虽然本发明的一个重要实施方案涉及到杂合 PKS 基因，但本发明也提供了不存在第二种 PKS 基因序列却与天然存在的 PKS 基因存在一处或多处突变和／或缺失的不同的重组 PKS 基因。缺失可包括一个或多个组件或结构域的缺失，和／或限于一个或多个组件或结构域内的缺失。当缺失包含了一个完整的延伸组件（而不是 NRPS 组件），所得的聚酮化合物衍生物比衍生缺失变体的 PKS 所产生的化合物至少少两个碳。缺失也可包含 NRPS 组件和／或装载组件。缺失限于一个组件内时，缺失可仅包含一个单一结构域，一般为 KR、DH 或 ER 结构域的缺失，或包含多个结构域，如 DH 和 ER 结构域，或 KR 和 DH 结构域，或全部三个 KR、DH 和 ER

结构域的缺失。PKS的结构域也可通过突变如随机或定点诱变发生功能“缺失”。因此，如此处所示的那样，KR 结构域通过突变呈现出无功能或低于其全部功能的状态。此外，AT 结构域的特异性也可通过突变如随机或定点诱变而发生改变。

为构建本发明的任何PKS，可应用在PCT 公开号98/27203和美国专利号6,033,883（它们在此引用作为参考）中所描述的技术，这些文献中，PKS的多种基因和任选地一种或多种聚酮化合物修饰酶的基因被分作两个或多个片段（一般是三个），并且每个片段都置于单独的表达载体(也见PCT 公开号00/063361，二者在此引用作为参考)。以这种方式，可组装整套基因并更易于异源表达的操作，且可以改变基因的每一个片段，并且可将多种改变片段组合入单一的宿主细胞以提供本发明的重组PKS基因。此项技术使得构建重组PKS基因的大文库、构建表达这些基因的载体以及构建包含这些载体的宿主细胞变得更为有效。在所有上下文中，编码所需PKS的基因不仅可存在于两个或更多的载体上，也可与基因所来自的天然生产者生物体中存在不同地进行安排或排列。

在优选的和阐述的实施方案中，本发明的重组宿主细胞产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物。天然存在的埃坡霉素 (包括埃坡霉素A、B、C、D、E和 F) 和与它们结构相关的非天然存在的化合物 (埃坡霉素衍生物或类似物) 是高效的对真核细胞特异的细胞毒性剂。这些化合物已用作抗真菌剂、癌症化学治疗剂和免疫抑制剂，并通常用于治疗炎症或任何过度增生性疾病，如银屑病、多发性硬化症、动脉硬化症和斯坦特固定模堵塞。埃坡霉素在其得以鉴定的天然存在的纤维堆囊菌细胞中以很低的水平产生。此外，纤维堆囊菌的生长非常缓慢，且发酵纤维堆囊菌菌株是困难和费时的。本发明赋予的一个重要的优点是在非纤维堆囊菌宿主细胞中以简单的方式产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物的能力。本发明的另外一个优点是在本发明提供的重组宿主细胞中以较天然存在的埃坡霉素生产者细胞相比具有更高水平和更大量产生埃坡霉素的能力。而另一个优点是在重组宿主细胞中产生埃坡霉素衍生物的能力。这样，本发明提供了产生所需埃坡霉素或埃坡

霉素衍生物的重组宿主细胞。在一个优选的实施方案中，宿主细胞产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物的量等于或大于 10 mg/L。在一个实施方案中，本发明提供了较天然存在的产生埃坡霉素的生物体相比，以更高水平产生一种或多种埃坡霉素或埃坡霉素衍生物的宿主细胞。在另一实施方案中，本发明提供了产生埃坡霉素混合物的宿主细胞，其中所述混合物的复杂性要低于天然存在的产生埃坡霉素的宿主细胞所生成的混合物。

在一个特别优选的实施方案中，本发明的宿主细胞产生埃坡霉素混合物的复杂性低于天然存在的产生埃坡霉素的细胞所产生的混合物。作为一个实例，本发明的某些宿主细胞产生的埃坡霉素 D 在一种较由天然存在的纤维堆囊菌所产生的混合物的复杂性要低的混合物中，因为埃坡霉素 D 在前者是主产物，而在后者是副产物。天然存在的产生埃坡霉素的纤维堆囊菌一般产生埃坡霉素 A、B、C、D、E、F 和极少量的其它产物的混合物，其中只有埃坡霉素 A 和 B 作为主要产物存在。下列表 1 概述了本发明的不同的示例宿主细胞所产生的埃坡霉素。

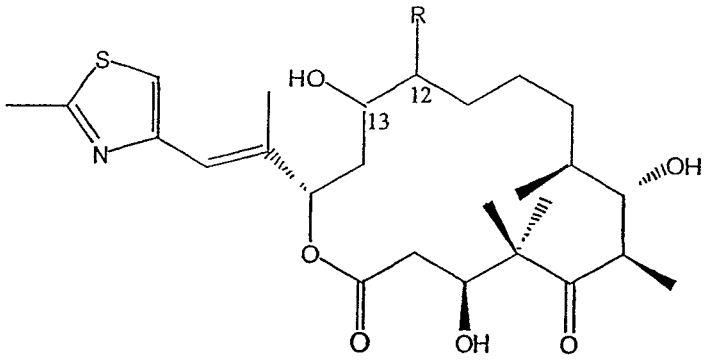
表 1

细胞类型	所产生的埃坡霉素	不能产生的埃坡霉素*
1	A, B, C, D	E, F
2	A, C	B, D, E, F
3	B, D	A, C, E, F
4	A, B	C, D
5	C, D	A, B
6	B	A, C, D, E, F
7	D	A, B, C, E, F

*或仅作为副产物产生

这样，本发明的重组宿主细胞也包括仅将一种所需埃坡霉素或埃坡霉素衍生物作为主产物产生的宿主细胞。

仅基于对埃坡霉素 PKS 结构域的分析，可预测出 PKS 酶催化产生随意命名为“G”和“H”的埃坡霉素，它们的结构如下所示：



埃坡霉素 G (R=H) 和 H (R=CH_3).

这些化合物相互间的区别之处在于，埃坡霉素 G 在 C-12 处为氢，而埃坡霉素 H 在该部位是甲基。经预测 C-12 位的差异是源于对应的 PKS 的 AT 结构域（延伸组件 4）结合能力的不同，AT 结构域或者结合丙二酸单酰 CoA 导致氢，或者结合甲基丙二酸单酰 CoA 导致甲基。但是，并未在自然界或本发明的重组宿主细胞中观察到埃坡霉素 G 和 H。相反，认为 PKS 的产物是埃坡霉素 C 和 D，它们具有一个 C-12 到 C-13 的双键和缺少一个 C-13 羟基取代基而分别区别于埃坡霉素 G 和 H 。如下文更详细描述的那样，基于埃坡霉素 PKS 基因在异源宿主细胞中的表达，以及这些基因经遗传改造后所产生的产物，认为在埃坡霉素 C 和 D 中形成 C12-C13 双键的脱水反应是由埃坡霉素 PKS 本身完成的。埃坡霉素 A 和 B 分别由埃坡霉素 C 和 D 通过 epoK 基因产物进行 C-12 到 C-13 双键的环氧化作用得以形成。埃坡霉素 E 和 F 可分别由埃坡霉素 A 和 B 通过 C-21 甲基的羟基化作用或通过埃坡霉素 PKS 装载组件掺入羟基丙二酸单酰 CoA 而不是丙二酸单酰 Co A 得以形成，这一点在下面进一步讨论。

这样，埃坡霉素 PKS 基因和 epoK 基因在本发明宿主细胞中的表达导致了埃坡霉素 A、B、C 和 D 的产生。如果 epoK 基因不存在，或通过突变使其失活或部分失活，那么埃坡霉素 C 和 D 作为主要产物得以生成。

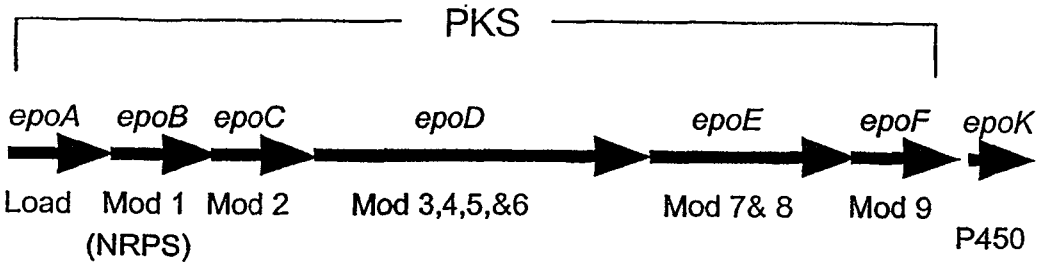
如果延伸组件 4 的 AT 结构域被丙二酸单酰 Co A 特异的 AT 结构域替换，那么埃坡霉素 A 和 C 得以产生，并且如果没有功能 epoK 基因，那么埃坡霉素 C 就作为主产物得以产生。如果延伸组件 4 的 AT 结构域被甲基丙二酸单酰 Co A 特异的 AT 结构域替换，那么埃坡霉素 B 和 D 就作为主产物得以产生，并且如果没有功能 epoK 基因，那么埃坡霉素 D 就作为主产物得以产生。

埃坡霉素 PKS 和修饰酶基因克隆自产生埃坡霉素的纤维堆囊菌 SMP44 菌株。用 Jaoua 等, 1992, 质粒（Plasmid） 28 : 157-165 所描述的方法（在此引用作为参考）从该菌株中制备总 DNA。粘粒文库制备自 pSupercos (Stratagene)中的纤维堆囊菌基因组 DNA。完整的 PKS 和修饰酶基因簇分离自 4 个重叠的粘粒克隆（根据布达佩斯条约于 1999 年 2 月 17 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd., 马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且授予的 ATCC 保藏号如下：pKOS35-70.1A2(ATCC 203782)， pKOS35-70.4(ATCC 203781)，pKOS35-70. 8A3(ATCC 203783)和 pKOS35-79. 85 (ATCC 203780)），且测定的 DNA 序列如在 PCT 公开号 00/031237 中所描述的，在此引用作为参考。DNA 序列分析表明 PKS 基因簇带有一个装载组件和九个延伸组件。PKS 序列的下游是一个开放读码框 (ORF)，命名为 epoK，该读码框显示出与细胞色素 P450 氧化酶基因有强同源性，且编码埃坡霉素环氧酶（修饰酶）。

PKS 基因被组织在 6 个 ORF 中。在多肽水平上，装载组件、延伸组件 1(一种 NRPS)、2 和 9 出现在单独的多肽上；它们相应的基因分别命名为 epoA、epoB、epoC 和 epoF。组件 3、4、5 和 6 包含在一条单独的多肽上，其基因命名为 epoD，且组件 7 和 8 在另外一条多肽上，其基因命名为 epoE。ORFs 之间的间隔提示 epoC、epoD、epoE 和 epoF 构成了一个操纵子。epoA、epoB 和 epok 基因也可为该巨大操纵子的一部分，但在 epoB 和 epoC 之间有约 100 bp 的间隔，在 epoF 和 epoK 之间有约 115 bp 的间隔，这些间隔可能含有启动子。埃坡霉素 PKS 基因簇在图解 1 中概

要显示。

图解 1



紧靠 epoK（P450 环氧酶基因）的下游是 ORF1，其编码的多肽似乎包括跨膜结构域，并可参与转运埃坡霉素。该 ORF 之后是一系列 ORFs，它们包含编码参与转运和调控的蛋白质的基因。对组件的详细检查显示出与埃坡霉素生物合成相一致的组织和组成。

随后的描述是在多肽水平上进行的。装载组件和延伸组件 3、4、5 和 9 中 AT 结构域的序列显示出与丙二酸单酰装载组件的共有序列相似，这与分别在 C-14、C-12 (埃坡霉素 A 和 C)、C-10 和 C-2 位存在 H 侧链一致。组件 2、6、7 和 8 的 AT 结构域与甲基丙二酸单酰特异的 AT 结构域类似，同样与分别在 C-16、C-8、C-6 和 C-4 位存在甲基侧链一致。

装载组件包含这样的 KS 结构域，通常在其活性部位存在的半胱氨酸残基由酪氨酸取代。该结构域命名为 KS^{y}，并行使脱羧酶功能(为其正常功能的一部分)，但不具有缩合酶功能。这样，预计装载组件可装载丙二酸单酰 CoA，将其移动到 ACP，并使其脱羧以产生与半胱氨酸缩合所需的乙酰基残基。延伸组件 1 是非核糖体肽合酶，可激活半胱氨酸并催化与装载组件上的乙酸酯缩合。序列包含活化氨基酸所需的、与 ATP－结合和 ATPase 结构域高度类似的片段，磷酸泛酰巯基乙胺化作用位点，氧化结构域，环化结构域和延伸结构域。延伸组件 2 决定埃坡霉素 C-15-C-17 的结构。组件 2 中存在的 DH 结构域在分子中产生 C-16-17 脱氢部分。组件 3 中的结构域与埃坡霉素 C－14 和 C－15 的结构一致；KR 反应产生的 OH 用于分子的内酯化。延伸组件 4 控制 C－12 和 C－13 的结构，其中埃坡霉素 C 和 D 在此处为一双键。尽管 AT 结构域的序列似乎与特异装载丙二酸酯的

序列类似，它也可装载丙二酸甲酯，因此部分导致了在天然产生埃坡霉素的生物体的发酵培养基中发现有埃坡霉素类混合物。

发现延伸组件 4 存在有与预期明显偏离的功能。该结构域预期含有一个 DH 结构域，从而指导埃坡霉素 C 和 D 作为 PKS 的产物而合成。分析显示组件 4 中 AT 和 KR 结构域间的间距并没有大到可容纳下一个功能 DH 结构域。这样，组件 4 长度的减少似乎并非发生在β－酮的酮还原之后，上述β－酮形成于由延伸组件 4 指导的缩合反应之后。如此处所示，埃坡霉素 PKS 基因本身足以使本发明的宿主细胞具备产生埃坡霉毒 C 和 D 的能力。埃坡霉素 C 和 D 的异源产生表明，一定存在有可引入双键的脱水酶功能。基于埃坡霉素 PKS 基因的异源表达和由改变的埃坡霉素基因所产生的产物，认为形成此双键的脱水反应是由埃坡霉素 PKS 延伸组件 5 的 DH 结构域介导，且共轭二烯前体的生成早于组件 5 ER 结构域引起的还原反应。

延伸组件 5 和 6 各有一整套还原结构域(KR、DH 和 ER)以在 C－11 和 C－9 位产生亚甲基功能。延伸组件 7 和 9 具有 KR 结构域，以在 C－7 和 C－3 位产生羟基，且延伸组件 8 不具有功能性 KR 结构域，这与 C－5 位存在酮基一致。延伸组件 8 也包含甲基转移酶（MT）结构域，该结构域导致了在 C－4 位成对的二甲基功能的存在。延伸组件 9 也有一个终止聚酮化合物合成并催化环闭合的硫酯酶结构域。

下表 2 概述了埃坡霉素 PKS 的基因、蛋白质、组件和结构域。

表 2

基因	蛋白质	组件	存在的结构域
epoA	EpoA	装载	KS^Y mAT ER ACP
epoB	EpoB	1	NRPS，缩合结构域，杂环化结构域，
			腺苷酸化结构域，硫醇化结构域，PCP
epoC	EpoC	2	KS mmAT DH KR ACP
epoD	EpoD	3-6	KS mAT KR ACP ; KS mAT KR ACP ;

			KS
			mAT DH ER KR ACP ; KS mmAT DH ER
			KR ACP
epoE	EpoE	7-8	KS mmAT KR ACP ; KS mmAT MT DH* KR* ACP
epoF	EpoF	9	KS mAT KR DH* ER* ACP TE

NRPS－非核糖体肽合酶；KS－酮合酶；mAT－丙二酸单酰 CoA 特异的酰基转移酶；mmAT－甲基丙二酸单酰 CoA 特异的酰基转移酶；DH－脱水酶；ER－烯酰基还原酶；KR－酮还原酶；MT－甲基转移酶；TE 硫酯酶；*－失活结构域。

序列分析显示，epoA 和 epoB（装载组件和延伸组件 1 NRPS）之间以及 epoC 和 epoD 之间存在翻译偶联。发现 epoD 和 epoE 以及 epoE 和 epoF 之间的间隔非常小，而 epoB 和 epoC 以及 epoF 和 epoK 之间的间隔超过 100 bp。这些基因间的区域可能含有启动子。

这样，埃坡霉素 PKS 是由 epoA、epoB、epoC、epoD、epoE 和 epoF 基因的基因产物组成的多蛋白质复合体。为赋予宿主细胞产生埃坡霉素类的能力，提供了带有本发明的重组 epoA、epoB、epoC、epoD、epoE 和 epoF 基因以及任选地其它可在该宿主细胞内表达的基因（例如 epoK 基因）的宿主细胞。本领域技术人将会理解：尽管埃坡霉素以及其它 PKS 酶此处可作为单一实体被提及，但这些酶一般为多亚单位蛋白质。这样，可通过改变一个或多个编码构成 PKS 的一种或多种多蛋白质的基因来制备衍生 PKS (通过缺失或突变形成的与天然存在的 PKS 不同的 PKS) 或杂合 PKS (由两种不同的 PKS 酶的部分组成的 PKS)。

埃坡霉素的后 PKS（post-PKS）修饰或修整包括由多种酶介导的多个步骤。这些酶此处称为修整酶或修饰酶。埃坡霉素 PKS 基因 epoA、epoB、epoC、epoD、epoE 和 epoF 在本发明的不表达 epoK 的宿主细胞内的表达

导致埃坡霉素 C 和 D 作为主产物得以产生，埃坡霉素 C 和 D 缺少埃坡霉素 A 和 B 的 C-12-C-13 环氧键，代之以 C-12-C-13 双键。这样，埃坡霉素 C 和 D 由 epoK 基因编码的环氧酶转化为埃坡霉素 A 和 B。埃坡霉素 A 和 B 可由羟化酶基因转化为埃坡霉素 E 和 F，其中所述羟化酶基因可由与埃坡霉素 PKS 基因簇相关联的基因编码或另一纤维堆囊菌的内源基因编码。另外，这些化合物可由结合了非丙二酸单酰 CoA 的起始单位（如羟基丙二酸单酰 CoA）的装载组件形成。这样，可通过提供带有一种或多种本发明的重组修饰酶基因的宿主细胞，或使用可天然表达（或不表达）修饰酶的宿主细胞，和／或提供非丙二酸单酰 CoA 的起始单位，从而在宿主细胞中产生如所希望进行了修饰的埃坡霉素或埃坡霉素衍生物。

这样，本发明提供了大量用于表达天然存在的埃坡霉素 A、B、C 和 D 及其衍生物的重组 DNA 化合物和宿主细胞。本发明也提供了重组宿主细胞，该细胞以类似于埃坡霉素 E 和 F 的方式产生进行了修饰的埃坡霉素衍生物。此外，本发明的任一埃坡霉素或埃坡霉素衍生物可按照 PCT 专利公开号 00/039276 中所描述的方法转化为对应的埃坡霉素 E 或 F 衍生物，其中所述专利在此引用作为参考。

本发明也提供了制备埃坡霉素衍生物的大量重组DNA化合物和宿主细胞。如此处所用的，短语埃坡霉素衍生物是指由重组埃坡霉素 PKS 所产生的化合物，其中所述重组埃坡霉素 PKS 中至少已插入了一个结构域，或它的一个结构域通过缺失或突变已失活，或结构域已被突变而改变了它的催化功能，或结构域被具有不同功能的结构域替换。在任何情况下，因此产生的埃坡霉素衍生物 PKS 的功能在于产生与天然存在的选自埃坡霉素 A、B、C、D、E 和 F 的结构不同的化合物。为有助于更好地理解本发明提供的重组 DNA 化合物和宿主细胞，以下提供了有关埃坡霉素 PKS 及其新重组衍生物的装载组件和每一组件的详细讨论。

埃坡霉素 PKS 的装载组件包含一个“失活”KS 结构域（该结构域由于在“活性”KS 结构域的半胱氨酸残基被酪氨酸（Y）残基取代而被命名为 KS^Y），该结构域不能进行由活性 KS 结构域介导的缩合反应。该 KS^Y 结

构域确可进行由 KS 结构域介导的脱羧反应。此类“失活”KS 结构域也存在于其它 PKS 酶中，通常其活性位点半胱氨酸被谷氨酰胺(Q)残基取代，且被命名为 KS^Q 结构域。已显示大鼠脂肪酸合酶的 KS^Q 结构域不能进行缩合反应，但在脱羧反应中呈现出 2 个数量级的增加。见 Witkowski 等，1999 年 9 月 7 日，生物化学（Biochem.） 38 (36) : 11643-11650，在此引用作为参考。KS^Q 结构域在脱羧反应中比 KS^Y 结构域更为有效，因此埃坡霉素 PKS 的 KS^Y 结构域被 KS^Q 结构域取代可增加在某些宿主细胞内或在某特定培养条件下的埃坡霉素的生物合成效率。这可仅仅通过将酪氨酸密码子改变为谷氨酰胺密码子而得以实现，如以下实施例 6 中所描述的。这也可通过将 KS^Y 结构域替换为另一 PKS 的 KS^Q 结构域而得以实现，其中所述另一 PKS 例如 oleandolide PKS 或 narbonolide PKS (见以上表中引用的与夹竹桃霉素、冥霉素和苦霉素 PKS 及修饰酶有关的参考文献)。

埃坡霉素装载组件也包含丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域(认为其被 KS^Y 结构域脱羧基而产生乙酰基)，以及一个 ACP 结构域。本发明提供了重组埃坡霉素衍生物的装载组件或它们的编码 DNA 序列，其中丙二酸单酰基特异的 AT 结构域或其编码序列已被改变为另一特异性，诸如对甲基丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 和 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异。当与埃坡霉素 PKS 的其它蛋白质表达时，此类装载组件产生这样的埃坡霉素，其中埃坡霉素的噻唑环的甲基取代基分别用乙基、丙基和羟甲基取代。本发明提供了包含此类装载组件的重组 PKS 酶和用于产生此类酶及由此产生聚酮化合物的宿主细胞。当 AT 结构域改变为对 2—羟基丙二酸单酰 CoA 特异的结构域时，相应的埃坡霉素 PKS 衍生物将产生埃坡霉素 E 和 F 衍生物。2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域将在所产生的聚酮化合物的相应部位具有一个羟基的聚酮化合物；羟基可被聚酮化合物修饰酶甲基化而产生甲氧基。见例如在上表中与 FK-520 PKS 有关的引用文献。结果，此处谈到的具有 2－羟基丙二酸单酰特异的 AT 结构域同样是指由该 PKS 产生的聚酮化合物在其相应部位具有羟基或甲氧基。

埃坡霉素 PKS 的装载组件也含有 ER 结构域。该结构域可参与埃坡霉

素中噻唑部分的双键之一的形成(与其正常反应相反)，它也可为无功能的。在两种情况中的任何一种情况下，本发明提供了这样的重组 DNA 化合物，该 DNA 化合物编码带有或不带有 ER 结构域的埃坡霉素 PKS 装载组件，以及编码杂合装载组件，其中所述杂合装载组件包含用来自另一 PKS 的 ER 结构域(活性或失活的，带有或不带有伴随的 KR 和 DH 结构域)替代埃坡霉素装载组件的 ER 结构域。本发明也提供了包含此类装载组件的重组 PKS 酶和用于产生此类酶并由此产生聚酮化合物的宿主细胞。

埃坡霉素 PKS 的装载组件也可用来自异源 PKS 的装载组件替换，以形成可产生埃坡霉素衍生物的杂合 PKS。在一个实施方案中，用 NRPS 替换埃坡霉素 PKS 的装载组件，这一点在下列实施例中描述。

在埃坡霉素 PKS 装载组件之后是 PKS 的第一延伸组件，该组件为对半胱氨酸特异的 NRPS 延伸组件。该 NRPS 组件本身表达为独立蛋白质，为 epoB 基因产物。在一个实施方案中，NRPS 组件编码序列的一部分用于连接异源编码序列。在此实施方案中，本发明提供了例如将埃坡霉素 PKS 的 NRPS 组件的特异性由半胱氨酸变为另一氨基酸。也可通过构建编码序列来获得改变，编码序列中埃坡霉素 PKS NRPS 组件编码序列的全部或一部分被替换为编码具有不同特异性的 NRPS 组件的编码序列。

在一个示例的实施方案中，埃坡霉素 NRPS 组件的特异性由半胱氨酸变为丝氨酸或苏氨酸。当如此改变的 NRPS 结构域与埃坡霉素 PKS 的其它蛋白质表达时，该重组 PKS 产生了这样的埃坡霉素衍生物，其中埃坡霉素（或埃坡霉素衍生物）的噻唑部分分别变成唑或 5－甲基唑部分。这样，在一个示例的实施方案中，本发明提供了宿主细胞、载体和重组埃坡霉素 PKS 酶，其中 NRPS 结构域由埃坡霉素 NRPS 的腺苷酸化结构域替换为 entF 基因(对于丝氨酸而言)编码的 NRPS 的腺苷酸化结构域而改变。在另一示例的实施方案中，本发明提供了宿主细胞、载体和重组埃坡霉素 PKS 酶，其中 NRPS 结构域已经通过将埃坡霉素 NRPS 的腺苷酸化结构域替换为 vib F 基因(对于苏氨酸而言)编码的 NRPS 的腺苷酸化结构域而改变。在一个实施方案中，在一种埃坡霉素 PKS 中进行这些 NRPS 的替换，其中所

述埃坡霉素 PKS 中也包含结合丙二酸单酰 CoA 而非甲基丙二酸单酰 CoA 的延伸组件 2，以产生唑和甲基唑埃坡霉素衍生物的 16－去甲基衍生物。

另外，本发明提供了由不带有 NRPS 组件或带有来自异源 PKS 的 NRPS 组件的 epoA、epoC、epoD、epoE 和 epoF 基因（或其修饰变体）产物组成的重组 PKS 酶。异源 NRPS 组件可以独立的蛋白质形式表达或与 epoA 基因或 epoC 基因以融合蛋白质的形式表达。将 PKS 的一个组件替换为另一组件时，重要的是确保保留或另外应用了相容的模件间连接子序列。见 PCT 公开号 00/047724，在此引用作为参考。

在另一实施方案中，本发明提供了重组埃坡霉素 PKS 酶、相应的重组 DNA 化合物和载体，它们中的 NRPS 组件已被失活或缺失。本发明提供的失活 NRPS 组件的蛋白质和编码序列包括那些将 PCP 结构域全部或部分缺失，或将活性位点丝氨酸用于（磷酸泛酰巯基乙胺化的位点）变换为其它氨基酸（如丙氨酸）而使 PCP 结构域失活，或将腺苷酸化结构域缺失或使之失活。在一个实施方案中，装载组件和 NRPS 均被缺失或失活。在任何情况下，所产生的埃坡霉素 PKS 只要提供结合埃坡霉素 PKS 或埃坡霉素衍生物的 PKS 延伸组件 2（或一个随后的组件）的 KS 结构域的底物，然后就能够行使功能。在本发明提供的方法中，这样的修饰细胞然后用活化的酰基硫酯饲养，该酰基硫酯优选地与第二个延伸组件结合，但可能与随后的任何组件结合，并加工成新埃坡霉素衍生物。宿主细胞被饲以活化的酰基硫酯以产生本发明的新埃坡霉素衍生物。表达 PKS 的宿主细胞或含有 PKS 的无细胞提取物可被饲以或提供新前体分子 N－酰基半胱胺硫酯(NACS)来制备埃坡霉素衍生物。见PCT 公开号US99/03986 和00/044717，二者在此引用作为参考，还见以下的实施例 9 和 10。

埃坡霉素 PKS 的第二个（第一个非 NRPS）延伸组件包括 KS、甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT、DH、KR 和 ACP。埃坡霉素 PKS 的第二个延伸组件为 epoC 基因产生的独立蛋白质。全部或仅部分的第二延伸组件的编码序列可连接其它 PKS 编码序列用于产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如用丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙

二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换甲基丙二酸单酰 CoA; 缺失 DH 或 KR 或二者都缺失; 将 DH、KR 或二者替换为具有不同立体化学特异性的 DH、KR 或二者; 和/或插入 ER。所产生的异源第二延伸组件的编码序列可与其它构成 PKS 的蛋白质共表达，其中所述 PKS 合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或其它聚酮化合物。另外，可将埃坡霉素 PKS 的第二延伸组件缺失或替换为来自异源 PKS 的组件，上述来自异源 PKS 的组件可表达为独立蛋白质或与表达为与 epoB 或 epoD 基因产物融合的融合蛋白质。

示例的本发明的重组 PKS 基因包括以下重组 PKS 基因: 其中埃坡霉素 PKS 第二延伸组件的 AT 结构域编码序列已被改变或替换，从而将其编码的 AT 结构域由甲基丙二酸单酰基特异的 AT 替换为丙二酸单酰基特异的 AT。可分离此类编码丙二酸单酰基特异的 AT 结构域的核酸，例如且不限于，从编码 narbonolide PKS、soraphen PKS、雷帕霉素 PKS（即延伸组件 2 和 12）和 FK520 PKS（即延伸组件 3、7 和 8）的 PKS 基因分离。当此杂合第二延伸组件与其它构成埃坡霉素 PKS 的蛋白质共表达时，最终生成的埃坡霉素衍生物为 16－去甲基埃坡霉素。在一个实施方案中，杂合 PKS 也在延伸组件 4 包含一个甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域，且在缺乏功能性 epoK 基因的宿主细胞中表达从而所产生的化合物为 16－去甲基埃坡霉素 D。在另一实施方案中，杂合 PKS 也包含已改变的苏氨酸特异 NRPS，导致了 5－甲基唑－16－去甲基埃坡霉素的生成。

此外，本发明提供了编码重组埃坡霉素 PKS 酶及相应重组蛋白质的 DNA 化合物、载体，其中如以下的实施例 9 中所述，第二（或随后的）延伸组件已被失活或缺失。在一个优选的实施方案中，失活是通过将活性半胱氨酸位点的密码子变换为丙氨酸密码子得以实现。如以上所描述的 NRPS 组件的相应变体，所产生的重组埃坡霉素 PKS 酶不能产生埃坡霉素或埃坡霉素衍生物，除非提供可与重组 PKS 酶的其余结构域和组件结合并延伸的前体。示例的前体化合物在以下实施例 10 中描述。另外，可简单地将此类前体提供给仅表达 epoD、epoE 和 epoF 基因的宿主细胞。

埃坡霉素 PKS 的第三延伸组件包括 KS、丙二酸单酰 CoA 特异的 AT、

KR 和 ACP。埃坡霉素第三延伸组件以一种蛋白质的形式表达，为 epoD 基因产物，该基因也包含组件 4、5 和 6。为制备由于延伸组件 3 到 6 中任一延伸组件的改变而产生埃坡霉素衍生物的重组埃坡霉素 PKS，一般表达包含所有四个延伸组件的一种蛋白质。在一个实施方案中，全部或部分的第三延伸组件编码序列用于与其它 PKS 编码序列连接用以产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如用甲基丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失 KR；用具有不同立体化学特异性的 KR 替换 KR；和／或插入 DH 或 DH 和 ER。所产生的异源第三延伸组件编码序列可用于与合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS 编码序列连接。

本发明示例的重组 PKS 包括以下重组 PKS 基因：其中埃坡霉素 PKS 第三延伸组件的 AT 结构域编码序列已被改变或替换，从而将其编码的 AT 结构域由丙二酸单酰基特异的 AT 变为甲基丙二酸单酰特异的 AT。可分离此类编码甲基丙二酸单酰基特异的 AT 结构域的核酸，例如且不限于，分离自编码 DEBS、narbonolide PKS、雷帕霉素 PKS 和 FK-520 PKS 的 PKS 基因。当与埃坡霉素 PKS 或埃坡霉素 PKS 衍生物的剩余组件和蛋白质共表达时，重组 PKS 产生本发明的 14－甲基埃坡霉素衍生物。

本领域技术人员将认识到：PKS 第三延伸组件的 KR 结构域负责形成参与埃坡霉素环化的羟基。结果，去除第三延伸组件的 KR 结构域或添加 DH 或 DH 和 ER 结构域将妨碍环化，导致产生线性分子或产生在不同于埃坡霉素 A、B、C、D、E 和 F 的环化部位环化的分子。

埃坡霉素 PKS 的第四延伸组件包括 KS、可结合丙二酸单酰 CoA 或甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT、KR 和 ACP。在一个实施方案中，全部或部分的第四延伸组件编码序列用于连接其它的 PKS 编码序列，以产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了，例如用丙二酸单酰 CoA、甲基丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换丙二酸单酰 CoA 和甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失 ER；和／或替换 ER，其包括任选地替换为具不同立体化学特异性的 ER；和／或插

入 DH 或 DH 和 ER。产生的异源第四延伸组件编码序列掺入到合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的重组 PKS 的蛋白质亚单位。另外，本发明提供了埃坡霉素和埃坡霉素衍生物的重组 PKS 酶，该重组 PKS 酶的全部第四延伸组件已被缺失或被异源 PKS 组件替换。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了包含埃坡霉素 PKS 第四延伸组件编码序列的重组 DNA 化合物，其中所述第四延伸组件编码序列已改变为编码结合甲基丙二酸单酰 CoA 而非丙二酸单酰 CoA（或结合丙二酸单酰 CoA 而非甲基丙二酸单酰 CoA）的 AT。在一个实施方案中，该特异性的变化是通过突变延伸组件 4 的 AT 结构域的编码序列得以实现。此类突变可应用诱变因子（如紫外线），或通过定点诱变实现。在另一实施方案中，该特异性的变化是通过将全部或部分的延伸组件 4 AT 结构域的编码序列替换为异源 AT 结构域的编码序列而实现的。这样，本发明提供了重组 DNA 化合物、表达载体和相应的重组 PKS，其中掺入了具有甲基丙二酸单酰基特异 AT 的杂合第四延伸组件。甲基丙二酸单酰基特异的 AT 编码序列可来自（例如且不限于）：包含甲基丙二酸单酰基特异的 AT 结构域的 oleandolide PKS、DEBS、narbonolide PKS、雷帕霉素 PKS 或任一其它 PKS 的编码序列。

按照本发明，此编码序列表达的杂合第四延伸组件可掺入到埃坡霉素 PKS（或埃坡霉素衍生物的 PKS）中，一般作为衍生的 epoD 基因产物，其包含已改变的第四延伸组件以及延伸组件 3、5 和 6，其中的任一组件或多个组件可任选地为埃坡霉素 PKS 的衍生形式。本发明提供的甲基丙二酸单酰基特异的重组埃坡霉素第四延伸组件编码序列因此提供了在宿主细胞内产生所需埃坡霉素的其它方法。特别是，此类化合物将为埃坡霉素 D、B 和 F 或其衍生物，其中埃坡霉素 B 的产生依赖于功能 epoK 基因的存在。

本发明也提供了包含埃坡霉素 PKS 第四延伸组件编码序列的重组 DNA 化合物，其中所述第四延伸组件编码序列已改变为编码结合丙二酸单酰 CoA 而非甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT。本发明提供了重组 DNA 化合物、载体和相应的重组 PKS，其中该杂合第四延伸组件已被掺入到衍生的 epoD

基因产物中。当掺入到埃坡霉素 PKS (或埃坡霉素衍生物的 PKS)时，所产生的重组埃坡霉素 PKS 产生埃坡霉素 C、A 和 E，其中埃坡霉素 A 的产生依赖于是否存在功能 epoK 基因。

在另一实施方案中，本发明提供了用于产生 12－去甲基－12－乙基－埃坡霉素 D 的重组宿主细胞。在该实施方案中，本发明提供了表达重组埃坡霉素 PKS 衍生物的宿主细胞，其中所述的 PKS 衍生物延伸组件 4 的 AT 结构域已替换为例如来自 FK520 或尼达霉素 PKS 酶的乙基丙二酸单酰 CoA 特异的延伸组件。在一个实施方案中，宿主细胞为表达巴豆酰基 CoA 还原酶的宿主，所述还原酶由来自异源宿主细胞的基因(ccr 基因)编码或在异源启动子的控制下，以增加乙基丙二酸单酰 CoA 的产量。在一个实施方案中，宿主细胞为表达分离自链霉菌宿主细胞的 ccr 基因的粘球菌宿主细胞。在另一实施方案中，宿主细胞已被修饰，可表达或过表达大肠杆菌 ato A、D 和 E 基因，这些基因产物可转运丁酸酯并将其转化为丁酰 CoA，然后丁酰 CoA 转化为乙基丙二酸单酰 CoA。

除了将内源 AT 编码序列替换为甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 编码序列，也可将 KR 结构域编码序列替换为另一 KR、DH 和 KR（例如但不限于来自雷帕霉素 PKS 的组件 10 或 FK-520 PKS 的组件 1 或 5）或 DH、KR 和 ER 的编码序列。如果将 KR 替换为另一 KR，或替换成 KR 和 DH，且在延伸组件 5（或 PKS 的其它部位）中没有变化，则重组埃坡霉素 PKS 产生埃坡霉素 C 和 D，因为延伸组件 5 的 DH 结构域介导埃坡霉素 C 和 D 中 C-12-C-13 双键的形成。如果将 KR 替换为 KR、DH 和 ER，且延伸组件 5（或 PKS 的其它部位）没有变化，则重组埃坡霉素产生 12,13-二氢-埃坡霉素 C 和 D。如果将 KR 用失活 KR 替换或使 KR 失活，则重组埃坡霉素 PKS 产生 13－氧代－11，12－脱氢－埃坡霉素 C 和 D。

这样，本发明提供了这样的重组埃坡霉素 PKS，其延伸组件 4 的 KR 结构域已通过突变、缺失或用来自另一 PKS 的无功能 KR 结构域替换而失活。此重组 PKS 主要产生 13－氧代－11，12－脱氢埃坡霉素 B；该生物体产生的化合物中观察到的 C-11-C-12 双键被认为是来自新生聚酮化合物

链中由延伸组件 5 的 DH 结构域所形成的双键在延伸组件 5 的 ER 结构域还原之前双键的迁移。本发明也提供了产生该新聚酮化合物的宿主细胞。例如，黄色粘球菌菌株 K122-56(该菌株根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd., 马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且可在保藏号 PTA 2714 下得到)包含埃坡霉素 PKS 基因，其中组件 4 的 KR 结构域已通过缺失而失活，且其产生 13－氧代埃坡霉素 A 和 B 以及它们的脱氢衍生物（主要为 13－氧代－11，12 脱氢埃坡霉素 B）。本发明也提供了由该菌株产生的新埃坡霉素衍生物。

埃坡霉素 PKS 的第五延伸组件包括 KS、结合丙二酸单酰 CoA 的 AT、DH、ER、KR 和 ACP 结构域。在一个实施方案中，将包含编码埃坡霉素 PKS 第五延伸组件的序列的 DNA 化合物插入到包含编码埃坡霉素 PKS 和产生埃坡霉素衍生物的重组埃坡霉素 PKS 的序列的 DNA 化合物中。在另一实施方案中，第五延伸组件编码序列的一部分用于连接其它 PKS 编码序列，以产生杂合组件编码序列及由其编码的杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如用甲基丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换丙二酸单酰 CoA 特异的 AT; 缺失 ER、DH 和 KR 中的任何一个、两个或全部的三个; 和／或用 KR 或 DH 和 KR、KR、DH 和 ER（任选地包括具有不同立体化学特异性）替换该 ER、DH 和 KR 中的任何一个、两个或全部的三个。所产生的杂合第五延伸组件编码序列可用于连接合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS 的编码序列。另外，埃坡霉素 PKS 的第五延伸组件可被全部缺失或用异源 PKS 组件替换，以产生这样的蛋白质，其与埃坡霉素 PKS 或其衍生物的其它蛋白质一起构成产生埃坡霉素衍生物的 PKS。

本发明示例的重组 PKS 基因包括重组 epoD 基因衍生物，其中埃坡霉素 PKS 的第五延伸组件的 AT 结构域编码序列已被改变或替换，以将其编码的 AT 结构域由丙二酸单酰特异的 AT 改变为甲基丙二酸单酰基特异的 AT。此甲基丙二酸单酰基特异的基 AT 结构域编码核酸可分离自，例如且不限于编码 DEBS、narbonolide PKS、雷帕霉素 PKS 和 FK-520 PKS 的

PKS 基因。当此重组 epoD 基因衍生物与 epoA、epoB、epoC、epoE、epoF 和／或 epoK 基因(或它们的衍生物)共表达时，由它们组成的 PKS 产生 10－甲基埃坡霉素或其衍生物。本发明提供的另一重组 epoD 基因衍生物不仅包括这种改变的组件 5 编码序列，还包括编码仅结合甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT 结构域的组件 4 编码序列。当重组 epoD 基因衍生物与 epoA、epoB、epoC、epoE、epoF 和／或 epoK 基因一同掺入到 PKS 时，重组 epoD 基因衍生物产物导致 10－甲基埃坡霉素 B 和／或 D 衍生物的产生。

本发明的其它示例的重组 epoD 基因衍生物包括：埃坡霉素 PKS 的第五延伸组件的一个或多个 ER、DH 和 KR 结构域编码序列已被替换或突变以提供：(i)无功能的 ER、DH 或 KR 结构域；(ii) 仅一个功能的 KR 结构域；(iii)仅 KR 和 DH 结构域有功能；或 (iv)来自另一 PKS 的功能 ER、DH 或 KR 结构域。发现延伸组件 5 的 DH 结构域负责形成埃坡霉素 C 和 D 中的 C-12-C-13 双键，此发现提供了一种用于在任一生物体中制备埃坡霉素和埃坡霉素衍生物的本发明的新方法，其中所述生物体包括含埃坡霉素 PKS 基因的纤维堆囊菌和重组宿主细胞。此外，目前已发现延伸组件 6 的 DH 结构域也可对结合在前述组件上的新生聚酮化合物的 β －羰基起作用，可根据本发明的方法利用该发现以制备新埃坡霉素衍生物。

这样，当延伸组件 5 的所有三个结构域 KR、DH 和 ER 均缺失或失活时，重组埃坡霉素 PKS 产生埃坡霉素 A 和 B 的 13－羟基－11－氧代类似物。当 DH 和 ER 结构域缺失或失活时，重组埃坡霉素 PKS 产生 13－羟基－10，11－脱氢－埃坡霉素类，主要为 13－羟基－10，11－脱氢－埃坡霉素 D。本发明也提供了产生此新聚酮化合物的宿主细胞。例如，黄色粘球菌菌株 K122-148（该菌株根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且可在保藏号 PTA-2711 下获得）包含这样的埃坡霉素 PKS 基因，其中的延伸组件 5 的 DH、KR 和 ER 结构域被替换为仅一个 KR 结构域，且其产生 13－羟基－10，11－脱氢－埃坡霉素 D。本发明也提供了由该菌株产生的新埃坡霉素衍生物。只有当 ER 结构域缺失或

失活时，重组埃坡霉素 PKS 产生埃坡霉素 C 和 D 的 10，11－脱氢类似物，主要为 10，11－脱氢埃坡霉素。这样，一方面本发明提供了这样的重组埃坡霉素 PKS，其中延伸组件 5 的 ER 结构域通过突变缺失或失活，且其产生 10，11－脱氢－埃坡霉素 D。在另一实施方案中，本发明提供了产生 10，11－脱氢－埃坡霉素 D 的纤维堆囊菌宿主细胞，其中由于埃坡霉素 PKS 延伸组件 5 的 ER 结构域的编码序列突变而产生 10，11－脱氢－埃坡霉素 D。

本发明的这些重组 epoD 基因衍生物与 epoA、epoB、epoC、epoE 和 epoF 基因或与含其它改变（且可本身含有其它变化）的重组 epo 基因共表达，以产生制备相应埃坡霉素衍生物的 PKS。例如，本发明提供的一种重组 epoD 基因衍生物也包括编码仅结合甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT 结构域的组件 4 编码序列。如前所示，用于产生埃坡霉素 C-11 衍生物的功能类似的 epoD 基因也可通过将埃坡霉素第五延伸组件的 ER、DH 和 KR 结构域中的一个、两个或全部三个失活而得以产生。用于改变任一组件中此类结构域的另一方式是通过与取自同一或异源 PKS 编码序列的另一组件的一整套所需结构域进行替换。此方法中，PKS 的天然结构得以保留。同样，如果存在，在天然 PKS 中共同起作用的 KR 和 DH 或者 KR、DH 和 ER 结构域优选地用于重组 PKS。以上描述用于替换的示例替换结构域包括：例如且不限于，来自雷帕霉素 PKS 延伸组件 3 的失活 KR 结构域，来自雷帕霉素 PKS 延伸组件 5 的 KR 结构域；以及来自雷帕霉素 PKS 延伸组件 4 的 KR 和 DH 结构域。编码其它此类失活 KR、活性 KR 以及活性 KR 和 DH 结构域的核酸可分离自：例如且不限于，编码 DEBS、narbonolide PKS 和 FK-520 PKS 的 PKS 基因。每一种产生的 PKS 酶产生一种聚酮化合物，后者可经标准的化学方法在体外进一步衍生，以产生本发明的半合成埃坡霉素衍生物。

埃坡霉素 PKS 的第六延伸组件包括 KS、结合甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT、DH、ER、KR 和 ACP。在一个实施方案中，第六延伸组件编码序列的一部分用于连接其它 PKS 编码序列，以产生杂合组件。在此实施方案中，

本发明提供了例如将甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换为丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失 ER、DH 和 KR 中的一个、两个或全部三个；和／或将 ER、DH 和 KR 中的一个、两个或全部三个替换为 KR 或 DH 和 KR 或 KR、DH 和 ER（任选地包括具有不同立体化学特异性）。所产生的异源第六延伸组件编码序列可用于与制备埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS 的蛋白质亚单位的编码序列连接。另外，埃坡霉素 PKS 的第六延伸组件可全部被缺失或用异源 PKS 组件全部替换，以产生埃坡霉素衍生物的 PKS。

本发明的示例的重组 PKS 基因包括：埃坡霉素 PKS 的第六延伸组件的 AT 结构域编码序列已被改变或替换，以将其编码的 AT 结构域由甲基丙二酸单酰基特异的 AT 替换为丙二酸单酰基特异的 AT。编码此丙二酸单酰基特异的 AT 结构域的核酸可分离自例如且不限于编码 narbonolide PKS、雷帕霉素 PKS 和 FK-520 PKS 的 PKS 基因。当编码此杂合组件 6 的本发明的重组 epoD 基因与其它埃坡霉素 PKS 基因共表达时，该重组 PKS 产生 8－去甲基埃坡霉素衍生物。该重组 epoD 基因衍生物也可与含其它变化的重组 epo 基因衍生物共表达或可自身进一步改变，以生成制备相应 8－去甲基埃坡霉素衍生物的 PKS。例如，本发明提供的一种重组也 epoD 基因包括编码仅结合甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT 结构域的组件 4 编码序列。当与 epoA、epoB、epoC、epoE 和 epoF 基因掺入到 PKS 时，重组 epoD 基因产物导致埃坡霉素 B（如果存在功能 epoK 基因）和 D 的 8－去甲基衍生物的产生。

本发明的其它示例的重组 epoD 基因衍生物包括：埃坡霉素 PKS 第六延伸组件的 ER、DH 和 KR 结构域编码序列被替换为编码(i) KR 和 DH 结构域；(ii) KR 结构域；和(iii) 失活 KR 结构域的编码序列。当本发明的这些重组 epoD 基因衍生物与其它埃坡霉素 PKS 基因共表达时，生成了相应的 (i) C-9 烯烃、(ii) C-9 羟基(两种差向异构体，仅其中之一可经下游组件处理，除非在下一个组件中进行了额外的 KS 和／或 ACP 替换)和 (iii) C-9 酮(C-9-氧代) 埃坡霉素衍生物。也可通过失活埃坡霉素第六延伸组件

的 ER、DH 和 ER 结构域中的一个、两个或全部三个来制备功能等效的第六延伸组件。例如，本发明提供了黄色粘球菌菌株 K39-164 (该菌株根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)，10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且可在保藏号 PTA-2716 下获得)，该菌株含有这样的埃坡霉素 PKS 基因，其中延伸组件 6 的 KR 结构域已通过突变而失活，且其产生 9－酮-埃坡霉素 D。本发明也提供了由该菌株产生的新埃坡霉素衍生物。

这样，重组 epoD 基因衍生物也可与其它含其它变化的 epo 基因衍生物共表达或它们自身可进一步改变，以产生可制备相应 C－9 埃坡霉素衍生物的 PKS。例如，本发明提供的一种重组 epoD 基因衍生物也包括编码仅结合甲基丙二酸单酰 CoA 的 AT 结构域的组件 4 编码序列。当与 epoA、epoB、epoC、epoE 和 epoF 基因掺入到 PKS 时，重组 epoD 基因产物导致了埃坡霉素 B 和 D 的 C－9 衍生物的产生，这取决于是否存在功能 epoK 基因。

以上描述的用于替换的示例性替换结构域包括但不限于，来自雷帕霉素 PKS 组件 3 的失活 KR 结构域以形成酮，来自雷帕霉素 PKS 组件 5 的 KR 结构域以形成醇，以及来自雷帕霉素 PKS 组件 4 的 KR 和 DH 结构域形成了烯。其它此类失活 KR、活性 KR 及活性 KR 和 DH 结构域编码核酸可分离自，例如且不限于，编码 DEBS、narbonolide PKS 和 FK-520 PKS 的 PKS 基因。每一种产生的 PKS 酶产生一种聚酮化合物，后者在其 C－9 位包含功能基团，且可经标准的化学方法在体外进一步衍生，以产生本发明的半合成埃坡霉素衍生物。

埃坡霉素 PKS 的第七延伸组件包括 KS、甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT、KR 和 ACP。埃坡霉素 PKS 的第七延伸组件包含在 epoE 基因的基因产物内，该 epoE 基因也包含第八延伸组件。在一个实施方案中，表达包含编码埃坡霉素 PKS 第七延伸组件的序列的 DNA 化合物并形成这样的蛋白质，其与其它蛋白质一起构成了埃坡霉素 PKS 或产生埃坡霉素衍生物的 PKS。在这些及相关的实施方案中，埃坡霉素 PKS 或其衍生物的第七和第

八延伸组件一般表达为单个蛋白质，并与 epoA、epoB、epoC、epoD 和 epoF 基因或其衍生物共表达以构成 PKS。在另一实施方案中，第七延伸组件编码序列的部分或全部用于与其它 PKS 编码序列连接，以产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如用丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失 KR；替换 KR 为对不同立体化学特异的 KR；和／或插入 DH 或 DH 和 ER。所产生的异源第七延伸组件编码序列用于任选地与其它编码序列连接，以表达蛋白质，表达蛋白质与其它蛋白质一起构成合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS。另外，epoE 基因中第七延伸组件的编码序列可被缺失或被异源组件的编码序列替换，以制备重组 epoE 基因衍生物，后者与 epoA、epoB、epoC、epoD 和 epoF 基因一起进行表达以制备埃坡霉素衍生物的 PKS。

本发明示例的重组 epoE 基因衍生物包括，其中埃坡霉素 PKS 第七延伸组件的 AT 结构域编码序列被改变或替换，以将其编码的 AT 结构域由甲基丙二酸单酰特异的 AT 替换为丙二酸单酰特异的 AT。此类丙二酸单酰基特异的 AT 结构域编码核酸可分离自，例如且不限于，编码 narbonolide PKS、雷帕霉素 PKS 和 FK-520 PKS 的 PKS 基因。当与其它埃坡霉素 PKS 基因（epoA、epoB、epoC、epoD 和 epoF 或它们的衍生物）共表达时，产生用于具有 C－6 氢而非 C－6 甲基的埃坡霉素衍生物的 PKS。这样，如果基因不含其它变化，产生的化合物为 6－去甲基埃坡霉素。

埃坡霉素 PKS 第八延伸组件包括 KS、甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT、失活 KR 和 DH 结构域、甲基转移酶（MT）结构域和 ACP。 在一个实施方案中，包含编码埃坡霉素 PKS 第八延伸组件序列的 DNA 化合物与其它构成埃坡霉素 PKS 或产生埃坡霉素衍生物的 PKS 的蛋白质共表达。在另一实施方案中，第八延伸组件编码序列的部分或全部用于与其它 PKS 编码序列连接，以产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如将甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换为丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失失活 KR 和／或失活 DH；

将失活 KR 和／或 DH 替换为活性 KR 和／或 DH；和／或插入 ER。所产生的异源第八延伸组件编码序列作为一个蛋白质进行表达，表达的蛋白质用于与其它构成合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS 的蛋白质连接。另外，epoE 基因中第八延伸组件的编码序列可被缺失或被异源组件的编码序列取代以制备重组 epoE 基因，该 epoE 基因与 epoA、epoB、epoC、epoD 和 epoF 基因一同表达以制备产生埃坡霉素衍生物的 PKS。

埃坡霉素 PKS 第八延伸组件也包含具有活性的甲基化或甲基转移酶（MT）结构域，该结构域可使埃坡霉素的前体甲基化。该功能可被缺失以产生本发明的重组 epoD 基因衍生物，后者可与其它埃坡霉素 PKS 基因或其衍生物一同表达，这些基因产生的埃坡霉素衍生物在相应的埃坡霉素分子的 C－4 位缺少一个或两个甲基，这取决于第八延伸组件的 AT 结构域是否被改变为丙二酸单酰基特异的 AT 结构域。

埃坡霉素 PKS 第九延伸组件包括 KS、丙二酸单酰 CoA 特异的 AT、KR、失活的 DH 和 ACP。埃坡霉素 PKS 第九延伸组件作为一个蛋白质表达，为 epoF 基因产物，其也含有埃坡霉素 PKS 的 TE 结构域。在一个实施方案中，包含编码埃坡霉素 PKS 第九延伸组件序列的 DNA 化合物被以一个蛋白质表达，该表达的蛋白质与其它蛋白质一起构成埃坡霉素 PKS 或产生埃坡霉素衍生物的 PKS。在这些实施方案中，第九延伸组件一般表达为也包含埃坡霉素 PKS 或异源 PKS TE 结构域的蛋白质。在另一实施方案中，第九延伸组件编码序列的部分或全部编码序列用于与其它 PKS 编码序列连接以产生杂合组件。在此实施方案中，本发明提供了例如用甲基丙二酸单酰 CoA、乙基丙二酸单酰 CoA 或 2－羟基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 替换丙二酸单酰 CoA 特异的 AT；缺失 KR；替换 KR 为对不同立体化学特异的 KR；和／或插入 DH 或 DH 和 ER。例如，将延伸组件 9 的 AT 结构域替换为对甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域导致生成了这样的重组埃坡霉素 PKS，其在本发明的重组粘球菌宿主细胞中产生 2－甲基－埃坡霉素 A、B、C 和 D。所产生的异源第九延伸组件编码序列与其它蛋白质

共表达，构成了合成埃坡霉素、埃坡霉素衍生物或另一聚酮化合物的 PKS。另外，本发明提供了这样的用于合成埃坡霉素或埃坡霉素衍生物 PKS，其第九延伸组件被异源 PKS 的组件替换或全部缺失。在后一实施方案中，TE 结构域作为独立蛋白质表达或与第八延伸组件融合表达。

在另一实施方案中，本发明提供了这样的本发明宿主，其中包含异源 PKS 基因簇（该 PKS 基因簇不存在于相同类型的未加修饰、天然存在的宿主细胞）以及编码硫酯酶 II 型蛋白质（“TE II”）的基因。在一个优选的实施方案中，TE II 基因异源于 PKS 基因簇—TE II 基因并非来源于同一 PKS 的基因簇。作为一个实例，在一个实施方案中的本发明重组宿主细胞包含编码表达埃坡霉素 PKS 或埃坡霉素 PKS 衍生物的基因。根据本发明的此方面，宿主细胞被改变成含有这样的 TE II 基因，基分离自除埃坡霉素 PKS 基因簇外的 PKS 基因簇。示例的实施方案包括例如来自委内瑞拉链霉菌苦霉素 PKS 基因簇的 TE II 基因和来自纤维堆囊菌 tmbA PKS 基因簇(该 PKS 基因簇在美国专利号 6,090,601；美国专利申请系列号 144,085，于 1998 年 8 月 31 日申请；和美国临时专利申请系列号 60/271,245，2001 年 2 月 15 日申请，均在此引用作为参考)的 TE II 基因。

本发明的重组埃坡霉素衍生物的 PKS 基因通过列出杂合组件的改变的特异性（其它组件具有与埃坡霉素 PKS 相同的特异性）得以鉴定，这些 PKS 基因的示例包括:

(a) 组件 4 带有甲基丙二酸单酰特异的 AT (mmAT)和 KR，且组件 2 带有丙二酸单酰特异的 AT (mAT) 和 KR;

(b) 组件 4 带有 mmAT 且组件 3 带有 mmAT;

(c) 组件 4 带有 mmAT 且组件 5 带有 mmAT;

(d) 组件 4 带有 mmAT，且组件 5 带有 mmAT 并仅含一个 DH 和 KR;

(e) 组件 4 带有 mmAT，且组件 5 带有 mmAT 并仅含一个 KR;

(f) 组件 4 带有 mmAT，且组件 5 带有 mmAT 并仅含失活 KR;

(g) 组件 4 带有 mmAT 且组件 6 带有 mAT；

(h) 组件 4 带有 mmAT，且组件 6 带有 mAT 并仅含一 DH 和 KR；

(i) 组件 4 带有 mmAT，且组件 6 带有 mAT 且仅含一个 KR；

(j) 组件 4 带有 mmAT，且组件 6 带有 mAT 并且仅含一失活 KR；

(k) 组件 4 带有 mmAT，且组件 7 带有 mAT；

(l) 除了组件 5 含 mAT 外的(d)至(f)的杂合体；

(m) 除了组件 6 含 mmAT 外的(h)至(j)的杂合体；以及

(n) 除了组件 4 含 mAT 外的(a)至(m)的杂合体。

上面所列出的仅为例证性的，并不构成对本发明的限制，本发明包括其它重组埃坡霉素 PKS 基因和酶，它们不仅为非所示的那些带有两个杂合组件，还可带有三个或更多的杂合组件。

本发明的宿主细胞可在本领域公知的用于其它目的的条件下生长和发酵，以用来产生本发明的化合物。本发明也提供了发酵本发明的宿主细胞的新方法。本发明的化合物可分离自这些培养细胞的发酵培养基，并通过如以下实施例 3 中的方法纯化。

本发明提供了有关发酵用于产生聚酮化合物和其它产物的粘球菌的一系列方法。在本发明之前，对粘球菌的发酵并不用于生产除 TA 和番红霉素（二者由某些粘球菌菌株天然产生）之外的其它任何聚酮化合物的生产目的。这样，一方面，本发明使得可应用粘球菌作为生产宿主用于通过发酵产生有用的生物活性化合物，包括但不限于，聚酮化合物、非核糖体肽类、埃坡霉素类、脂肪酶、蛋白酶、其它蛋白质、脂类、糖脂、鼠李糖脂和聚羟基链烷酸酯。

本发明提供的方法中包括制备和储存细胞库的方法和使粘球菌菌株适应发酵培养基的方法。这些方法是重要的，因为在本发明之前，尚没有制备出适应在基于油的发酵培养基中产生的冷冻粘球菌菌株细胞库，且缺乏适应性时，粘球菌菌株往往会死亡，特别是在基于油的发酵培养基中。

本发明也提供了用于生长粘球菌的发酵方法及该方法中有用的发酵培养基。令人惊讶的是，黄色粘球菌和其它粘球菌菌株不能将碳水化合物、甘油、醇或 TCA 循环中间体作为碳源加以利用。在本发明之前，黄色粘球菌的发酵在基于蛋白质的培养基中进行。但是，在基于蛋白质的培养基

中 NH_4 累积到对生长有毒性的水平，且因此限制发酵。根据本发明，粘球菌菌株在含有作为碳源的油和／或脂肪酸的培养基中进行发酵。

在方法中有用的油和脂肪酸的示例包括且不限于，油酸甲酯；来自椰子、猪油、油菜籽、芝麻、大豆和向日葵的油类；色拉油；自身乳化的油类（如 Agrimul CoS2、R505 和 R503）；甘油油酸酯，包括甘油单油酸酯和甘油三油酸酯；奇数链的酯如十七烷酸甲酯、十九烷酸甲酯和壬酸甲酯；酯链如油酸丙酯和油酸乙酯；植物油酸甲酯；硬脂酸甲酯；亚油酸甲酯；油酸；以及纯的或来自大豆和卵黄的磷脂酰胆碱。这样，任何植物或谷类来源的油（如向日葵油或大豆油）、任何动物来源的油脂（如猪油）、任意链长的饱和或不饱和游离或酯化脂肪酸、天然和合成的脂肪酸混合物（分别如磷脂酰胆碱或壬酸甲酯）以及工业发酵的油类，如 Cognis 公司的 Agrimul 系列，均可用于方法中。在一个优选的实施方案中，发酵培养基用油酸甲酯作为碳源。一般而言，室温下为流体的油类比固体油类更为优选，主要是由于易于分散。发酵培养基的其它重要组分包括痕量金属如 Fe 和 Cu，二者在复合和特定的的培养基中以及在分批和补料分批法中提高生长和产量。包含油酸甲酯和痕量金属的培养基优选地用于埃坡霉素类的生产。

在一个实施方案中，本发明提供了用于本发明宿主细胞的发酵培养基，该培养基含有减量的或不含有动物来源的材料。由于潜在的被感染因子（诸如病毒和朊病毒）污染的可能，在发酵过程中应用动物副产物用于产生欲施与人或动物的化合物时，可优选使用含减量或不含动物来源材料的发酵培养基。提供了用于本发明方法的此类培养基。发酵培养基中含有的油类和脂肪酸可来自非动物源，例如植物。例如植物来源的油酸甲酯可由商业途径获得。此外，可将动物来源的材料替换为等效的但来自非动物源的不同材料。例如，酪胨，为酪蛋白（一种乳蛋白）的胰消化物，可用来自非动物源的蛋白质的水解产物替代，包括且不限于植物，如植物来源的蛋白质水解物。

一般而言，补料分批发酵优选地用于发酵。补料促使细胞有效地应用

营养物(例如，细胞将碳代谢为 CO_2 和 H_2O 而不是产生有毒的有机酸)。高营养水平可抑制次级代谢，且如果发酵以低于抑制阈值的速率馈与营养物，产量可更高。

本发明的发酵方法也包括具体地与埃坡霉素产生相关的方法以及用于这些方法的发酵培养基。作为一个实例，丙酸酯和乙酸酯可用于影响埃坡霉素 D：C (或 B：A) 的比率以及所获埃坡霉素的滴度。此效应在优选的油酸甲酯／痕量金属发酵培养基中是很小的，但在其它培养基如 CTS 培养基中的效应却相当显著。增加在发酵培养基中乙酸酯的含量可增加粘球菌的生长和埃坡霉素的生成。乙酸酯单独可显著提高埃坡霉素 C (或埃坡霉素 A)的滴度，且降低埃坡霉素 D（或埃坡霉素 A）的滴度。丙酸酯单独不能提高埃坡霉素的滴度，且在高浓度时可降低滴度。但是，丙酸酯和乙酸酯一起可使产物由埃坡霉素 C(或埃坡霉素 A)变为埃坡霉素 D (或埃坡霉素 B)。用于产生埃坡霉素 D 的一个优选的培养基包含酪胨、10 mM 乙酸酯和 30 mM 丙酸酯。用含奇数链脂肪酸的培养基发酵产生埃坡霉素 C 和 D 的黄色粘球菌细胞时，可减少埃坡霉素 C 的产量。痕量金属也可在存在乙酸酯而不存在任何油类的发酵培养基中增加埃坡霉素 D 的产量且提高埃坡霉素 D:C 的比率。

本发明也包含用于从发酵培养基中纯化埃坡霉素类的方法以及用于制备晶体形式埃坡霉素的方法。一般而言，纯化方法包括在发酵中将埃坡霉素捕获到 XAD 树脂、从树脂洗脱、固相提取、层析和结晶。方法在实施例 3 中详述，虽然该方法优选地且作为示例用于埃坡霉素 D，该方法通常也可用于制备结晶的埃坡霉素类，后者包括但不限于其它天然存在的埃坡霉素类和由本发明宿主细胞产生的埃坡霉素类似物。

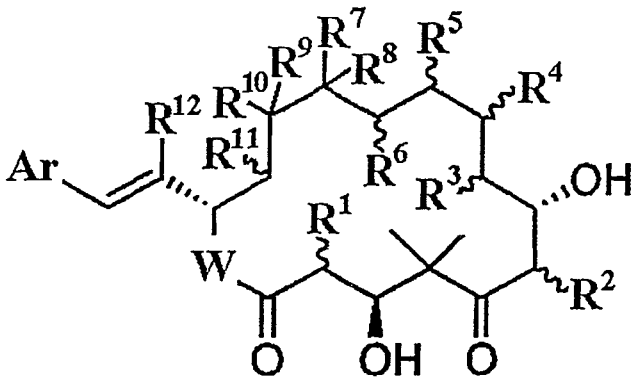
这样，在另一实施方案中，本发明以分离的或纯化的形式提供了新埃坡霉素衍生物化合物，用于农业、兽医和医学。在一个实施方案中，化合物用作杀真菌剂。在另一实施方案中，化合物用于癌症的化学治疗。在另一实施方案中，化合物用于阻止不需要的细胞生长，包括但不限于治疗过度增生性疾病如炎症、自身免疫病和银屑病，以及防止细胞在斯坦特固定

模上的生长。在一个优选的实施方案中，化合物为在抗肿瘤细胞方面至少与埃坡霉素 B 和 D 一样高效的埃坡霉素衍生物。在另一实施方案中，化合物用作免疫抑制剂。在另一实施方案中，化合物用于制造另一化合物。在一个优选的实施方案中，化合物以被制剂为混合物或溶液，用于施与人或动物。

本发明的新埃坡霉素类似物，以及由本发明宿主细胞产生的埃坡霉素类，可如在 PCT 专利公开号 93/10121, 97/19086, 98/08849, 98/22461, 98/25929, 99/01124, 99/02514, 99/07692, 99/27890, 99/39694, 99/40047, 99/42602, 99/43320, 99/43653, 99/54318, 99/54319, 99/54330, 99/65913, 99/67252, 99/67253 和 00/00485,以及在美国专利号 5, 969, 145 中所述进行衍生和制剂，它们在此引用作为参考。

本发明的化合物包括 14－甲基埃坡霉素衍生物 (通过利用本发明的杂合组件 3 而得以生成，其中所述杂合组件 3 具有结合甲基丙二酸单酰 CoA 而不是丙二酸单酰 CoA 的 AT)；8,9－脱氢埃坡霉素衍生物（通过利用本发明的具有 DH 和 KR 而不是 ER、DH 和 KR 的杂合组件 6 得以生成）；10－甲基埃坡霉素衍生物（通过利用本发明具有结合甲基丙二酸单酰 CoA 而不是丙二酸单酰 CoA 的杂合组件 5 得以生成）；9－羟基埃坡霉素衍生物（通过利用本发明具有 KR 而不是 ER、DH 和 KR 的杂合组件 6 得以生成）；8－去甲基—14－甲基－埃坡霉素衍生物（通过利用本发明的具有结合甲基丙二酸单酰 CoA 而非丙二酸单酰 CoA 的杂合组件 3 以及结合丙二酸单酰 CoA 而非甲基丙二酸单酰 CoA 的杂合组件 6 得以生成）；8－去甲基－8,9－脱氢埃坡霉素衍生物(通过利用本发明具有 DH 和 KR 而非 ER、DH 和 KR 且具有对丙二酸单酰 CoA 特异而非对甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 的杂合组件 6 得以生成）；以及 9－氧代－埃坡霉素 D。本发明的其它优选的新埃坡霉素包括以下及在实施例 11 中所描述的。

本发明的一方面，提供了下式的化合物:



I

其中：

R^1、R^2、R^3、R^5、R^{11}和R^{12}每一个独立地为氢、甲基或乙基；

R^4、R^6和 R^9每一个独立地为氢、羟基或氧；或者，

R^5和R^6一起形成碳碳双键；

R^7为氢、甲基或乙基；

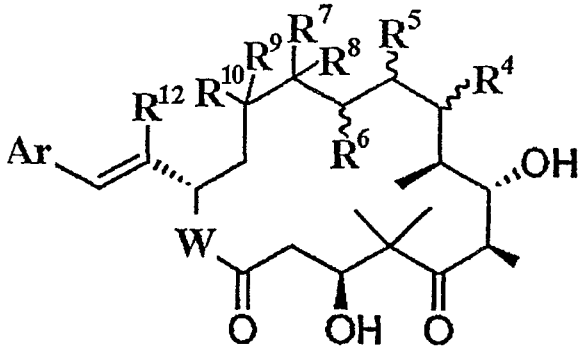
R^8和R^{10}均为氢或一起形成碳碳双键或环氧化物；

Ar是芳基；且，

W是O或NR^{13}，其中R^{13}为氢、C_1-C_{10}脂族、芳基或烷基芳基。在另一实施方案中，提供了式 I 的化合物，其中 R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{11}、R^{12}、R^{13}、Ar 和 W 为如前所述的，条件是 R^1、R^4、R^5、R^6、R^9和R^{11}中的至少一个不为氢。

在另一实施方案中，提供了式 I 的化合物，其中 R^1、R^2、R^3 和 R^{11}每一个独立地为氢或甲基；R^4和 R^9每一个独立地为氢、羟基或氧；R^5和R^6均为氢或一起形成碳碳双键；R^7和R^{12}均为甲基；R^8和R^{10}均为氢或一起形成碳碳双键；Ar 为杂芳基；且，W 为 O 或 NR^{13}，其中 R^{13}为氢或C_1-C_5烷基，条件是R^1、R^4、R^5、R^6、R^9和R^{11}中的至少一个不为氢。

在本发明的另一方面中，提供了式II的化合物



II

R^4、R^6和R^9每一个独立地为氢、羟基或氧;

R^5、R^{11}、R^{12}每一个独立地为氢、甲基或乙基;或者

R^5和R^6一起形成碳碳双键;

R^7为氢、甲基或乙基;

R^8和R^{10}均为氢或一起形成碳碳双键或环氧化物;

Ar为芳基;且,

W为O或NR^{13},其中R^{13}为氢或C_1-C_5烷基。在另一实施方案中,提供了式II的化合物,其中R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{12}、R^{13}、Ar和W为前面所描述的,条件是R^4、R^5、R^6和R^9中的至少一个不为氢。

在另一实施方案中,提供了式II的化合物,其中

R^4和R^9每一个独立地为氢、羟基或氧;

R^5和R^6每一个为氢或一起形成碳碳双键;

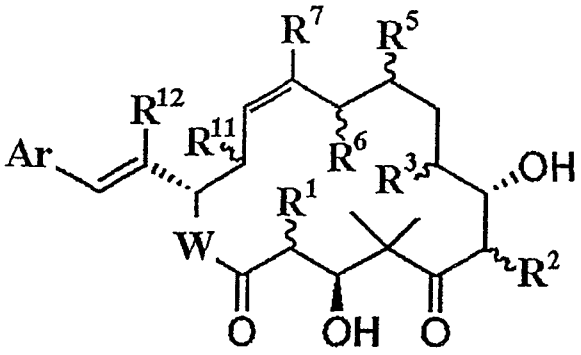
R^7和R^{12}均为甲基;

R^8和R^{10}均为氢或一起形成碳碳双键;

Ar为2-甲基-1,3-噻唑啉基、2-甲基-1,3-噁唑啉基、2-羟甲基-1,3-噻唑啉基或2-羟甲基-1,3-噁唑啉基;且,

W为O或NH,条件是R4、R5、R6和R9中的至少一个不是氢。

在本发明的另一方面中,提供了式III的化合物



III

其中 R^1、R^2、R^3、R^5、R^{11}、R^{12} 每一个独立地为氢、甲基或乙基；

R^6 为氢；或者，

R^5 和 R^6 一起形成碳碳双键；

R^7 为氢、甲基或乙基；

Ar 为芳基；且，

W 为 O 或 NR^{13}，其中 R^{13} 为氢或 C_1-C_5 烷基。在另一实施方案中，提供了式 III 的化合物，其中 R^1、R^2、R^3、R^5、R^6、R^7、R^{11}、R^{12}、R^{13}、Ar 和 W 为如先前描述的，条件是 R^1、R^5、R^6 和 R^{11} 中的至少一个不是氢。

在另一实施方案中，提供了式 III 的化合物，其中

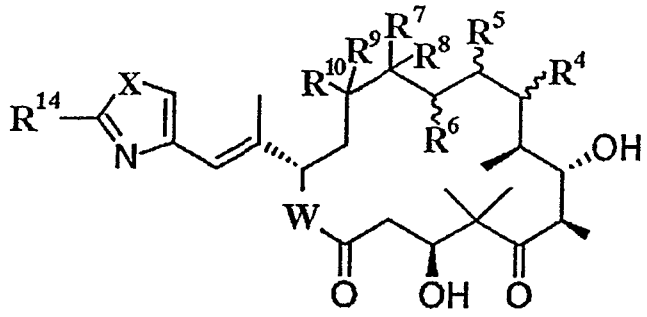
R^1、R^2、R^3、R^{11} 每一个独立地为氢、甲基或乙基；

R^5 和 R^6 均为氢或一起形成碳碳双键；

R^7 和 R^{12} 均为甲基；

Ar 为 2－甲基－1，3-噻唑啉基、2－甲基－1，3－噁唑啉基、2－羟甲基-1，3－噻唑啉基或 2－羟甲基－1，3－噁唑啉基；且，W 为 O 或 NH，条件是 R^1、R^5、R^6 和 R^{11} 中的至少一个不为氢。

在本发明的另一方面中，提供了式 IV 的化合物



IV

其中

R^4 为氢或氧;

R^5 和 R^6 均为氢或一起形成碳碳双键;

R^7 为氢或甲基; R^9 为氢或羟基;

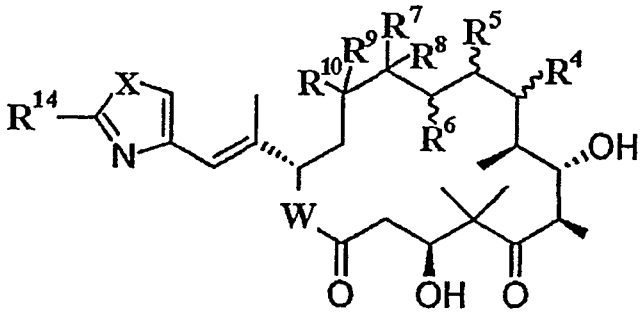
R^8 和 R^{10} 均为氢或一起形成碳碳双键或环氧化物;

W 为 O 或 NH;

X 为 O 或 S; 且

R^{14} 为甲基或羟甲基。

在本发明的另一方面中，化合物属于式 IV 的化合物



IV

其中

R^4 为氢或氧;

R^5 和 R^7 每一个独立地为氢或甲基;

R^6为氢;

R^8和R^{10}均为氢或一起形成碳碳双键或环氧化物; 或者

R^6和R^8一起形成双键;

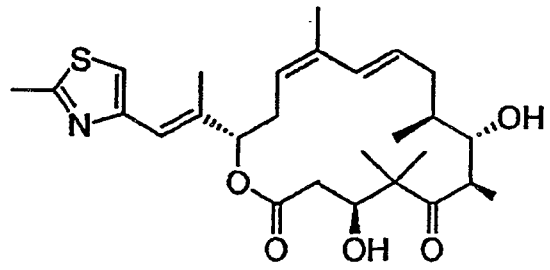
R^9为氢、羟基或氧;

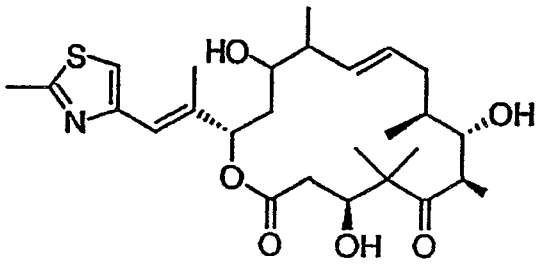
W为O或NH;

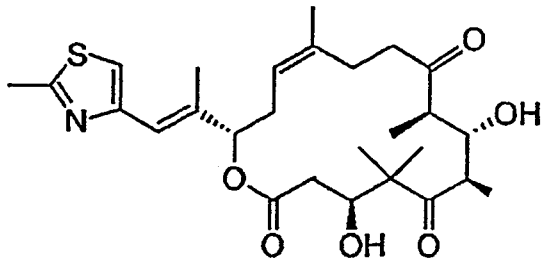
X为O或S; 且

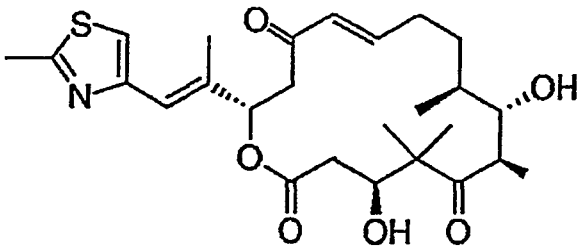
R^{14}为甲基或羟甲基。

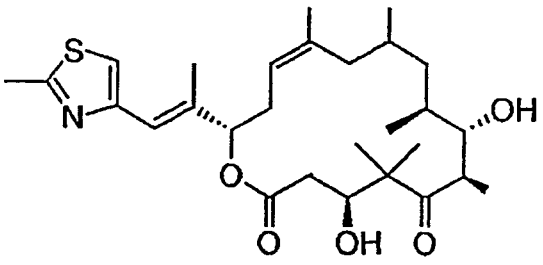
在本发明的另一方面, 提供了下列化合物:

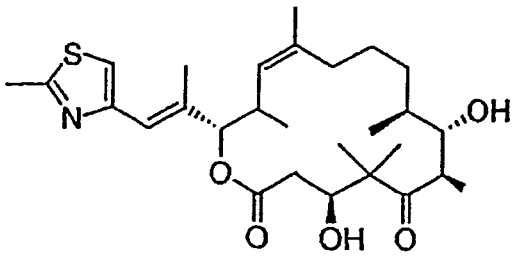


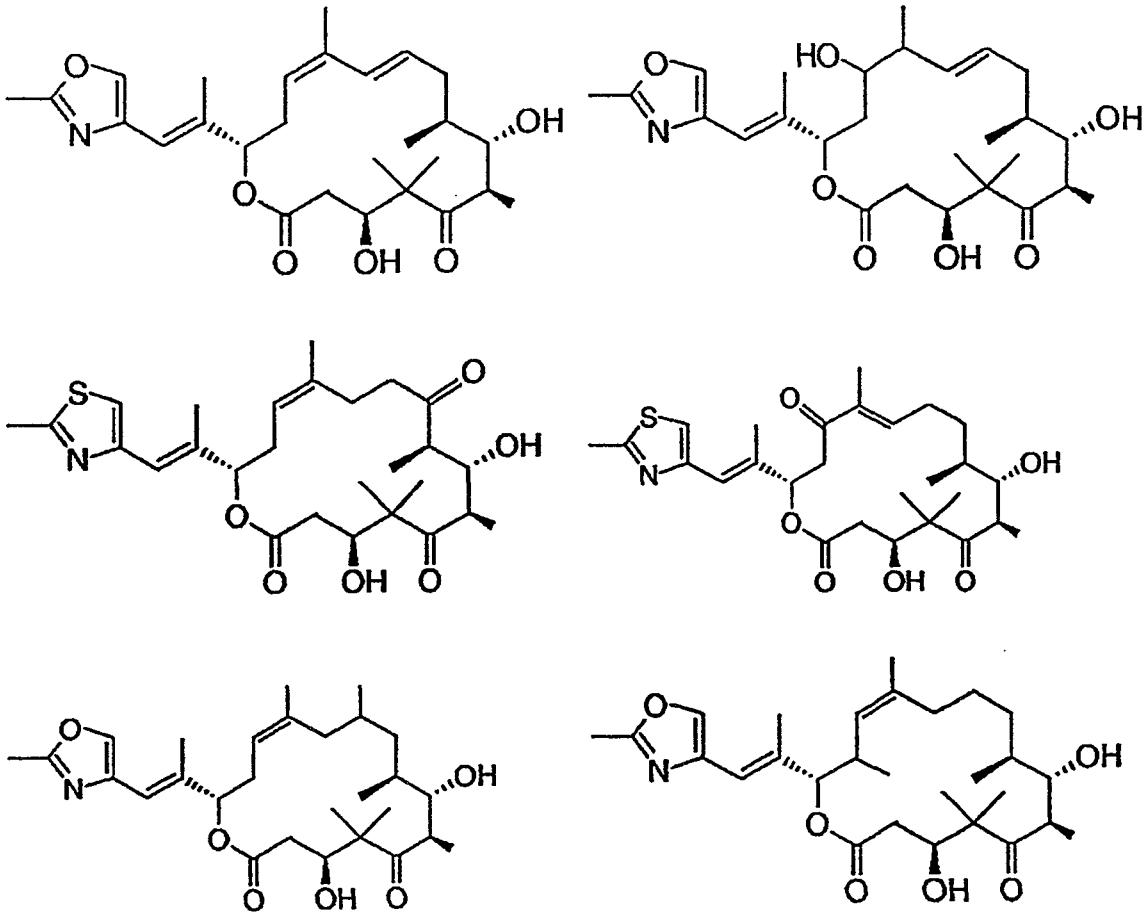








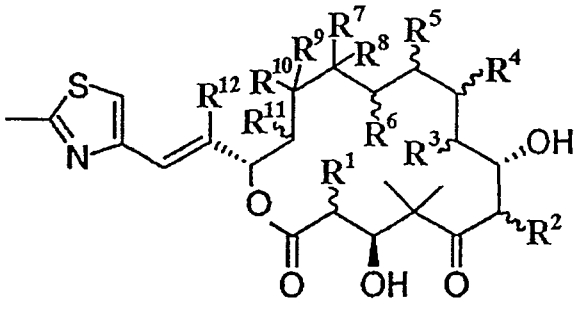




和

本发明的化合物是细胞毒性剂，可以任何适合的方式应用，包括但不限于作为抗癌剂。用于评估细胞毒性程度和微管蛋白聚合的阐述性测试在实施例 12 中描述。

可用一系列方法制造本发明的化合物。在本发明的一方面中，化合物由表达埃坡霉素 PKS 的重组宿主细胞产生。在一个实施方案中，式 V 的化合物

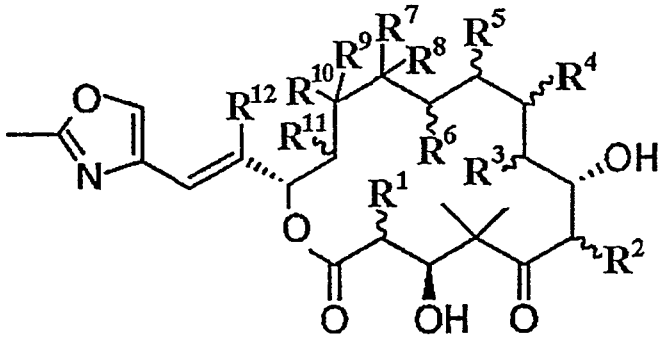


V

(其中 R^1 到 R^{12} 如先前在式 I 中所述)通过在一个或多个组件改变 AT 的特异性和/或在一个或多个组件改变酶活性结构域而制备。实施例 11 描述了改变的种类以及可由此方法生成的特定化合物。

在本发明另一实施方案中，式 V 的噁唑对应物可通过调整宿主细胞的发酵条件得以生成，其中所述宿主细胞正常条件下产生式 V 的化合物。式 V 化合物的噻唑部分源自在 NRPS 上结合半胱氨酸。埃坡霉素 H_1 和 H_2 为埃坡霉素 C 和 D 的噁唑对应物，由宿主细胞以痕量生成，且被认为是由于偶尔的丝氨酸而非半胱氨酸结合到埃坡霉素 NRPS 得以生成。

本方法利用了在埃坡霉素 PKS 的 NRPS 结合部位丝氨酸与半胱氨酸的明显竞争，且应用利于在埃坡霉素 NRPS 上结合丝氨酸而不是半胱氨酸的发酵条件。已发现在补充丝氨酸(例如高于基础水平 50 倍)的培养基中培养宿主细胞导致主要生成了含噁唑的化合物，而不是通常产生的含噻唑的化合物。结果，设计为制备特定埃坡霉素化合物或式 V 化合物的重组宿主细胞可在补充丝氨酸的培养基中生长，以使这些同样的细胞现在有利于产生噁唑对应物即式 VI 的化合物:



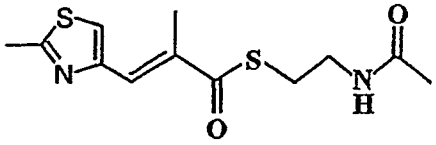
VI

换言之，本方法是一个简单和巧妙的付出一次代价获得两种化合物的途径，所述化合物一种对应于式 V，且它的对应物对应于式 VI。补充丝氨酸用于制备含噁唑化合物的方法在实施例 13 中更为详细地进行了描述。该实施例描述了用于降低由 K111-40-1 菌株正常产生的埃坡霉素 D 和 C 的水平以利于分别生成埃坡霉素 H_2 和 H_1 以及埃坡霉素 D 和 C 的噁唑对应

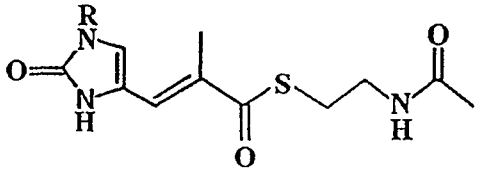
物的条件，产生本发明的其它式 V 化合物的其它重组构建体可应用制备式 VI 化合物的类似条件进行培养。

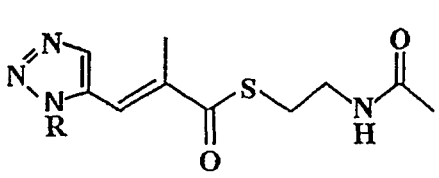
在本发明的另一方面，可用称为化学生物合成法的方法生产化合物。该方法应用的埃坡霉素 PKS 已经以某种方式发生了改变，使得 PKS 在指定部位接受并结合一种合成的前体。该合成前体然后由 PKS 以常规方式从该结合点向前加工。

化学生物合成法所需的改变类型的示例在实施例 9 中描述，该实施例描述了一株黄色粘球菌菌株的 KS2 敲除变体的构建，其中所述黄色粘球菌菌株通常以埃坡霉素 A、B、C 和 D 作为主产物生成。KS2 敲除是指失活延伸组件 2 的 KS 结构域，以使产生的 PKS 不能装载和处理先前组件、装载结构域和 NRPS（认为是延伸组件 1）的产物。结果，PKS 指导的合成在延伸组件 2 的 ACP 处停止，且该菌株在缺少合成前体时不能生成埃坡霉素产物。但是，当提供给菌株合成前体时，该前体物与装载结构域和延伸组件 1 的产物类似，这样延伸组件 2 的 ACP 结合前体且 PKS 从该点向前加工前体。例如，提供给实施例 9 中的敲除菌株以合成前体



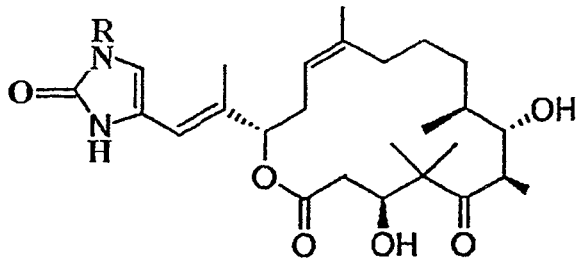
导致生成了埃坡霉素 B 和 D（埃坡霉素 A 和 B 也生成但以痕量生成），如在实施例 10 中更详细描述的。也见图 1。在另外的实施例中，提供给实施例 9 中的敲除菌株以合成前体，例如，



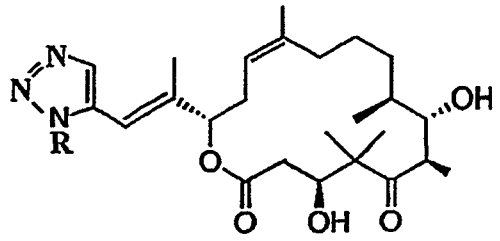


其中 R 为氢、羟基、卤素、氨基、C_1-C_5烷基、C_1-C_5羟基烷基、C_1-C_5烷氧基以及 C_1-C_5氨基烷基，更优选地为氢或甲基，得到了下列埃坡霉素化

合物

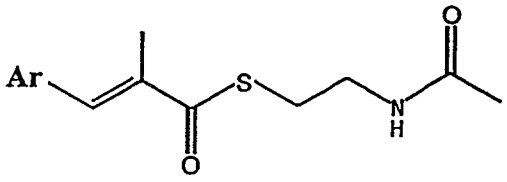


和



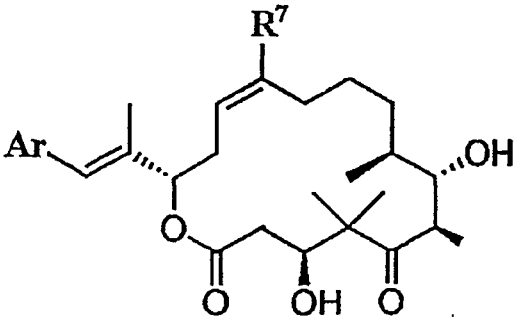
以及它们分别的 12, 13 - 环氧对应物。

这样，通过改变合成前体，单一的 KS2 敲除菌株可用于制备大量的化合物。实际上，在实施例 9 中描述的菌株可通过提供下式的合成前体

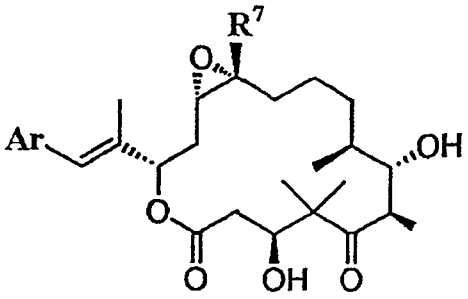


IX

来制备下式的化合物

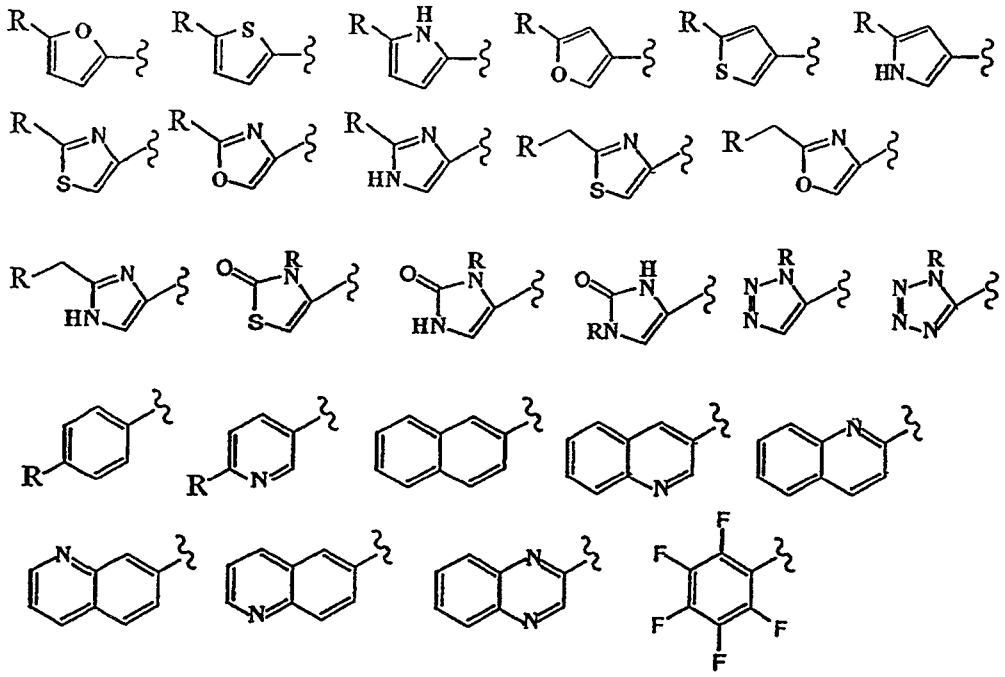


和



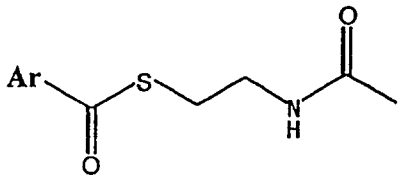
VII VIII

其中 Ar 为芳基且 R^7 为氢或甲基。合适的芳基的示例包括但不限于



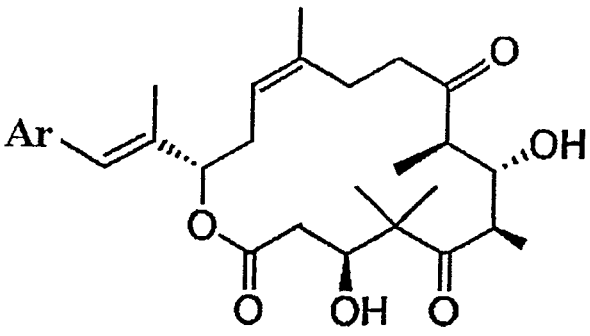
其中 R 为氢、羟基、卤素、氨基、C_1-C_5烷基、C_1-C_5羟基烷基、C_1-C_5烷氧基、C_1-C_5氨基烷基。在更优选的实施方案中，R 为氢或甲基。实施例 10 描述了个多种前体的合成以及它们在化学生物合成中的用途，及它们分别的 12，13－环氧对应物。

在另一实施方案中，装载结构域组件敲除用于生成本发明的某些化合物。例如，用于实施例 9 中的起始材料的装载结构域敲除也可通过提供下式的合成前体用于制备式 VII 和 VIII 的化合物。



在其它实施方案中，制备了本发明的其它菌株的 KS2 或装载结构域敲除体，其中所述敲除体包括但不限于那些在实施例 11 中描述的菌株，且用于产生带有除 2－甲基噻唑外的芳基部分的化合物。例如，将式 IX 的合成前体馈与一种主要产生 9－氧代－埃坡霉素 D 构建体的 KS2 敲除体将产

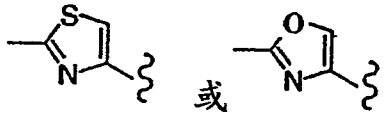
生下式的化合物



X

其中 Ar 为芳基。

在本发明的另一方面，从表达埃坡霉素 PKS 的宿主细胞产生的化合物可用生物法和／或合成法进一步修饰。在一个实施方案中，式 I 的化合物中 Ar 为



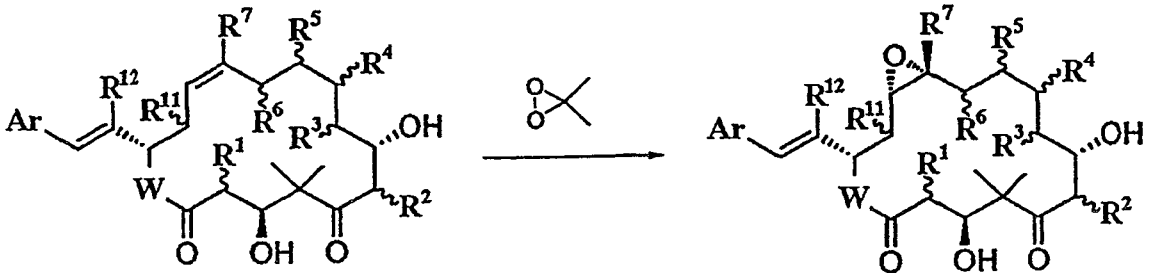
可用微生物来源的羟化酶在 C－21 碳处进行羟化。用于完成此转变的方法例如在 PCT 公开号 WO 00/39276 中描述（其全部并入本文作为参考）以及此处的实施例 14 中描述。

在另一实施方案中，在相应于埃坡霉素 A－D 的 C－12 和 C－13 位具有碳碳双键的本发明化合物可用 EpoK 或另一 P450 环氧酶环氧化。用 EpoK 进行环氧化作用的通用方法在 PCT 公开 WO 00/31247 的实施例 5 描述（其在此引用作为参考），以及此处的实施例 15 中描述。另外，环氧化反应可通过将含有双键的埃坡霉素化合物与表达功能 Epo K 的细胞培养物接触而进行，其中所述双键的位置对应于 C-12 和 C－13 之间的键。此类细胞包括粘球菌目纤维堆囊菌。在特别优选的实施方案中，纤维堆囊菌表达 Epo K 但不含有功能埃坡霉素聚酮化合物合酶(“PKS”)基因。此类菌株可通过诱变获得，其中在埃坡霉素 PKS 基因中的一处或多处突变使得

菌株无效力。 此类突变体可天然存在(可通过筛选发现) 或可通过应用如化学诱变剂或射线或通过遗传操作来实现。用于制备带有无效埃坡霉素 PKS 的菌株的一个尤其有效的策略是同源重组，如在 PCT 公开 WO 00/31247 中所描述的。

在另一实施方案中，环氧化反应可用合成进行法。例如，如在图解 2 中所示，本发明的脱氧化合物可通过将脱氧化合物与二甲基二氧杂环丙烷（dimethyldioxirane）反应而转变成环氧对应物。

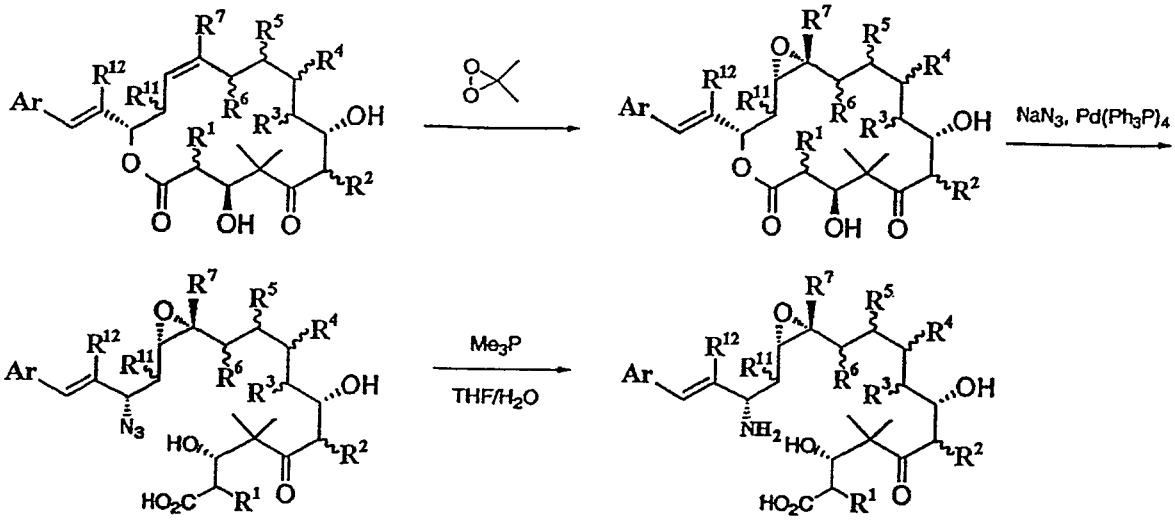
图解 2



实施例 16 更为详细地描述了该合成方法。

在另一实施方案中，本发明的大环内酯可转变为本发明的大环内酰胺。如在图解 3 中所述的，本发明的脱氧大环内酯如先前图解 2 中所描述的用二甲基二氧杂环丙烷环氧化以提供含氧对应物。

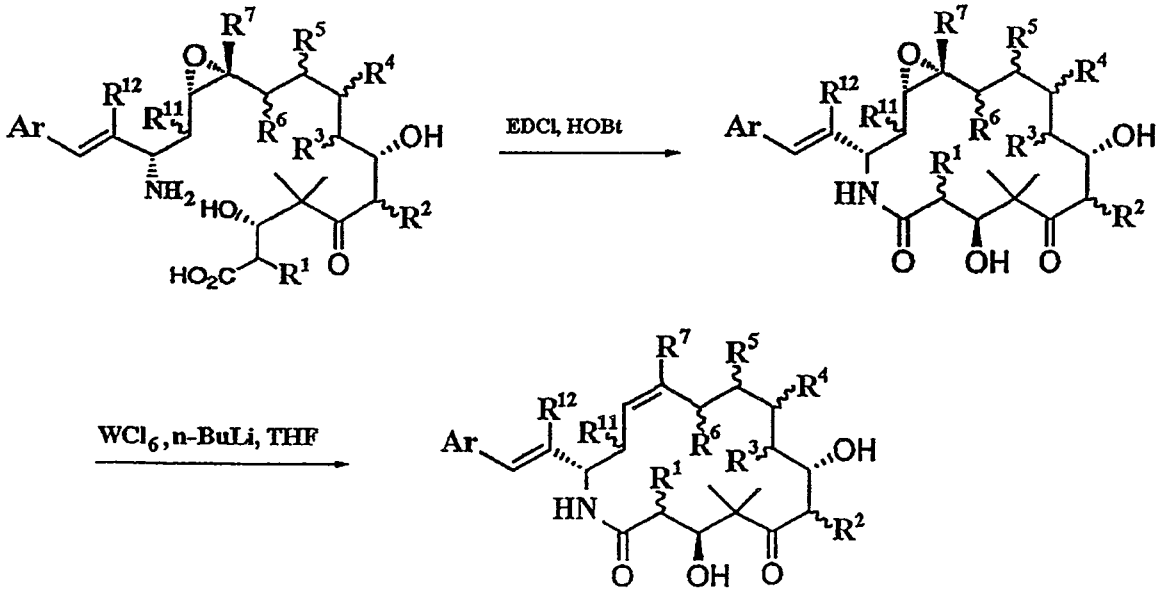
图解 3



含氧大环内酯用叠氮化钠和四(三苯基膦)钯处理以打开环并形成叠氮酸。然后叠氮化物用三甲基膦还原以形成氨基羧酸。

本发明的 W 位置为 NH 的环氧化合物可由氨基羧酸的大环内酰胺化得以生成。

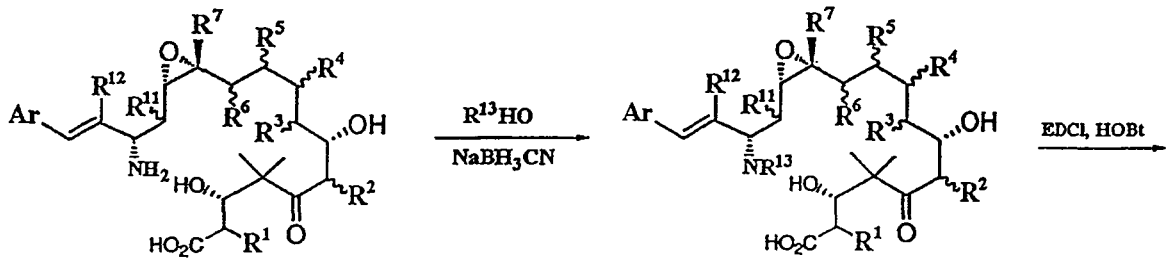
图解 4

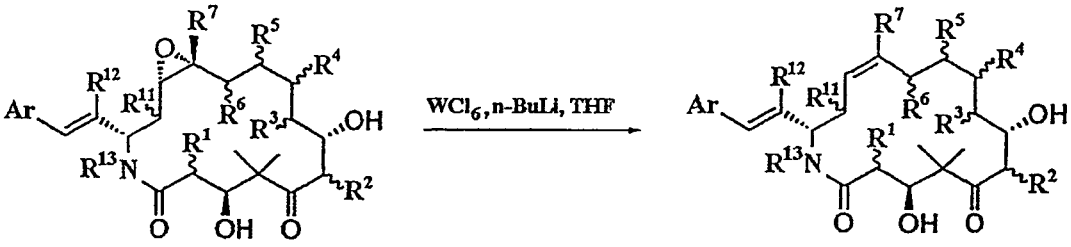


如图解 4 所示，氨基羧酸用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基-碳二亚胺和 1-羟基苯并三唑处理以形成环氧-大环内酰胺。脱氧-大环内酰胺可通过用六氯化钨和丁基锂处理环氧-大环内酰胺得以生成。

本发明的 W 位置为 NR^{13} 且 R^{13} 非氢的环氧-化合物可通过在大环内酰胺化之前用醛和氰基氢硼化钠处理氨基羧酸得以生成。

图解 5





如图解 5 所示，氨基羧酸用醛、$R^{13}HO$ 和氰基氢硼化钠处理以形成取代氨基酸，然后该氨基酸被大环内酰胺化且任选地如图解 4 中所述去氧，以提供 R^{13} 不为氢的环氧化和脱氧大环内酰胺。

制造本发明大环内酰胺的合成方法也在实施例 17－19 中更为详细地描述。实施例 17 描述了应用 9-氧代-埃坡霉素作为示例的起始材料来形成氨基酸。实施例 18 和 19 分别描述了 9-氧代-埃坡霉素 D 环氧大环内酰胺变体和脱氧大环内酰胺变体的形成。实施例 20 和 21 分别描述了 9-氧代-埃坡霉素 D 环氧大环内酰胺变体和脱氧大环内酰胺变体的形成。

本发明的组合物往往包含本发明的化合物和可药用载体。本发明化合物可为游离形式，或根据需要，可为所发明化合物的可药用衍生物，如其前体药物、其盐和酯。组合物可为任何适宜的形式，如固体、半固体或流体。见药物剂型和药物释放体系（Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems），第 5 版， Lippicott Williams & Wilkins (1991)，在此引用作为参考。一般而言，药物制品包含作为活性成分的一种或多种本发明的化合物，其与适于外部、肠道或非肠道施用的有机或无机载体或赋形剂混合。活性成分可与例如通常的无毒、药学可接受载体化合，用于制备片剂、小丸剂、胶囊剂、栓剂、阴道栓剂、溶液、乳剂、悬浮剂以及任一其它适用剂型。可用的载体包括水、葡萄糖、乳糖、阿拉伯树胶、明胶、甘露醇、淀粉糊、三硅酸镁、滑石、玉米淀粉、角蛋白、胶态二氧化硅、马铃薯淀粉、尿素，以及其它适用于生产固体、半固体或流体形式制剂的载体。此外，也可应用辅助的稳定剂、增稠剂和着色剂。

在一个实施方案中，包含本发明化合物的组合物不含 Cremophor®)

的发明化合物。Cremophor® (BASF Aktiengesellschaft)为聚乙氧基化的蓖麻油，其在制剂低溶解度药物时用一般用作表面活性剂。但是，因为Cremophor®可对受试者引起过敏反应，因此减少或消除 Cremophor®的组合物为优选的。消除Cremophor®的埃坡霉素 A 或 B 的制剂在例如 PCT 公开 WO 99/39694（其在此引用作为参考）中有所描述，并可适宜用于本发明的化合物。

根据需要，本发明的化合物可制剂成微胶囊和纳米级颗粒。例如于医学和制药中的微胶囊和纳米级颗粒（Microcapsules and Nanoparticles in Medicine and Pharmacy），Max Donbrow 编辑, CRC Press (1992)和美国专利号 5, 510, 118 ; 5, 534, 270 和 5, 662, 883 中描述了常规方法，均在此引用作为参考。通过增加表面积对体积的比率，这些剂型使得不适合经口递送的化合物可经口递送。

本发明的化合物也可用先前描述用于低溶解度药物的其它方法来进行制剂。例如，化合物可与维生素 E 或其 PEG 化的衍生物形成乳剂，如在 WO 98/30205 和 00/71163 中所描述的，它们在此引用作为参考。一般将来发明的化合物溶解在含乙醇（优选的为低于 1 % w/v）的水溶液中。加入维生素 E 或 PEG 化的维生素 E。然后移去乙醇以形成可制剂成用于静脉或经口途径施用的前乳剂。另一策略涉及将本发明化合物包裹入脂质体中。用于形成作为药物递送载体的脂质体的方法在本领域已为人熟知。合适的方法包括在美国专利号 5, 683, 715 ; 5, 415, 869 和 5, 424, 073 中所描述的涉及另一相对低溶解度的癌症药物紫杉醇的方法，在此引用作为参考，以及在 PCT 公开 WO 01/10412 中所描述的涉及埃坡霉素 B 的方法，在此引用作为参考。可应用的多种脂类中，特别优选地用于制备胶囊化埃坡霉素脂质体的脂类，其包括磷脂酰胆碱和聚乙二醇衍生的二硬脂基磷脂酰乙醇胺。实施例 22 提供了用于制备含 9-氧代-埃坡霉素 D 的脂质体的示例性方法，该通用方法易于改变为制备含本发明其它化合物的脂质体的方法。

然而另一方法涉及用聚合物制剂本发明的化合物，其中聚合物如生物聚合物或生物相容的聚合物（合成的或天然存在的）。生物相容的聚合物

可分类为可生物降解的和非生物降解的。可生物降解的聚合物的体内降解与化学组合物、生产方法和内植体的结构相关。合成的聚合物的示例包括聚酐类、多羟基酸（如聚乳酸、聚乙二醇酸及其共聚体）、聚酯类、聚酰胺类、聚原酸酯以及一些多磷腈。天然存在的聚合物的示例包括蛋白质和多糖如胶原、透明质酸、白蛋白和明胶。

另一方法涉及将本发明的化合物结合到可增加水溶解度的聚合物。适宜的聚合物的示例包括聚乙二醇、聚-(d-谷氨酸)、聚-(l-谷氨酸)、聚-(l-谷氨酸)、聚-(d-天冬氨酸)、聚-(l-天冬氨酸)、聚-(l-天冬氨酸)及其共聚物。具有分子量在约 5,000 到约 100,000 之间的聚谷氨酸是优选的，更为优选的是具有分子量在约 20,000 到 80,000 之间，且最为优选的是具有分子量在约 30,000 到 60,000 之间。聚合物通过酯键共轭连接到本发明的埃坡霉素的一个或多个羟基，所用方法为如在美国专利号 5,977,163（在此引用作为参考）以及实施例 23 中所描述。优选的结合部位包括：在为本发明的 21－羟基衍生物的情况下，结合部位为 21－碳的羟基。其它结合部位包括 3－碳上的羟基和 7－碳上的羟基。

在另一方法中，本发明的化合物连接到单克隆抗体。该策略使得本发明的化合物靶向特定靶标。用于设计和应用结合抗体的常用方法在基于单克隆抗体的癌症治疗（Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer），Michael L. Grossbard,编辑(1998)一书中描述，在此引用作为参考。

可与载体材料结合以产生单一剂型的活性成分的量随受治疗的受试者以及具体的施用模式而有所变化。例如，用于静脉内施用的制剂含本发明化合物的剂量为从约 1 mg/mL 到约 25 mg/mL，优选地从约 5 mg/mL 到约 15 mg/mL，且更优选地为约 10 mg/mL。静脉内制剂一般用普通生理盐水或 5％葡萄糖溶液在使用前稀释约 2 倍到 30 倍之间。

在本发明的一个方面，本发明的化合物用于治疗癌症。在一个实施方案中，本发明的化合物用于治疗头、颈部的癌症，其包括头、颈、鼻腔、鼻旁窦、鼻咽、口腔、口咽、喉、下咽部、唾液腺和副神经节瘤的肿瘤。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗肝和胆管树的癌症，特别是

肝细胞癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗肠道癌症，特别是结肠直肠癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗卵巢癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗小细胞和非小细胞肺癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗乳腺癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗肉瘤，其包括纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、胚胎横纹肌肉瘤、平滑肌瘤、神经纤维肉瘤、骨肉瘤、滑膜肉瘤、脂肪肉瘤和软组织腺泡状肉瘤。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗中枢神经系统肿瘤，特别是脑癌。在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗淋巴瘤，其包括何杰金氏淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、滤泡淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、外膜细胞淋巴瘤、B-细胞系大细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤和 T 细胞退行发育的大细胞淋巴瘤。

本方法包括给患癌症的受试者施用治疗有效量的本发明化合物。必要时可重复该方法以限制（即防止进一步的生长）或消除癌症。临床上，该方法的应用会导致癌性肿物大小或数量的减少和／或相关症状的减轻（如果适用的话）。病理方面，该方法的应用将产生至少以下情况之一：抑制癌细胞增殖、减小癌或肿瘤的大小、防止进一步转移以及抑制肿瘤血管生成。

本发明的化合物和组合物可用于联合治疗。换言之，本发明的化合物和组合物可在一个或多个其它所需的治疗方法或医学方法的同时、之前或之后施用。在联合疗法中治疗和方法的具体联合应考虑到治疗和／或方法以及所要达到的治疗效果的相容性。

在一个实施方案中，本发明的化合物和组合物用于与其它抗癌剂和方法联合。其它抗癌剂的示例包括但不限于：(i) 烷基化药物如氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、苯丙氨酸氮芥、异环磷酰胺；(ii) 抗代谢物如氨甲蝶呤；(iii) 微管稳定剂如长春灭瘟碱、紫杉醇、多西他赛（docetaxel）和 discodermolide；(iv)血管发生抑制剂；以及(v)细胞毒抗生素如阿霉素、博来霉素和丝裂霉素。其它抗癌方法的示例包括：(i)外科；(ii) 放射疗法和(iii)光动力学疗法。

在另一实施方案中，本发明的化合物和组合物用于与试剂和方法联合应用，以减轻本发明的化合物或组合物的潜在副作用，如腹泻、恶心和呕吐。腹泻可用抗腹泻剂治疗，如阿片样物质 (例如可待因、苯乙哌啶、氰苯哌啶和 loeramide)、碱式水杨酸铋和奥曲肽。恶心和呕吐可用止吐剂治疗，如地塞米松、甲氧氯普胺、二苯甲氧乙胺、安定、奥丹西隆、氯丙嗪、硫乙拉嗪和屈大麻酚。对那些包括聚乙氧基化的蓖麻油如 Cremophor®，用皮质类固醇如地塞米松和甲基脱氧皮质醇和／或 H_1 拮抗剂（如盐酸二苯羟基胺）和／或 H_2 拮抗剂进行预处理可用于缓解过敏反应。用于静脉使用的制剂和预处理治疗方案的示例分别在实施例 24 和 25 中描述。

在本发明的另一方面，本发明的化合物用于治疗以细胞过度增生为特征的非癌病症。在一个实施方案中，本发明的化合物用于治疗银屑病，该病以角化细胞的细胞性过度增生并在皮肤表面形成隆起的有磷屑的损害为特征。方法包括给患银屑病的受试者施用治疗有效量的本发明的化合物。如果需要可重复本方法以减少损害的数目或严重程度或消除损害。在临床上，该方法的应用导致了皮肤病灶大小和数量的减少，皮肤症状(受损皮肤的疼痛、烧灼感和出血)的减轻和／或相关症状的减轻（例如，关节红、热、肿、腹泻、腹痛）。在病理上，该方法的应用将导致至少以下之一：抑制角化细胞增生、减少皮肤炎症 (例如，通过影响吸引因子和生长因子、抗原呈递、产生活性氧类和基质金属蛋白酶)以及抑制皮肤的血管发生。

在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗多发性硬化症，该疾病以脑的渐进性脱髓鞘为特点。尽管参与髓磷脂丧失的确切机制还不清楚，但存在星形胶质细胞增生的增加和髓磷脂损害区域的积聚。在这些部位，有巨噬细胞样活性和增强的蛋白酶活性，这些至少部分对髓鞘的降解负有责任。方法包括给患多发性硬化症的受试者施用治疗有效量的本发明化合物。如果需要，该方法可以重复以抑制星形胶质细胞增生和／或减轻运动功能丧失的程度和／或防止或减轻疾病的慢性进程。临床上，应用该方法可导致改善视觉症状（视力丧失、复视）、步态障碍 (虚弱、轴向不稳、感觉缺失、痉挛状态、反射亢进、灵巧性丧失)、上肢极度功能障碍(虚弱、

痉挛状态、感觉缺失)、膀胱功能障碍 (尿急、尿失禁、尿迟疑、排尿不完全)、抑郁症、情绪不稳定和认知缺损。病理上，该方法的应用导致一种或多种以下情况的减轻，如髓磷脂损失、血脑屏障的破坏、血管周围单核细胞浸润、免疫异常、胶质瘢痕形成和星形胶质细胞增生、金属蛋白酶生成以及传导速率受损。

在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗类风湿性关节炎，该疾病为多系统的慢性复发性炎性疾病，有时导致受损关节的损坏和关节强硬。类风湿性关节炎以滑膜的显著增厚（增厚的滑膜形成放射状延伸到关节腔）、滑膜细胞排列为多层（滑膜增生）、白细胞（巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞和淋巴小结；称为“炎性滑膜炎”）浸润滑膜以及纤维蛋白与坏死细胞在滑膜的沉积为特点。此过程最终形成的组织称为关节翳，且最终关节翳将生长至充满关节腔。关节翳在血管发生过程中形成了广泛的新血管网络，其中所述血管发生是滑膜炎进程中所必须的。来自关节翳组织细胞的消化酶的释放(基质金属蛋白酶(例如胶原酶、溶基质素)和炎症过程中的其它介质(例如过氧化氢、超氧化物、溶酶体酶和花生四烯酸代谢产物)导致软骨组织的渐进性破坏。关节翳侵袭关节软骨导致软骨组织的腐蚀和断裂。最终在所涉及的关节发生软骨下骨的腐蚀，发生纤维性关节强直并最终骨性关节强直。

方法包括给患类风湿性关节炎的受试者施用治疗有效量的本发明化合物。如果需要可重复该方法以抑制滑膜细胞增生和／或减轻受影响关节运动损失的程度和／或预防或减轻疾病的慢性进程。临床上，应用该方法可导致一种或多种以下情况： (i) 降低症状（受损关节的疼痛、肿胀和触痛；早晨强直、虚弱、疲劳、厌食和体重减轻）的严重性； (ii)减轻疾病临床指征（关节囊的增厚、滑膜肥大、关节渗出、软组织挛缩、运动幅度减少、关节强硬和刚性连接畸形）的严重性; (iii)减少疾病关节外的表现 (风湿性小结、脉管炎、肺小结、间质纤维化、心包炎、巩膜外层炎、虹膜炎、Felty综合征、骨质疏松征); (iv)增加疾病缓解／无症状时期的频率和持续时间; (v)预防固定的损害和失能; 和／或 (vi)预防／减轻疾病的慢性进程。病理

上，应用本发明将产生至少一种的如下情况：(i)减轻炎性反应；(ii)破坏炎性细胞因子(如 IL-I、TNFa、FGF、VEGF)的活性；(iii)抑制滑膜细胞增生；(iv)抑制基质金属蛋白酶的活性，和／或(v)抑制血管发生。

在另一实施方案中，本发明的化合物用于治疗动脉粥样硬化和／或再狭窄，特别是用于可能会应用血管内斯坦特固定模治疗阻塞的患者。动脉粥样硬化为慢性的血管损伤，其中动脉壁的一些正常血管平滑肌细胞（“VSMC”）（通常控制血管紧张度以调控血流）改变它们的特性，并显现出“癌样”行为。这些 VSMC 变得非正常增生，分泌物质（生长因子、组织降解酶和其它蛋白质）以使其能够侵入和扩散到血管内层、阻塞血流且使该血管异常敏感易于被局部血凝块完全堵塞。再狭窄为矫正操作后再发生的狭窄或动脉狭窄，是动脉粥样硬化的加重形式。

本方法包含在斯坦特固定模上包被治疗有效量的本发明的化合物，并将斯坦特固定模递送到患动脉粥样硬化受试者的发病动脉。用化合物包被斯坦特固定模的方法在例如美国专利号 6, 156, 373 和 6, 120, 847 中描述。临床上，应用本发明可导致一种或多种以下情况：(i)增加动脉血流；(ii)降低疾病临床指征的严重性；(iii)降低再狭窄的速率；或(iv)防止／减轻动脉粥样硬化的慢性进程。病理上，应用本发明可在斯坦特固定模植入的部位产生至少一种以下情况：(i) 降低炎症反应；(ii)抑制 VSMC 分泌基质金属蛋白酶；(iii) 抑制平滑肌细胞的积聚；和(iv)抑制 VSMC 表型的去分化。

在一个实施方案中，对患癌症或以细胞增生为特点的非癌病症的受试者的用药剂量水平从约 1 mg/m^2 到约 200 mg/m^2 的等级，药物可以大丸剂施用(以任一适宜的施用途径)或按需要每周、每两周或每三周连续静脉输液 (例如 1 小时、3 小时、6 小时、24 小时、48 小时或 72 小时)。但应当理解，任何特定患者的特定剂量水平依赖于一系列的因素。这些因素包括应用的特定化合物的活性；受试者的年龄、体重、总体健康情况、性别和饮食；药物的施用时间和途径及药物排泄的速率；是否在治疗中联合应用药物；以及受治疗疾病的严重程度。

在另一实施方案中，剂量水平根据需要和可忍受的程度每三周一次，

从约 10 mg/m^2 到约 150 mg/m^2，优选地从约 10 到约 75 mg/m^2，且更优选地从约 15 mg/m^2 到约 50 mg/m^2。在另一实施方案中，剂量水平根据需要和可忍受的程度每两周一次，从约 1 mg /m^2 到约 150 mg/m^2，优选地从约 10 mg/m^2 到约 75 mg/m^2 且更优选地从约 25 mg/m^2 到约 50 mg/m^2。在另一实施方案中，剂量水平根据所需或可忍受的程度每周一次，从约 1 mg/m^2 到约 100 mg/m^2，优选地从约 5 mg/m^2 到约 50 mg/m^2，且更优选地从约 10 mg/m^2 到约 25 mg/m^2。在另一实施方案中，剂量水平根据需要或可忍受的程度每天一次，从约 0.1 到约 25 mg/m^2，优选地从约 0.5 到约 15 mg/m^2，且更优选地从约 1 mg/m^2 到约 10 mg/m^2。

以上提供了本发明的详细描述，给出以下的实施例用于阐述本发明，且不应构成对本发明或权利要求范围的限制。

实施例 1

黄色粘球菌表达载体的构建

提供整合和附着功能的噬菌体 Mx8 的 DNA 插入到市售的 pACYC184 (New England Biolabs)。从质粒 pPLH343（见 Salmi 等, 1998 年 2 月，细菌学杂志 180 (3) : 614-621）分离 ~2360 bp MfeI-SmaI 片段，并连接到质粒 pACYC184 的大 EcoRI-XmnI 限制性片段。这样形成的环状 DNA 大小 ~6 kb，并被命名为质粒 pKOS35-77。

质粒 pKOS35-77 作为方便的载体，用于在埃坡霉素 PKS 基因启动子控制下表达本发明的重组 PKS 基因。在一个实施方案示例中，带有其同源启动子的完整埃坡霉素 PKS 基因以一个或多个片段插入到质粒，以产生本发明的表达载体。

本发明也提供了这样的表达载体，其中本发明的重组 PKS 基因位于黄色粘球菌启动子控制之下。为构建示例的载体，以 PCR 扩增产物分离黄色粘球菌 pilA 基因的启动子。将包含 pilA 基因启动子的质粒 pSWU357（在 Wu 和 Kaiser, 1997 年 12 月,细菌学杂志 179 (24) : 7748-7758 中描述）与 PCR 引物 Seq 1 和 Mxpi 11 混合:

Seq1: 5′-AGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGC-3′ (SEQ ID NO:1); 和

Mxpil1: 5′-TTAATTAAGAGAAGGTTGCAACGGGGGGC-3′ (SEQ ID NO:2),

并且用标准 PCR 条件扩增以产生~800 bp 的片段。该片段用限制性酶 KpnI 切割并连接入市售质粒 pLitmus 28 (New England Biolabs)的大 KpnI-EcoRV 限制性片段。所产生的环状 DNA 命名为质粒 pKOS35-71B。

来自质粒 pKOS35-71B 的 pilA 基因启动子以~800 bp EcoRV-SnaBI 限制性片段分离，并连接到质粒 pKOS35-77 的大 MscI 限制性片段以产生 6.8 kb 大小的环状 DNA。由于~800 bp 片段可以两个方向中的任何一个方向被插入，连接产生了大小相等的两个质粒，命名为质粒 pKOS35-82.1 和 pKOS35-82.2。这些质粒的限制性位点和功能图谱在图 2 中描述。

质粒 pKOS35-82.1 和 pKOS35-82.2 作为方便的起始材料用作本发明的载体，载体中重组 PKS 基因被置于黄色粘球菌 pilA 基因启动子控制之下。这些质粒包含置于紧靠启动子转录起始位点下游的单一 PacI 限制性酶识别序列。在一个示例的实施方案中，不带有同源启动子的完整埃坡霉素 PKS 基因以一个或多个片段在 PacI 位点插入到质粒，以产生本发明的表达载体。

这些载体上的 pilA 启动子序列如下所示:

CGACGCAGGTGAAGCTGCTTCGTGTGCTCCAGGAGCGGAAGGTGAAGCCG
GTCGGCAGCGCCGCGGAGATTCCCTTCCAGGCGCGTGTCATCGCGGCAAC
GAACCGGCGGCTCGAAGCCGAAGTAAAGGCCGGACGCTTTCGTGAGGACC
TCTTCTACCGGCTCAACGTCATCACGTTGGAGCTGCCTCCACTGCGCGAGC
GTTCCGGCGACGTGTCGTTGCTGGCGAACTACTTCCTGTCCAGACTGTCGG
AGGAGTTGGGGCGACCCGGTCTGCGTTTCTCCCCCGAGACACTGGGGCTAT
TGGAGCGCTATCCCTTCCCAGGCAACGTGCGGCAGCTGCAGAACATGGTG
GAGCGGGCCGCGACCCTGTCGGATTCAGACCTCCTGGGGCCCTCCACGCTT
CCACCCGCAGTGCGGGGCGATACAGACCCCGCCGTGCGTCCCGTGGAGGG
CAGTGAGCCAGGGCTGGTGGCGGGCTTCAACCTGGAGCGGCATCTCGACG

ACAGCGAGCGGCGCTATCTCGTCGCGGCGATGAAGCAGGCCGGGGGCGTG
AAGACCCGTGCTGCGGAGTTGCTGGGCCTTTCGTTCCGTTCATTCCGCTACC
GGTTGGCCAAGCATGGGCTGACGGATGACTTGGAGCCCGGGAGCGCTTCG
GATGCGTAGGCTGATCGACAGTTATCGTCAGCGTCACTGCCGAATTTTGTC
AGCCCTGGACCCATCCTCGCCGAGGGGATTGTTCCAAGCCTTGAGAATTGG
GGGGCTTGGAGTGCGCACCTGGGTTGGCATGCGTAGTGCTAATCCCATCCG
CGGGCGCAGTGCCCCCCGTTGCAACCTTCTCTTAATTAA (SEQ ID NO:3)

为产生本发明的重组黄色粘球菌宿主细胞，黄色粘球菌细胞在 CYE 培养基中 (Campos 和 Zusman, 1975,黄色粘球菌发育的调节：3' ：5'-环 AMP、ADP 和营养物的影响，美国国家科学院院报 72：518-522)于 30℃、300 转/分钟生长到 100 克莱特。方法的其余部分除非特别指出均在 25℃操作。然后离心沉淀细胞 (用 SS34 或 SA600 转头，8000 转/分钟，离心 10 分钟) 并重悬于去离子水中。细胞再次沉淀并用其 1/100 原始体积重悬。

DNA (1 至 2 μL)用 0.1 cm 电击杯在室温下电穿孔进入细胞，条件为 400 欧姆、25 μFD、0.65 V、时间常数在 8.8-9.4 之间。DNA 不含盐，并重悬在蒸馏且去离子水中，或经 0.025 μm 型 VS 膜(Millipore)透析。电穿孔效率低时，DNA 被点透析，且增生物在 CYE 中。电穿孔后立即加入 1 mL CYE ，电击杯中的细胞加到 50 mL 锥形瓶中，该瓶已预先加入了另外的 1.5 mL CYE (总体积为 2.5 ml)。细胞在 30 到 32℃以 300 转/分钟生长 4 到 8 小时（或过夜）以使得选择标记表达。然后，将细胞铺在平板的选择性 CYE 软琼脂中。用卡那霉素作为选择标志时，每 μg DNA 的产量通常为 10^3 到 10^5。用链霉素作选择标记时，其包含在上层琼脂中，因为它可结合琼脂。

用此步骤，本发明的重组 DNA 表达载体被电穿孔入粘球菌宿主细胞，该细胞表达本发明的重组 PKSs，并产生其编码的埃坡霉素、埃坡霉素衍生物和其它新聚酮化合物。

实施例 2

染色体整合以及用于在黄色粘球菌中表达埃坡霉素的一种细菌人工染色体(BAC)

为在异源宿主中表达埃坡霉素 PKS 和修饰酶基因，以通过发酵产生埃坡霉素，根据本发明的方法，使用了黄色粘球菌，其与纤维堆囊菌密切相关，并可得到其一系列克隆载体。黄色粘球菌和纤维堆囊菌为粘细菌，并可能具有基因表达、免疫调控和翻译后修饰的通用元件。黄色粘球菌已被开发为用于基因克隆和表达: DNA 可通过电穿孔导入，且一系列的载体和遗传标志可用于导入外源 DNA（包括那些允许 DNA 稳定插入到染色体的载体和遗传标志）。黄色粘球菌可在发酵罐的复杂培养基中相对易于生长，并在需要时可进行操作以提高基因表达。

为将埃坡霉素基因簇导入黄色粘球菌，可利用同源重组的方法将埃坡霉素簇构建到染色体中，以组装完整的基因簇。另外，完整的埃坡霉素基因簇可克隆入细菌人工染色体 (BAC)，然后转移入黄色粘球菌用于整合到染色体。

为从粘粒 pKOS35-70. 1A2 和 pKOS35-79. 85 组装基因簇，将来自这些粘粒的同源小区域(2 kb 或更大)导入黄色粘球菌以提供用于基因簇的较大片段重组位点。如在图 3 中所示，构建出质粒 pKOS35-154 和 pKOS90-22 以导入这些重组位点。在黄色粘球菌染色体中组装埃坡霉素基因簇的策略如图 4 所示。起初，在细菌染色体上选择一个并不破坏任何基因或转录单位的中立位点。一个此类区域在 devS 基因的下游，已显示此区域不影响黄色粘球菌的生长和发育。第一个质粒 pKOS35-154 用 DraI 线性化，并电穿孔入黄色粘球菌。该质粒包含在埃坡霉素基因簇两个片段侧翼的 dev 基因座的两个区域。插入到 epo 基因区域之间的是包含卡那霉素抗性标志和大肠杆菌 galk 基因的盒子。见 Ueki 等, 1996, 基因(Gene)183 : 153-157, 在此引用作为参考。如果 DNA 应用 dev 序列作为同源区域通过二次重组重组到 dev 区域，菌落出现卡那霉素抗性。

K35-159 菌株包含允许 pKOS35-79 重组的埃坡霉素基因簇的小区域

(2.5 kb)。 由于 pKOS35-79. 85 上的抗性标志与 K35-159 上的相同，四环素转座子被转位到粘粒，筛选包含插入卡那霉素标志的转座子的粘粒。该粘粒 pKOS90-23 经电穿孔导入 K35-159，并选择土霉素抗性菌落，以产生 K35-174 株。为从粘粒上移去不需要的区域并仅留下埃坡霉素基因，将细胞被铺在含 1％半乳糖的 CYE 平板上。galK 基因的存在使得细胞对 1％的半乳糖敏感。K35-174 的半乳糖抗性菌落代表细胞通过重组或通过 galK 基因的突变而丧失了 galK 标志。如果重组发生，则半乳糖抗性菌株对卡那霉素和土霉素敏感。对这两种抗生素都敏感的菌株通过 Southern 印迹分析得以证实。确定正确的菌株并命名为 K35-175，且含有从组件 7 到 epoK 终止密码下游 4680 bp 的埃坡霉素基因簇。

为导入组件 1 到组件 7，再次重复上述步骤。质粒 pKOS90-22 用 DraI 线性化，并电穿孔导入 K35-175 以产生 K111-13. 2。该菌株用 pKOS35-70. 1A2, pKOS90-38 四环素抗性变体电穿孔，并选择土霉素抗性菌落。此过程产生了菌株 K111-13. 23。含有整个埃坡霉素基因簇的重组体通过对 1％半乳糖的抗性进行筛选。此过程导致了 K111-32. 25、K111-32. 26 和 K111-32. 35 克隆。菌株 K111-32. 25 根据布达佩斯条约于 2000 年 4 月 14 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且可在保藏号 PTA-1700 下获得。该菌株含所有埃坡霉素基因和它们的启动子。

通过在 50 mL 烧瓶中将菌株接种到 5 mL CYE(每升中含 10 g 酪胨、5 g 酵母提取物和 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)中进行发酵，并过夜生长直到培养基处于中间对数生长期。取 100 μL 等份涂到 CTS 平板，且平板在 32℃孵育 4－5 天。为提取埃坡霉素，将来自平板的琼脂和细胞浸软，放入 50 mL 圆锥管中，并将管中加满丙酮。该溶液摇动孵育 4－5 小时，蒸发丙酮，且残留液体用等体积的乙酸乙酯提取两次。通过加入硫酸镁从乙酸乙酯提取物中去除水。硫酸镁被滤除，且液体蒸发至干。将埃坡霉素重悬在 200 μL 乙腈中，并用 LC/MS 进行分析。分析显示菌株产生了埃坡霉素 A 和 B，培养物中存在的埃坡霉素 B 约 0.1 mg/L，且埃坡霉素 A 的水平要低 5 到 10

倍。

该菌株也可用于在液体培养基中产生埃坡霉素。将埃坡霉素产生菌株接种到含 CYE 的烧瓶。第二天，当细胞处于中间对数生长期，将 5%的接种物加入到含 0. 5% CMM (0.5% 酪胨、0. 2 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、10 mM MOPS pH7. 6) 以及 1 mg/mL 丝氨酸、丙氨酸和甘氨酸以及 0. 1%丙酮酸钠的烧瓶中。可加到 0. 5%以增加埃坡霉素 B 的产量，但引起埃坡霉素 B 对埃坡霉素 A 的比率降低。培养物于 30℃生长 60-72 小时。更长的孵育时间会导致埃坡霉素的滴度降低。为收获埃坡霉素，培养物在 SS34 转头中以 10, 000 转/分钟 离心 10 分钟。上清用乙酸乙酯提取两次并旋转蒸发 ("rotavaped")至干。液体培养物产生 2 到 3 mg/L 的埃坡霉毒 A 和 B，比率与平板培养观察到的类似。如果向培养物中加入 XAD (0. 5-2%)，将观察到埃坡霉素 C 和 D，存在的埃坡霉素 D 为 0. 1 mg/L，而存在的埃坡霉素 C 的水平低 5 到 10 倍。

为将所有的基因簇作为一个片段克隆，构建了细菌人工染色体（BAC）文库。首先，将 SMP44 细胞埋入琼脂糖，按照 BIO-RAD 基因组 DNA 填料试剂盒将其裂解。含 DNA 的填料用限制酶如 Sau3AI 或 HindIII 部分消化后，在 FIGE 或 CHEF 凝胶上电泳。通过从琼脂上电洗脱 DNA 或用琼脂酶将琼脂糖降解而分离 DNA 片段。选择分离片段的方法是电洗脱，如 Strong 等，1997，核酸研究（Nucleic Acids Res），19 : 3959-3961 中所述，在此引用作为参考。将 DNA 连接入用适当酶消化的 BAC (pBeloBACII)。PBeloBACII 的图谱如图 5 所示。

将 DNA 电穿孔导入 DH10B 细胞以产生纤维堆囊菌基因组文库，所用方法为 Sheng 等，1995，核酸研究，23 : 1990-1996，在此引用作为参考。用来自埃坡霉素簇 NRPS 区域的探针筛选克隆。挑取阳性克隆，并分离 DNA 进行限制性分析，以证明完整基因簇的存在。阳性克隆命名为 pKOS35-178。

为产生可用于导入 pKOS35-178 的菌株，构建了含埃坡霉素基因簇上游和下游同源区的质粒 pKOS35-164，埃坡霉素基因簇上游和下游两侧是

dev 基因座和包含卡那霉素抗性的 galK 盒，类似于质粒 pKOS90-22 和 pKOS35-154。该质粒以 DraI 线性化，电穿孔导入黄色粘球菌，以产生 K35-183，方法参见 Kafeshi 等，1995，分子微生物学 15：483-494。质粒 pKOS35-178 可通过电穿孔或者用噬菌体 P1 转导的方法导入 K35-183，挑选氯霉素抗性克隆。另外，可构建含来自 pRP4 结合转移起点的 pKOS35-178 变体，用于将 DNA 从大肠杆菌转移至 K35-183。该质粒的制备为：首先，构建含来自 RP4 oriT 区域和来自 pACYC184 的四环素抗性标记的转座子，然后在体外或体内将该转座子转位至 pKOS35-178 上。该质粒转化入 S17-1，并结合进黄色粘球菌。菌株 K35-190 在存在 1%半乳糖时生长，以对第 2 次重组事件进行选择。该菌株含有所有的埃坡霉素基因和所有潜在的启动子。发酵该菌株，并测试埃坡霉素类 A 和 B 的产量。

另外，使用温度敏感质粒 pMAK705 或 pK03 通过将该转座子转位至 pMAK705 或 pK03 上，并筛选 tetR 和 camS 质粒可将转座子重组入 BAC；重组按 Hamilton 等，1989 年 9 月，细菌学杂志，171 (9)：4617-4622 和 Link 等 1997 年 10 月，细菌学杂志，179 (20)：6228-6237 所述进行，二者在此处引用作为参考。

除了将 pKOS35-178 整合入 dev 基因座外，它也可利用真菌噬菌体 Mx8 或 Mx9 的整合功能整合入噬菌体附着位点。构建包含来自 Mx8 或 Mx9 的整合基因和 att 位点以及来自 pACYC184 的四环素基因的转座子。该转座子的其它变体可只有附着位点。在此变体中，整合基因为接下来由共电穿孔含整合酶基因的质粒反式提供或由任一组成型启动子如 mgl 启动子使得整合酶蛋白质在电穿孔菌株中表达（参见 Magrini 等，1999 年 7 月，细菌学杂志，181 (13)：4062-4070，此处引用作为参考）。一旦构建了转座子，它就被转位至 pKOS35-178 上，以产生 pKOS35-191。将该质粒导入如上所述的黄色粘球菌。该菌株含有所有埃坡霉素基因及所有潜在的启动子。发酵该菌株，并测试埃坡霉素类 A 和 B 的产生。另外，含有 att 位点和 oriT 区的菌株可被转位至 BAC 上，并将所得到的 BAC 接合入黄色粘球菌。

一旦埃坡霉素基因已在黄色粘球菌的一株菌株中建立后，操作该基因簇的任一部分，如改变启动子或交换组件，可利用卡那霉素抗性和 galK 盒进行，如下所述。含 epo 基因的黄色粘球菌培养物在多种培养基中生长，并检测埃坡霉素类的产生。如果埃坡霉素类 (尤其是 B 或 D)的产生水平低，则如下面的实施例所述对产生黄色粘球菌的克隆进行培养基的开发和基于突变的菌株改良。

实施例 3

埃坡霉素类的产生和纯化方法

A、 优化埃坡霉素 D 在黄色粘球菌中的异源产生

埃坡霉素 D 在黄色粘球菌中的异源产生通过掺入吸附树脂、确定适当的碳源。并执行补料分批方法，可从起始滴度 0.16 毫克/升提高 140 倍。

为减少埃坡霉素 D 在基本培养基中的降解，加入 XAD-16 (20 克/升)以稳定细胞外产物。这极大的促进了产物的回收，并使产量增大了 3 倍。也评估了使用油类作为细胞生长和产物形成的碳源。通过筛选多种油类，显示出油酸甲酯具有最大的效果。在分批法中，当最佳浓度为 7 毫升/升时，最大细胞密度可从 0.4 克干细胞重(DCW)/升增加到 2 克干细胞重/升。产物产量依赖于生产培养基中痕量元素的存在。对基本培养基外源补充痕量金属时，峰值埃坡霉素 D 的滴度增加 8 倍，显示了金属离子在细胞代谢和埃坡霉素生物合成中的重要作用。为进一步增加产物产量，采用连续补料分批法以引起更高的细胞密度和维持延长的生产期。优化的补料分批培养物始终产生 7 克干细胞重/升的细胞密度，且平均产生滴度为 23 毫克/升。

埃坡霉素类为由粘球菌目纤维堆囊菌的多株菌株天然产生的次级代谢物（Gerth 等，1996; Gerth 等，2001; 在本实施例中引用的参考文献列于本部分的最后，并于此处引用作为参考）。它们是微管解聚的有效抑制剂，作用机制类似于抗癌药物紫杉醇（Taxol）(Bollag 等，1995)。它们对具多种药物抗性、表达 P-糖蛋白的肿瘤细胞系的细胞毒效果使它们成为潜在的具有大的商业价值的治疗化合物(Su 等，1997; Kowalski 等，1997)。

它们在水中相对高的溶解度也有利于它们用于临床评估的制剂。

埃坡霉素类 A 和 B 是天然宿主的主要发酵产物（Gerth 等，1996）。这些多肽分子的大环核心是通过连续脱羧缩合乙酸基和丙酸基单元而形成的(Gerth 等，2000)。埃坡霉素类 A 和 B 的不同为在其碳骨架的 C-12 位一个甲基的不同。此结构差异源自在组装埃坡霉素 A 时掺入了一个乙酸基，而在组装埃坡霉素 B 时掺入了一个丙酸基。埃坡霉素类 C 和 D 分别是埃坡霉素类 A 和 B 生物合成途径中的中间体(Tang 等，2000; Molnar 等，2000)。它们在发酵过程中作为次要产物分泌出来，合成产量约为 0.4 毫克/升。因为初步的体内研究显示，埃坡霉素 D 在 4 种化合物中是最有希望发展为抗肿瘤药物的(Chou 等 ，1998)，所以人们有相当大的兴趣来大规模产生这种分子。

负责埃坡霉素类生物合成的基因簇已测序(Tang 等，2000; Molnár 等，2000)，并已用于在与纤维堆囊菌紧密相关、且更易于遗传操作的微生物宿主黄色粘球菌中制备这些复合物。为提高埃坡霉素 D 的产生，已构建了该重组菌株的缺失突变体，以灭活可分别催化埃坡霉素 C 和 D 转化为埃坡霉素 A 和 B 的 P450 环氧酶 (Tang 等，2000)（如下面的实施例 4 所述）。这种遗传改变有效促进了作为黄色粘球菌发酵的唯一产物的埃坡霉素 C 和 D 的分泌，其中埃坡霉素 D 比 C 的比率是 4:1。得到的突变体与天然宿主相比，在所需产物的回收和纯化方面具有明显的优势。在本实施例中，描述了培养基成分和发酵策略的改进，这种改进使得埃坡霉素 D 在黄色粘球菌中的产量增加了 140 倍。

为连续获得低量产生的生物活性分子，吸附树脂已被用于粘球菌的发酵(Reichenbach 和 Höfle，1993)。为便于分离埃坡霉素 D，将疏水树脂 XAD-16 加入培养基中。因为用适当的溶剂易于将结合产物从树脂上洗脱下来，因此回收大大简化了。而且，XAD-16 的使用通过稳定埃坡霉素使产物的降解最小化。

黄色粘球菌通常在主要由含酪蛋白的酶水解物组成的培养基中培养，如蛋白胨和酪胨，依赖氨基酸作为其唯一的碳源和氮源(Reichenbach 和

Dworkin, 1991)。结果，由于氨基酸降解使得氨在发酵肉汤中聚集。Gerth等（1986）显示在变绿粘球菌培养物中，其胞外氨浓度为35-42 mM时，与之对应的是令人惊讶的细胞内高氨浓度80-140 mM。更重要的是，已表明使用原位膜方法通过连续移去多余的氨，使其浓度在8 mM以下，则细胞块和二级代谢产物的产生都急剧增加(Hecht等，1990)。因为推测高水平氨的产生抑制黄色粘球菌的生长和埃坡霉素 D的产生，需要另一种可降低氨基酸消耗的碳源。

虽然需要适合的方法，但通过广泛筛选不同油类，确定油酸甲酯为可被黄色粘球菌代谢的底物。往生长培养基中加入外源的痕量元素溶液，埃坡霉素 D在简单分批发酵中，产生增加8倍，达到3. 3毫克/升的产量。为进一步对方法进行优化，采用了使用间歇或连续馈与酪胨和油酸甲酯的补料分批法延长细胞的生产期。在本实施例中，报道了由两种不同补料策略所获得结果的比较。

材料和方法

接种物的制备

为在无油酸甲酯的培养基中生产埃坡霉素 D，在 50 毫升的玻璃培养管中，用 1 毫升含 20%（V/V）甘油的冷冻黄色粘球菌菌株 K111-40.1 细胞接种 3 毫升含 10 克/升酪胨(Difco)、5 克/升酵母提取物(Difco)、1 克/升 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 50 mM HEPES, pH 7. 6 的 CYE 培养基。用氢氧化钾将 HEPES 缓冲液的 pH 滴定至 7. 6。细胞在旋转摇床上于 30℃、175 转/分孵育 3 天。然后转到含 50 毫升 CYE 培养基的 250 毫升锥形烧瓶中，在同样的条件下生长 2 天。得到的种子培养物按 5%(v/v)的接种大小接种 50 毫升的生产瓶。

为在含油酸甲酯的培养基中培养黄色粘球菌，细胞不得不适应在含油的环境中培养。将一瓶冷冻细胞的种子瓶接种到 3 毫升补加有 3 μl 油酸甲酯(Emerest 2301) (Cognis Corp.)的 CYE 培养基中。细胞在玻璃培养管于 30℃、175 转/分生长 2-6 天，直到培养物在显微镜下足够密集为止。然后

将它们转移到装有 50 毫升 CYE-MOM 培养基的 250 毫升锥形瓶，其中所述 50 毫升 CYE-MOM 培养基含 10 克/升酪胨(Difco)、5 克/升酵母提取物(Difco)、1 克/升 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、2 毫升/升油酸甲酯和 50 mM HEPES, pH 7.6。生长 2 天后，冷冻细胞，并按含 20% (v/v)甘油的 1 毫升小份贮存于-80℃。

为在含油酸甲酯的培养基中制备埃坡霉素 D，将 1 毫升已适应油的冷冻细胞接种到加有 3 毫升 CYE-MOM 培养基的玻璃培养管中。细胞于 30℃、175 转/分孵育 2 天，并转到含 50 毫升 CYE-MOM 培养基的 250 毫升锥形烧瓶中。得到的种子培养物在同样的条件下生长 2 天，并用于接种 50 毫升生产瓶，接种大小为 5% (v/v)。

在准备 5 升发酵的接种物时，将 25 毫升已适应油的种子培养物转移到含 475 毫升 CYE-MOM 培养基的 2.8 升费氏烧瓶中。细胞于 30℃、175 转/分生长 2 天。随后，将 250 毫升的二级种子培养物接种到含 4.75 升生产培养基的 5 升发酵罐中，最终的接种物浓度为 5% (v/v)。

摇瓶生产

在不含油酸甲酯的情况下，黄色粘球菌 K111-40-1 的分批培养物如下制备。1 克 XAD-16 树脂(Rohm 和 Haas)和 5 毫升去离子水在 250 毫升锥形烧瓶中，于 121℃高压灭菌 30 分钟。然后去掉烧瓶中多余的水，并加入 50 毫升含 5 克/升酪胨、2 克/升 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 50 mM HEPES, pH 7.6 的 CTS 培养基。因为和在存在生产培养基时高压灭菌吸附树脂会使细胞所需要的基本营养成分结合到树脂上，所以树脂和培养基要分开灭菌。向生产烧瓶中接种 2.5 毫升种子培养物，并于 30℃、175 转/分孵育 6 天。

在存在油酸甲酯时，分批培养物的制备按如上所述。另外，向生产培养基中补加 7 毫升/升油酸甲酯和 4 毫升/升过滤除菌的痕量元素溶液，其中所述痕量元素溶液包含 10 毫升/升浓缩 H_2SO_4、14.6 克/升 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$、2.0 克/升 $ZnCl_3$、1.0 克/升 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$、0.43 克/升 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$、0.31 克/升 H_3BO_3、0.24 克/升 $CaCl_2 \cdot 6H20$ 和 0.24 克/升 $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$。然后，

向生产烧瓶接种 2.5 毫升已适应油的种子培养物，并于 30℃、175 转/分孵育 5 天。

在间歇供给酪胨和油酸甲酯时，如下准备补料分批培养物。1 克 XAD-16 树脂和 5 毫升去离子水在 250 毫升锥形烧瓶中于 121℃高压灭菌 30 分钟。灭菌后，去掉烧瓶中多余的水，并加入 50 毫升补加有 2 毫升/升油酸甲酯、4 毫升/升痕量元素溶液和 50 mM HEPES, pH 7.6 的 CTS 培养基。向生产烧瓶中接种 2.5 毫升已适应油的种子培养物，并于 30℃、175 转/分孵育。接种后 2 天，每间隔 24 小时向培养基中加入 2 克/升酪胨和 3 毫升/升油酸甲酯。酪胨补料制备为浓缩的 100 克/升溶液。培养物生长 10-12 天，直至观察到相当多的细胞裂解。

在同样的生长条件下，所有的生产培养物可在 2.8 升的费氏烧瓶中按 500 毫升的规模生长。

发酵生产

在间歇或连续供给酪胨和油酸甲酯的 5 升规模的补料分批发酵按如下制备。20 克/升 XAD-16、2 克/升 $MgSO_4$ $7H_2O$ 和 4.75 升去离子水在 5 升发酵罐(B. Braun)中于 121℃高压灭菌 30 分钟。灭菌后，将浓缩的酪胨溶液(150 克/升)、油酸甲酯和痕量元素无菌添加到生物反应器，使酪胨、油酸甲酯和痕量元素的最终浓度分别为 5 克/升、2 毫升/升和 4 毫升/升。然后向该培养基中接种 250 毫升已适应油的种子培养物。发酵在 30℃进行，通气速率为 0.4-0.5 v/v/m，初始搅拌速率为 400 转分。通过在 400-700 转/分之间的阶式搅拌，使溶解氧控制在 50%饱和。通过自动加入 2.5 N KOH 和 2.5 M H_2SO_4，使培养 pH 维持在 7.4。接种后 24 小时，将酪胨(150 克/升)和油酸甲酯加入生产培养基，供给速率为酪胨 2 克/升/天，油酸甲酯 3 毫升/升/天。补料每 24 小时给予一块，或者以蠕动泵(W. Marlow)连续给予。使细胞生长 10-12 天，直至观察到相当多的细胞裂解。

埃坡霉素的定量

发酵中，在使用 XAD-16 树脂之前，从生产烧瓶或生物反映器中取 1 毫升培养肉汤，并于 13, 000 g 离心 10 分钟。上清中埃坡霉素产物的定量用 Hewlett Packard 1090 HPLC 进行，UV 检测的波长为 250 nm。将 500 微升上清注入通过 4. 6 x 10 mm 保护柱(Inertsil，ODS-3、5 um)。然后进行在线提取，流速为 1 毫升/分钟。用 100%水洗 0. 5 分钟，接着用至 50%乙腈的梯度洗 1. 5 分钟。开始 2 分钟的洗脱剂转变为废物，之后通过一个更长的分离柱(4. 6 x 150 mm，Inertsil，ODS-3,5 μm)。埃坡霉素类 C 和 D 的分离在 50%-100%乙腈梯度下进行 8 分钟，然后用 100%乙腈洗 3 分钟。在这些条件下，埃坡霉素 C 在 9. 4 分钟时洗脱，埃坡霉素 D 在 9. 8 分钟时洗脱。

随着 XAD-16 树脂的使用，从生产烧瓶或生物反应器中取 5-50 毫升混合很好的培养肉汤和树脂。树脂在重力作用下沉降后，倾倒培养肉汤。树脂用 5-50 毫升的水洗涤，并在重力作用下再次沉降。完全移弃含水混合物，并用 100%甲醇从树脂提取埃坡霉素产物。溶剂的使用量是样品体积的 50%。埃坡霉素类 C 和 D 的定量通过 HPLC 分析进行，UV 检测波长为 250 nm。将 50 微升甲醇提取物注入通过 2 个 4. 6 x 10 mm 保护柱(Inertsil, ODS-3, 5 μm)和一个更长的 4. 6 x 150 mm 柱(Inertsil, ODS-3, 5 μm)。测定方法是用 60%乙腈和 40%水恒溶剂洗脱 18 分钟，流速为 1 毫升/分钟。在这些条件下，埃坡霉素 C 在 10. 3 分钟时检测到，埃坡霉素 D 在 13. 0 分钟时可检测到。用纯化的埃坡霉素 D 制备标准品。

细胞生长测定

在无油酸甲酯时，通过测定 600 nm 处的光学密度(OD)来监测细胞生长。样品用水稀释至最终 OD 值低于 0. 4。因为将油酸甲酯加到培养基中会导致在 600 nm 有强吸收的乳液形成，存在油酸甲酯时的细胞生长通过干细胞重(DCW)测定。40 毫升培养肉汤在已称重的试管中于 4200 g 离心 20 分钟。然后沉淀用 40 毫升水洗涤，并在称重前于 80℃干燥 2 天。

氨的测定

1 毫升发酵肉汤通过在 13, 000 g 离心 5 分钟而澄清。然后上清用氨测定试剂盒(Sigma)进行氨的分析。样品用水稀释 20-100 倍，直至最终浓度低于 880 μM。

油酸甲酯的测定

1 毫升发酵肉汤中残留的油酸甲酯用 5 毫升乙腈提取。将混合物涡旋，并于 4200 g 离心 20 分钟使其澄清。油酸甲酯的定量通过 HPLC 分析进行，UV 检测波长为 210 nm。将 50 微升上清注入通过 2 个 4.6 x 10 mm 保护柱(Inertsil，ODS-3、5 μm)和一个更长的 4.6 x 150 mm 柱(Inertsil，ODS-3、5 μm)。柱子用乙腈:水(1:1)洗 2 分钟，流速为 1 毫升/分钟。然后，用 50%-100% 的乙腈梯度洗脱 24 分钟以上，接着用 100%乙腈洗 5 分钟。因为商品化油酸甲酯碳链长度的异质性，该化合物在洗脱时有 2 个在 25.3 分钟和 27.1 分钟检测到的主峰。结合在 XAD-16 树脂上的来自甲醇提取物的油酸甲酯用同样的 HPLC 方法进行定量。油酸甲酯标准品于 83.3%已腈中制备。细胞消耗的油酸甲酯如下计算：加入的总油酸甲酯—培养基中残留的油酸甲酯—结合于树脂上的油酸甲酯。

结果

在分批发酵法中，黄色粘球菌株 K111-40-1 最初使用简单的只含 5 克/升酪胨（一种胰的酪蛋白消化物）和 2 克/升硫酸镁的生产培养基培养。细胞的基线特性如图 6 所示。

接种后 3 天，获得最大细胞密度和最大埃坡霉素 D 的产生量，OD600 为 1.6，且相应滴度为 0.16 mg/L。其后细胞密度和产物产量均明显降低。随着细胞消耗酪胨，在生产培养基中也可检测到铵的逐渐积累。在 5 天发酵的最后，最终的氨浓度接近 20 mM。

XAD-16 对产物稳定性的影响

为防止埃坡霉素 D 的快速降解，将疏水吸附树脂 XAD-16 加入到生产培养基中，以结合和稳定分泌产物。XAD-16 是芳族聚合物树脂，之前 Gerth 等(1996)用该树脂从微生物生产者纤维堆囊菌 So ce90 的发酵产物中分离埃坡霉素类 A 和 B。如图 7 所示，吸附树脂的存在对细胞的生长没有影响。然而，它有效减少发酵肉汤中埃坡霉素 D 的损失，其可使该产物的回收增加 3 倍。

培养基的研发

在致力于开发可支持更高细胞密度和埃坡霉素产量的培养基时，通过使生产培养基中酪胨的浓度在 1 克/升—40 克/升之间变化，评价酪胨对生长和产物产量的影响。虽然酪胨浓度的增加可刺激细胞生长，但细胞的比生产力率显著降低，如图 8 所示。产生埃坡霉素 D 的最佳酪胨浓度为 5 克/升，而更高的酪胨浓度导致滴度降低。

由于酪胨的使用，培养基的改进受限，所以评估了作为基本生产培养基添加成分的其它底物。根据详细筛选的不同油类，确定油酸甲酯为可促进埃坡霉素 D 产量增加最大的碳源，如表 3 所概述的。

表 3

油（7 毫升/升）	相对于无油添加剂的对照的埃坡霉素 D 产量（%）
油酸甲酯	780
油酸乙酯	740
椰子油	610
豚脂	470
油酸丙酯	420
芝麻油	380
三油酸甘油酯	370
色拉油	360

向日葵油	330
大豆油	290
十七烷酸甲酯	190
无油 (对照)	100
十九烷酸甲酯	96
壬酸甲酯	40
菜籽油	40

然而，直接将油酸甲酯加入生产培养基中会导致细胞过早裂解。因此，种子培养物在进行生产发酵之前生长于含油酸甲酯的培养基。有趣的是，这种适应方法使细胞对裂解具有较低的易感性。如表 4 所示（与分批发酵中 CTS 培养基的基线特性相比，对生长和产量的改善），在油酸甲酯浓度为 7 毫升/升，痕量元素浓度为 4 毫升/升时，达到 2.1 克/升的峰高生物量浓度和 3.3 毫克/升的埃坡霉素 D 滴度。

表 4

发酵条件	最大细胞密度（gDCW/L）	最大埃坡霉素 D 产量（毫克/升）
在分批法中，无 XAD-16 的 CTS 培养基	0.44 ± 0.04	0.16 ± 0.03
在分批法中，有 XAD-16 的 CTS 培养基	0.44 ± 0.04	0.45 ± 0.09
在分批法中，具 7 毫升/升油酸甲酯的 CTS 培养基	1.2 ± 0.1	0.12 ± 0.02
在分批法中，具 7 毫升/升油酸甲酯和 4 毫升/升痕量元素的 CTS 培养基	2.1 ± 0.2	3.3 ± 0.7
间歇补料分批法	6.3 ± 0.6	9.8 ± 2.0

连续补料分批法	7.3 ± 0.7	23 ± 4.6

在更高浓度的油酸甲酯，没有观察到滴度的进一步提高，如图 9 所示。

除显示了油酸甲酯对细胞生长和产量的重要性外，上述图表也强调了生长培养基中痕量元素的重要性。预测酪胨提供的营养物对旺盛的细胞生长可能不够，进行了与油酸甲酯一同加入的外源痕量金属的添加。令人吃惊的是，发现这种补充对细胞生长和产量提高是必需的。缺少这种补充时，最大生物量浓度和埃坡霉素 D 的滴度分别只有 1.2 克/升和 0.12 毫克/升。这种低滴度与由基本培养基所获得的滴度相当。

补料分批法的开发

在分批发酵法中，当存在最佳浓度的油酸甲酯和痕量元素时，黄色粘球菌菌株在接种后的开始 2 天以指数增长。埃坡霉素 D 的产生开始于稳定期的初期，并随着油酸甲酯耗尽、当细胞裂解出现的时候于第 5 天停止，如图 10A 和 10B 所示。也显示了油酸甲酯消耗和氨产生的时程。生产培养基中的氨浓度在整个发酵过程中低于 4 mM。

为延长烧瓶培养物中细胞的生产期间，向培养基中加入酪胨和油酸甲酯，每天 1 次，加入速率分别为 2 克/升/天和 3 毫升/升/天。接种后 48 小时启动底物补料，且其后细胞以指数生长 3 天。如图 11A 所示，生物量浓度在第 5 天开始为平高线，并在第 10 天达到最大值 6.3 克/升。此外，埃坡霉素 D 的产生与稳定生长期一致，在第 12 天结束后，终产量达到 9.8 毫克/升。如图 11B 所示，在发酵过程中，油酸甲酯的消耗和氨的产生都以恒定的速率增加。

油酸甲酯的耗尽速率与其加入生物反映器的速率一样，且氨以 3.2mM/天的速率累积。较低的酪胨或油酸甲酯供给速率会极大减少埃坡霉素 D 的滴度，而较高的供给速率会使细胞在达到显著产量之前过早裂解。

为测试补料分批法在更大规模中的有效性，每间隔 24 小时向生物反应器中的 5 升发酵罐间隔加入酪胨和油酸甲酯。如图 12 所示，所得的生产曲

线与烧瓶培养物的生产曲线极为相似。底物补料在接种后 24 小时启动，且埃坡霉素的产生在第 4 天开始。在接种后第 10 天获得埃坡霉素 D 的峰滴度 9.2 毫克/升。

为评估更为明确定义的供给策略对生长和产量的影响，不断地往生物反应器中加入加倍的补料。如图 13A 所示，进行连续供给不影响细胞的生长，但是使细胞的产率增加了几乎 3 倍。接种后 10 天，埃坡霉素 D 的最终滴度达到 27 毫克/升。如图 13B 所示，在发酵过程中油酸甲酯消耗速率与其加入生产培养基中的速率一样，且氨以 6.4mM/天的稳定速率释放。

讨论

虽然最近可实现埃坡霉素 D 的化学合成(Harris 等，1999；Meng 等，1998；Sinha 等，1998)，但是，对该化合物的大规模生产而言，这种复杂的 20 步方法并非经济可行。虽然埃坡霉素 D 在黄色粘球菌菌株中的最初生产产量为 0.16 毫克/升，但是本发明改良的发酵方法基本上使产量水平增加至 23 毫克/升。

获得更高埃坡霉素 D 滴度的一个主要障碍是产物在发酵肉汤中的迅速降解。由于往培养基中加入吸附树脂，该问题得到缓解。加入 XAD-16 不影响细胞的生长，但是将分泌产物的损失减到最小，同时使其回收增加了 3 倍。

由于使用酪胨作为基本碳源和氮源，增加产物产量的另一个障碍是滴度的有限提高。虽然增加酪胨浓度可刺激黄色粘球菌菌株的生长，但是浓度超过 5 克/升导致滴度显著降低。在高浓度胨或酪胨存在时，次生代谢产物的抑制作用以前已在一些其它粘细菌发酵中得到证实，并且把它归因于培养基中氨的积累。

因为黄色粘球菌不能代谢多糖和糖(Reichenbach 和 Dworkin, 1991)，所以测试了它利用油作为碳源的能力。因为脂肪酸的氧化作用不但可作为细胞的能量来源，而且作为降解产物的乙酰 CoA 的形成也可提供埃坡霉素生物合成的前体，所以油类是具有吸引力的碳源。红色糖多孢菌、弗氏链霉菌和吸水链球菌发酵时加入油类，显示可分别增加聚酮化合物分子的产

量，其中所述聚酮化合物如红霉素泰乐菌素和免疫调节剂L-683590(Mirjalili 等，1999 ; Choi 等，1998 ;Junker 等，1998)。

根据对不同油类的筛选，确定油酸甲酯为促进细胞生长和埃坡霉素 D 产生的主要候选者。然而，这些改善只有在同时往生产培养基中加入痕量金属才可观察到。单独加入油酸甲酯至 7 毫升/升，可将最大细胞密度从 0.4 克 DCW/升增至 1.2 克 DCW/升，但产量保持在基线水平。随着外源补加 4 毫升/升痕量元素，最大生物量浓度增加至 2.1 克 DCW/升，同时埃坡霉素 D 的滴度从 0.45 毫克/升增加至 3.3 毫克/升。这些发现显示，酪胨中营养成分缺陷可能对黄色粘球菌的生长和埃坡霉素类的形成至关重要。

随着分批法中油酸甲酯和痕量元素最佳浓度的确立，正努力开发可保持细胞旺盛生长和延长生产周期的补料策略。间歇和连续地以恒定速率供给酪胨和油酸甲酯得到评估，且两种方法在生长曲线上均有类似的改善。由于这两种底物的最佳供给，得到了为大约 6.8 克 DCW/升的最大细胞密度。在这两种情况下，油酸甲酯随着加入发酵培养基而耗尽。

与细胞生长和油酸甲酯消耗不同，埃坡霉素和氨的产生受所选择的供给策略影响极大。在连续补料分批法培养中，埃坡霉素 D 最高滴度可达 23 毫克/升。这大约是间歇补料分批法培养所获滴度的 2.5 倍。随着连续供给，细胞释放氨的速率也高达 2 倍，表明酪胨的消耗速率更高。这些结果共同显示，与间歇补料分批法相关的较低滴度可能是由分解代谢产物阻抑所导致的，而不是氨的积累。此外，这些表明，黄色粘球菌菌株的产率对培养基中底物的量敏感，并且在限制底物的条件下，产率可最大。这也和增加生产培养基中的酪胨浓度会导致更高的细胞密度，但滴度更低的观察一致。

与用基本培养基进行分批法培养相比，连续补料分批培养使细胞密度增加 17 倍，滴度增加 140 倍。这种方法已从 5 升扩大到 1000 升，并且显示可同等执行。以生产规模产生埃坡霉素 D 所显示的结果表明，黄色粘球菌可用作从粘细菌生产其它生物活性分子的宿主。

参考文献

Bollag 等，1995，埃坡霉素类，一类具有紫杉醇样作用机制的新微管稳定剂，癌研究（Cancer Res），55：2325-2333。

Choi 等，1998，在弗氏链霉菌培养中，菜籽油对甲基丙二酸单酰-CoA 羧基转移酶活性的影响，Biosci Biotechnol Biochem 62：902-906。

Chou 等，1998，脱氧埃坡霉素 B：一种有效的微管靶向抗肿瘤剂，其具有与埃坡霉素 B 相关的有应用前景的体内特性，美国国家科学院院报 95：9642-9647。

Gerth 等，1996，埃坡霉素 A 和 B：来自纤维堆囊菌 (粘细菌) 抗真菌和细胞毒化合物—产生、物理化学特性和生物学特性，抗生素杂志（J Antibiot）(东京) 49：560-563。

Gerth 等，2000，埃坡霉素类的生物合成研究：碳骨架生物合成的起始，抗生素杂志(东京) 53：1373-1377。

Gerth 等，2001，埃坡霉素类的生物合成研究：PKS 和埃坡霉素 C/D 单加氧酶，抗生素杂志(东京) 54：144-148。

Harris 等，1999，有前景的癌症化疗剂 12,13-脱氧埃坡霉素 B 的新化学合成：对羟醛缩合的非对映选择性令人吃惊的长期效果的发现，美国化学会杂志（J Am Chem Soc）12：7050-7062。

Hecht 等，1990，在抗生素发酵中，中空纤维支持的气膜用于原位去除铵，生物技术与生物工程（Biotechnol Bioeng）35：1042-1050。

Junker 等，1998，使用大豆油和硫酸氨添加剂优化次生代谢物的产生，生物技术与生物工程 60：580-588。

Kowalski 等，1997，微管稳定剂埃坡霉素 A 和 B 与纯化的微管蛋白的活性，以及对紫杉醇抗性细胞的活性，生物化学杂志（J Biol Chem）272：2534-41。

Meng 等，1997，通过成环烯烃的取代形成大环内酯的远期效应：应用于合成具完全活性的埃坡霉素同类物，美国化学会杂志 119：2733-2734。

Mirjalili 等，1999，红色糖多孢菌中，菜籽油的吸收对红霉素和三酮

内酯（triketide lactone）产生的影响。生物科学进展（Biotechnol Prog）15：911-918。

Molnar 等，2000。来自纤维堆囊菌 So ce90 的微管稳定剂埃坡霉素类 A 和 B 的生物合成基因簇，化学与生物学（Chem Biol）7：97-109。

Reichenbach 等。原核生物（The Prokaryotes），第 2 版，纽约：Springer-Verlag. 3417-3487 页。

Reichenbach 等，1993，生物活性次生代谢物的生产。Dworkin M、Kaiser D 编辑。粘细菌 II（Mycobacteria II）。华盛顿 DC：美国微生物学会，347-397 页。

Sinha 等，1998，全合成埃坡霉素类的抗体催化途径，美国国家科学院院报 95：14603-14608。

Su 等，1997，埃坡霉素类的结构与活性关系以及首次在体内与紫杉醇的比较，Angew Chem Int Ed Engl 36：2093-2096。

Tang 等，2000，埃坡霉素基因簇的克隆和异源表达，科学（Science）287：640-642。

B、埃坡霉素 B 的生产

烧瓶

将一支 1 毫升小瓶 K111-32-25 菌株融化，并将内含物转移到装有 3 毫升 CYE 种子培养基的玻璃管中。培养物在 30℃孵育 72±12 小时，接着在 250 毫升折流锥形瓶中，将 3 毫升该试管培养物在 50 毫升 CYE 培养基中传代培养。该 CYE 瓶在 30℃孵育 24±8 小时，同时，用 2.5 毫升这种种子(5% v/v)接种埃坡霉素生产瓶（250 毫升折流锥形瓶中装有 50 毫升 CTS-TA 培养基）。然后，这些锥形瓶在 30℃孵育 48±12 小时，培养基初始 pH 为 7.4。

发酵罐

如上所述，对 K111-32-25 进行类似的接种物扩大，添加的步骤是将

50 毫升 CYE 种子中的 25 毫升在 500 毫升 CYE 中传代培养。该次级种子用于接种含 9.5 升 CTS-TA 和 1 克/升丙酮酸钠的 10 升发酵罐。该发酵方法的参数设定值为：pH—7.4；搅拌—400 转/分；喷射速度—0.15 vvm。这些参数足以保持 DO 在 80%饱和以上。通过往培养基中加入 2.5N 硫酸和氢氧化钠来控制 pH。埃坡霉素的最高滴度在 48 ± 8 小时获得。

C、埃坡霉素 D 的生产

烧瓶

将一支 1 毫升小瓶的 K111-40-1 菌株（实施例 4 中所述）融化，同时将内含物转移到装有 3 毫升 CYE 种子培养基的玻璃管中。培养物在 30℃孵育 72 ± 12 小时，接着将 3 毫升这种试管培养物在装有 50 毫升 CYE 培养基的 250 毫升折流锥形瓶中传代培养。CYE 瓶在 30℃孵育 24 ± 8 小时，同时用 2.5 毫升该种子(5% v/v)接种埃坡霉素生产瓶（250 毫升折流锥形瓶中装有 50 毫升 1X 小麦谷蛋白培养基）。然后，将这些瓶在 30℃孵育 48 ± 12 小时，培养基初始 pH 为 7.4。

发酵罐

如上所述，对 K111-40-1 进行类似的接种物扩大，添加的步骤是将 50 毫升 CYE 种子中的 25 毫升在 500 毫升 CYE 中传代培养。250 毫升次级种子用于接种含 4.5 升 CTS-TA 的 5 升发酵罐，每天供给 1 克/升丙酮酸钠。该发酵方法的参数设定值为：pH—7.4；搅拌—400 转/分；喷射速度—0.15 vvm。这些参数足以保持 DO 在 80%饱和以上。通过往培养基中加入 2.5N 硫酸和氢氧化钠来控制 pH。埃坡霉素的最高滴度在 36 ± 8 小时获得，埃坡霉素 C 的最高滴度为 0.5 毫克/升，埃坡霉素 D 的最高滴度为 1.6 毫克/升。

表 5 是所用培养基和它们各自组分的概述。

表 5

CYE 种子培养基	组分	浓度
	酪胨(Difco)	10 克/升

	酵母提取物(Difco)	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(EM Science)	1 克/升
	HEPES 缓冲液	50mM
CTS-TA 生产培养基	组分	浓度
	酪胨(Difco)	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(EM Science)	2 克/升
	L-丙氨酸、L-丝氨酸、甘氨酸	1 毫克/升
	HEPES 缓冲液	50mM
1X 小麦谷蛋白生产培养基	组分	浓度
	小麦谷蛋白（Sigma）	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(EM Science)	2 克/升
	HEPES 缓冲液	50mM

CYE 种子培养基和 CTS-TA 生产培养基通过自动灭菌的高压灭菌法于 121℃灭菌 30 分钟。小麦谷蛋白生产培养基通过高压灭菌法于 121℃灭菌 45 分钟。

D、从黄色粘球菌中生产埃坡霉素 C 和 D

一方面，本发明为粘球菌菌株提供了一种改良的发酵方法，其中所述粘细菌包括但不限于黄色粘球菌 K111-40-1，其中发酵培养基提供可以利用而不产生氨的碳源。在一个优选的实施方案中，碳源是油，如油酸甲酯或类似的油。在用多种供给比例进行摇瓶测定时，这些方法会导致埃坡霉素类 C 和 D 的产生，其中大部分为埃坡霉素 D，产量为 15—25 毫克/升，如下所述。

种子培养

将已在 50 毫升含 2 毫升/升油酸甲酯的 CYE 培养基中生长过的一支 1 毫升小瓶黄色粘球菌 K111-40-1 冻存细胞接种于含 1 毫升/升油酸甲酯的 3

毫升新鲜 CYE 培养基的无菌玻璃管中。试管在摇床中于 30℃、250 转/分钟孵育 24 小时。然后，将玻璃管中的接种物转移到 250 毫升非折流瓶中，该瓶装有 50 毫升含有 2 毫升/升油酸甲酯的新鲜 CYE 培养基。该瓶在摇床中于 30℃、250 转/分钟孵育 48 小时。

生产瓶

通过高压灭菌法，1 克安伯来特（Amberlite）XAD-16 在 250 毫升非折流瓶中于 121℃灭菌 30 分钟。然后，将 50 毫升灭菌的生产培养基加入瓶中。瓶用 5% (v/v)种子培养物接种，同时放置在孵育摇床中，转速为 250 转/分钟，温度为 30℃。接种后 2 天，开始供给油酸甲酯，速率为 3 毫升/升/天，同时，接种后 1 天，开始供给酪胨，速率为 2 克/升/天。

产物提取

14 天后，将生产瓶中的 XAD 树脂转移到 50 毫升离心管中。弃掉管中多余的培养基，而不移去树脂。然后用 25 毫升水洗涤树脂，并让树脂沉淀。弃掉管中的水，而不移去任何的树脂，同时往管中加入 20 毫升甲醇。为将产物埃坡霉素从树脂上提取出来，将离心管放置在摇床中，于 175 转/分摇动 20-30 分钟。将甲醇提取物转移到新离心管中，以备存储和 LC/MS 分析。表 6 是所用培养基和它们各自组分的概述。

表 6

CYE 培养基	组分	浓度
	酪胨(Difco)	10 克/升
	酵母提取物(Difco)	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(EM Science)	1 克/升
生产培养基	组分	浓度
	酪胨(Difco)	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(EM Science)	2 克/升
高压灭菌后加入生		

产培养基		
	1000x 痕量元素溶液	4 毫升/升
	油酸甲酯	2 毫升/升

CYE 培养基和生产培养基通过自动灭菌的高压灭菌法于 121℃灭菌 30 分钟。痕量元素溶液过滤除菌；油酸甲酯单独高压灭菌。

将表 7 中的所有成分混合、往溶液中加入 10 毫升/升的浓缩 H_2SO_4、并使最终体积为 1 升，依此制备痕量元素溶液。

表 7

1000x 痕量元素溶液	组分	浓度
	$FeCl_3$	8.6 克/升
	$ZnCl_2$	2.0 克/升
	$MnC1_2 \cdot 4H_2O$	1.0 克/升
	$CuC1_2 \cdot 2H_2O$	0.43 克/升
	H_3BO_3	0.31 克/升
	$CaC1_2 \cdot 6H_2O$	0.24 克/升
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.24 克/升

将得到的溶液过滤除菌。

E、发酵、产生和纯化来自黄色粘球菌的埃坡霉素类

黄色粘球菌菌株的描述

菌株 K111-25-1 是埃坡霉素 B 的产生菌株，它也可产生埃坡霉素 A。菌株 K111-40-1 是埃坡霉素 D 的产生菌株，它也可产生埃坡霉素 C。

平板上黄色粘球菌的保存

黄色粘球菌保存在 CYE 琼脂平板（平板组分见表 8）上。在平板上划线分离后大约 3 天出现菌落。为获得预期的生长水平，平板在 32℃孵育，然后存储于室温，可达 3 周（平板存储于 4℃会杀死细胞）。

表 8

CYE 琼脂平板	组分	浓度
	水解的酪蛋白（胰消化物）	10 克/升
	酵母提取物	5 克/升
	琼脂	15 克/升
	$MgSO_4$	1 克/升
	1 M MOPS 缓冲液(pH 7. 6)	10 毫升/升

*1 升分批的培养基高压灭菌 45 分钟，然后倒于培养皿中。

用于细胞建库的黄色粘球菌对油的适应

将 CYE 平板上未适应油的菌落或冷冻的小瓶细胞转移到 50 毫升玻璃培养管中，该培养管中含 3 毫升 CYE 种子培养基和 1 滴来自 100 微升移液管的油酸甲酯。让细胞生长 2-6 天（30℃，175 转/分钟），直至培养物在显微镜下显得致密为止。因为这些细胞不总是很好地适应油，启动几个(5-7)平行管。

细胞建库的方法(主细胞库)

启动如上所述的适应油的试管培养物。当试管培养物足够致密(OD = 5 +/-1)时，将所有试管内含物转移到含 50 毫升 CYE-MOM 种子培养基（见下表的培养基组分）的 250 毫升无菌摇瓶中。在摇床培养箱（30℃，175 转/分钟）中生长 48 ± 12 小时后，将 5 毫升该种子培养物转移到装有 100 毫升 CYE-MOM 的 500 毫升摇瓶中。让培养物在摇床培养箱（30℃，175 转/分钟）中生长 1 天。在显微镜下检查培养物，以使细胞生长适当且无污染。

在无菌的250毫升摇瓶中，将80毫升种子培养物和24毫升无菌的90%甘油混合。使漩涡至彻底混匀，同时将该混合物按每小份 1 毫升加入 100 个无菌的、预先标记的低温小瓶。将它们放置于-80℃冰箱，慢慢冷冻。

细胞建库步骤 (工作细胞库)

通过将如上所述制备的一小瓶主细胞库在室温融化，从而启动试管培育，然后将小瓶中的全部内含物置于装有 3 毫升 CYE-MOM 种子培养基的玻璃管中。当试管培育物足够致密(OD = 5 +/-1)时，将试管的全部内含物转移到含 50 毫升 CYE-MOM 种子培养基的无菌 250 毫升摇瓶中。生长 48 ± 12 小时（30℃，175 转/分钟）后，将 5 毫升该种子培养物转移到装有 100 毫升 CYE-MOM 的 500 毫升摇瓶中。让它生长 1 天（30℃，175 转/分钟）。在显微镜下检查生长和污染。

在无菌的250毫升摇瓶中，将80毫升种子培养物和24毫升无菌的90%甘油混合。使漩涡至彻底混匀，同时将该混合物按每小份 1 毫升加入 100 个无菌的、预先标记的低温小瓶。将它们放置于-80℃冰箱，慢慢冷冻。

种子培养基的组分

如表 9 所述的同样的种子培养基用于细胞建库并扩大细胞库小瓶至需要的容量。

表 9

CYE-MOM种子培养基*	组分	浓度
	水解的酪蛋白（胰消化物）-Difco	10 克/升
	酵母提取物-Difco	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -EM Science	1 克/升
	油酸甲酯-Cognis	2 毫升/升

*注意：因为油酸甲酯在酪胨中形成乳剂，并且与其它组分不能完全混匀，所以在其它组分之后加入。

摇瓶、5 升和 1000 升发酵的接种物放大

融化冷冻的工作细胞库小瓶的油酸甲酯适应细胞。将小瓶的全部内含

物转移到含 3 毫升 CYE-MOM 种子培养基的 50 毫升玻璃培养管中。管放置在摇床（30℃，175 转/分钟）中，生长 48±24 小时。将培养管的全部内含物转移到含 50 毫升 CYE-MOM 种子培养基的 250 毫升摇瓶中。摇瓶放置在摇床（30℃，175 转/分钟）中，生长 48±24 小时。为了用于摇瓶实验，通过将 10 毫升该培养物在含 40 毫升新鲜 CYE-MOM 的 5 个新种子瓶中传代培养，以扩大种子。将种子瓶在摇床中孵育 24±12 小时，用作瓶容量（30-100 毫升）生产培养的接种物。按 4.5%混合（种子和生产培养基）的初始体积接种生产瓶。

为准备小规模（5-10 升）发酵的种子，将 1 个 50 毫升种子瓶的全部内含物在含 500 毫升 CYE-MOM 的 2.8 升无菌费氏烧瓶中传代培养。该费氏烧瓶在摇床（30℃，175 转/分钟）中孵育 48±24 小时，用作发酵罐的接种物。按 5%混合的初始体积接种生产发酵。

大规模（1000 升）发酵需要种子的进一步扩大。此时，将 1 升费氏烧瓶中的种子用来接种（以 5%体积）含 9 升 CYE-MOM 的 10 升种子发酵罐。通过加入 2.5N 氢氧化钾和 2.5N 硫酸，将发酵罐的 pH 控制在 7.4。温度设定在 30℃。通过在 400-700 转/分钟之间的阶式搅拌速率，使溶解氧维持在 50%饱和或者 50%以上饱和。起始搅拌速率设定为 400 转/分钟，且喷射速率维持在 0.1 v/v/m。在 10 升发酵罐中生长 24±12 小时后，将全部培养物转移到含 90 升 CYE-MOM 的 150 升发酵罐中。PH 再次用 2.5N 氢氧化钾和 2.5N 硫酸控制在 7.4。温度设定在 30℃。通过在 400-700 转/分钟之间的阶式搅拌速率，使溶解氧维持在 50%饱和或者 50%以上饱和。起始搅拌速率设定为 400 转/分钟，且喷射速率维持在 0.1 v/v/m。

准备用于发酵的 XAD-16 树脂

将所需量的 XAD-16 树脂(Rohm & Haas)转移到安全的甲醇容器中，该容器的最小体积为 XAD-16 树脂重量的 3 倍（即 1.2 千克树脂需要最少为 3.6 升的容器）。用 100%甲醇充分洗涤树脂，以去除存在于未用过的树脂上的单体。加入甲醇，甲醇的量按升计，为树脂按千克计的 2 倍（即 3

千克 XAD-16 需要 6 升甲醇）。将甲醇和 XAD 悬液混合 5 分钟，以去除存在于 XAD-16 上的单体。为将树脂的碎裂减至最小，在混合时轻轻搅拌浆液。停止搅拌，让树脂在重力下至少沉降 15 分钟。排出容器中的甲醇，在 XAD 层上留下 0.5-1 英寸的甲醇层。将 XAD 和甲醇从搅拌容器中转移至 Amicon VA250 柱。将上层床支撑物加到柱中，同时，通过顺时针转动密封调节旋钮密封床支撑物。用至少 5 倍柱体积的甲醇洗涤柱中的 XAD，速度为 300±50 厘米/小时。用溶剂废物容器收集流出的甲醇。用至少 10 倍柱体积的去离子水洗涤柱中的 XAD，速度为 300±50 厘米/小时。

埃坡霉素生产培养基的组分如表 10 所述

表 10

CTS-MOM 生产培养基	组分	浓度
	酪胨(Difco)	5 克/升
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (EM Science)	2 克/升
	XAD-16	20 克/升
高压灭菌后加入		
	1000x 痕量元素溶液	4 毫升/升
	油酸甲酯	2 毫升/升

*注意：因为油酸甲酯在酪胨中形成乳剂，并且与其它组分不能完全混匀，所以在其它组分之后加入。痕量元素溶液如表 7 所述。

准备和瓶规模（50 毫升）的埃坡霉素生产发酵

在 250 毫升摇瓶中，1 克 XAD-16 用足够的去离子水（~3 毫升）覆盖，进行高压灭菌。通过高压灭菌法，瓶于 121℃灭菌 30 分钟。往瓶中无菌加入如下培养基组分：50 毫升 CTS-MOM 生产培养基和 2.5 毫升 1 M HEPES 缓冲液（用氢氧化钾将 pH 滴定为 7.6）。用 2.5 毫升 CYE 种子瓶（4.5% 体积/接种物体积）接种培养物。生产瓶在摇床上于 30℃和 175 转/分钟孵育。

接种后 24±6 小时，开始供给酪胨和油酸甲酯。在这一时间点和以后每 24±6 小时，供给 1 毫升 100 克/升酪胨溶液和 150 微升油酸甲酯。继续这种供给方案，直至初次供给后 13 天，或者直至观察到细胞开始裂解(11-14 天)。为确定产物埃坡霉素的动力学，取 5 毫升有代表性的发酵肉汤和 XAD 的充分混合物作为样品。此外，每天取小份（0.25-0.5 毫升）无 XAD 的肉汤，在视觉上检查培养物的生长状况。当观察到大量细胞裂解时，应收获剩余体积的培养物。

准备和 5 升规模的埃坡霉素生产发酵

100 克 XAD 和 8 克 $MgSO_4$ $7H_2O$ 与 3.9 升去离子水混合，并且在 5 升的 B-Braun 生物反应器中灭菌（90 分钟，121℃）。将足够(133 毫升)的预先灭菌的酪胨/去离子水溶液(150 克/升)无菌泵进，使发酵罐中酪胨的最终浓度达到 5 克/升。通过加入 10 毫升油酸甲酯，使油的最初浓度达到 2 毫升/升。最后，在孵育之前无菌加入 16 毫升预先灭菌的痕量元素溶液。然后发酵罐用 200 毫升 CYE 种子培养物接种（4.8%体积/体积），并且允许生长 24±6 小时。在这一时间点，开始供给酪胨（2 克/升/天，连续供给）和油酸甲酯（共 3 毫升/升/天，每 90 分钟进行一次半连续供给）。生物反应器中的气流保持恒定，速度为 0.4-0.5 vvm（如供给程序一样，增加发酵体积导致这种变化）。通过阶式搅拌（400-700 转/分钟），将溶解氧浓度控制在 50%饱和。通过设定初始搅拌速度为 400 转/分钟和初始气流为 0.5 vvm，建立 100%饱和溶解氧校准点。通过自动加入 2. 5N H_2SO_4 和 2.5N KOH，保持 pH 为 7.4。接种后埃坡霉素可连续生产 11-14 天，当肉汤样品中的细胞裂解明显和对氧的需求（如搅拌速率所示）急剧下降时，收集生物反应器。在本发酵方法中，埃坡霉素 D 的滴度一般可达到 18-25 毫克/升。

准备和 1000 升规模的埃坡霉素生产发酵

用作埃坡霉素生产的 1000 升发酵罐按如下准备。600 升水和 18 升

（11.574 千克）XAD-16 在发酵罐中灭菌（45 分钟，121℃）。痕量金属和 $MgSO_4$ 过滤除菌（通过预先灭菌的 0.2 微米聚醚砜膜囊状过滤器），直接导入发酵容器。用同样的囊状过滤器，加入 2.9 升痕量元素溶液和足够量的浓缩 $MgSO_4$ 溶液（发酵罐中的最终浓度达到 2 克/升）。约 200 升 117 克/升酪胨和 175 毫升/升油酸甲酯的混合物在 260 升的供给容器中灭菌。将大约 32 升灭菌混合物加入 1000 升发酵罐中。将水过滤（通过同样的囊状过滤器）入容器中，使最终体积为 710 升。搅拌速度为 100 转/分钟。反压保持在 100-300 毫巴。当接种后溶解氧(DO)达到 50%时，搅拌速度增加到 150 转/分钟。当 DO 再次达到 50%时，搅拌速度增加到 200 转/分钟。通过阶式气流(0 Lpm-240 Lpm)，控制 DO 在 50%饱和。通过自动加入 2.5 M KOH 和 2.5 N H_2SO_4，使 pH 设定值保持在 7.4。用 38 升来自 150 升发酵罐的种子接种发酵罐（5%体积/体积）。

DO 达到 50%后（第 2 次，大约接种后 10±5 小时），开始加入 0.570 升/小时的酪胨-油酸甲酯供给溶液，并且继续直至收获发酵罐。接种后 10 天收获生物反应器。埃坡霉素 D 的最后滴度测定为大约 20±5 毫克/升。

发酵采样方法

为进行瓶中的动力学实验，用 25 毫升移液管采集 5-50 毫升充分混合的肉汤和 XAD 树脂，并置于 10 或 50 毫升的圆锥形试管中。对生物反应器样品，将 50 毫升混合的肉汤和树脂样品置于 50 毫升圆锥形试管中。然后让圆锥形试管静置 10 分钟，使 XAD 沉降于试管底部。此时，从 XAD 树脂中弃掉肉汤。如果 XAD 不沉淀，则用 10-25 毫升吸量管移去肉汤。

为定量埃坡霉素滴度，用甲醇提取 XAD 树脂

XAD 树脂已在重力作用下沉降于样品管底部后（如前述采样方法），将所有上清转移到一个新 50 毫升圆锥形管中。加水至 50 毫升标记洗涤 XAD 树脂 1 次，通过颠倒充分混合以及在重力作用下让 XAD 树脂再次沉降。轻轻倒掉试管中的水样混合物，而不倒掉 XAD。用 1 毫升移液器把枪

尖推入试管的底部移去最后几毫升水。往试管中加入甲醇至 25 毫升，并且盖上试管的盖子。将圆锥形试管水平放在摇床上 30 分钟（温度 20-30℃），以从 XAD 树脂中充分提取所有埃坡霉素。

埃坡霉素定量的 HPLC 方法

利用 Hewlett Packard 1090 HPLC，进行埃坡霉素类 C 和 D 的分析，UV 检测波长为 250 nm。来自 XAD 树脂（50 微升）的甲醇提取溶液通过 2 个 4.6 x 10 mm 保护柱(Inertsil, C18 OD 53, 5μm)和一个更长的用于层析法分离相同材料的柱(4.6 x 150 mm)注入。该方法为用 60%乙腈和 40%水恒溶剂运行 18 分钟。用这种方法，埃坡霉素 D 在 13 分钟洗脱，埃坡霉素 C 在 10.3 分钟洗脱。用从发酵肉汤中纯化的埃坡霉素 D 制备标准品。

用于生长曲线中的干细胞称重方法

将 Sorvall RC5B 离心机（用 SH-3000 斗式转子）的温度设定为 20℃。称重至少已在 80℃烤箱烘烤至少 1 天的 50 毫升圆锥形试管。在试管侧面记录皮重和发酵样品的身份。将 40 毫升肉汤（不含 XAD）倒进或用吸量管吸进称量管。圆锥形管于 4700 转/分钟（4200g）离心 30 分钟。沉淀后，倒掉上清，同时用 40 毫升去离子水重悬细胞沉淀，以洗涤沉淀。管再次离心（4200g，30 分钟）。弃掉上清，并将管在 80℃干燥箱中至少放置 2 天。对管称重，并在管上记录最后重量。然后干细胞重(DCW)按下述等式计算：DCW（克/升）=（管最后重量（克）—管的皮重（克））/.04 升。

铵离子浓度的测定

在埃坡霉素发酵中，例行测定发酵肉汤中的氨浓度。在微量离心机中离心(5 分钟,12000 转/分钟),使 1 毫升发酵肉汤澄清。采用 Sigma (Catalog # 171-UV)的氨测定试剂盒进行定量，其中用澄清的发酵肉汤取代试剂盒操作程序中的血浆。因为该比色测定的线性响应范围只为 0.01176-0.882 mM/升，所以澄清的发酵样品一般在去离子水中稀释 20-100 倍，以在此范围内

测定铵浓度。

测定残存的油酸甲酯浓度

通过用甲醇提取发酵肉汤样品和在 HPLC 上运行这些提取肉汤样品，可测定存在于发酵肉汤中残存油酸甲酯的量。油酸甲酯浓度的定量用 Hewlett Packard 1090 HPLC 进行，UV 检测波长为 210 nm。全部肉汤样品（1-4 毫升）用等体积甲醇提取，并在 12,000 g 离心，以沉淀不溶成分。澄清上清（50 微升）注入 4.6 x 10 mm 提取柱(Inertsil, C18 OD 53, 5μm)、用 50%乙腈洗 2 分钟、然后在主柱（4.6 x 150 mm，同样的固定相和流速）上洗脱 24 分钟，乙腈梯度从 50%开始，100%结束。100%乙腈在柱中的流动保持 5 分钟。由于油酸甲酯不均一的特性，它洗脱时有许多不同的峰，而不是单一的纯化合物。然而，在全部提取出的油酸甲酯中，大约 64-67%出现在 2 个主峰，分别在 25.3 ± 0.2 和 27.1 ± 0.2 分钟洗脱。甲醇提取的发酵样品中的油酸甲酯可通过测定这 2 个主峰的总面积进行估计，然后用 50%水/甲醇配制的油酸甲酯标准物的这 2 个主峰的总面积进行校准。

埃坡霉素 D 的纯化和结晶

本发明提供了埃坡霉素类和埃坡霉素 D 纯化方法，并提供了高纯度埃坡霉素 D 制剂，包括结晶形态的埃坡霉素 D。本方法的优点包括最初的纯化步骤只需要乙醇（如甲醇）和水，这使得可高效利用产物合并液，并对费时和费力的蒸发步骤的需求减至最少。本方法只需要单一的蒸发步骤，该方法地每 10-15 克埃坡霉素需要蒸发 1 升乙醇。本方法中，用合成的聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂如 HP20SS 填充柱子来去除极性和亲脂的杂质。该柱产生含 10%埃坡霉素类的中间产物，并且无需使用高度可燃或者有毒溶剂的液体/液体提取。

另一个改进涉及具分布有 40-60 微米颗粒的 C18 树脂的使用，如 Bakerbond C18，它使得可用低压柱和泵（低于 50 psi），这极大降低成本。C18 层析步骤的起始材料是溶于稀释装填溶剂的溶液。溶剂非常弱，以便

埃坡霉素类以高度浓缩形式的密带位于柱的顶部，这使柱子在大装载量（2-5 克埃坡霉素/升树脂）的情况下良好运行。因为一般的柱装载量是 1 克/升或者更少，且层析通常是纯化中最为昂贵的步骤，所以这种改进使成本大量节约。此外，本方法允许使用醇，如甲醇，而不是层析步骤中的乙腈。含埃坡霉素的收集物从二相溶剂系统中结晶，在该溶剂系统中，水是强制溶剂（forcing solvent），以提供结晶形式的埃坡霉素。

在一个实施方案中，纯化方法由下述步骤和材料组成。发酵肉汤中的 XAD 树脂（1）收集于过滤蓝，（2）并洗脱出来，提供 XAD 提取物，（3）该提取物用水稀释，（4）并通过 HP20SS 柱以提供 HP20SS 收集物。（5）HP20SS 收集物用水稀释，（6）经过 C18 层析以提供埃坡霉素收集物，（7）该埃坡霉素收集物用水稀释，（8）经过溶剂交换以提供浓缩的埃坡霉素收集物。浓缩的埃坡霉素收集物经过（9）活性炭过滤、（10）蒸发和（11）结晶，提供高度纯化的材料。

从 2 个 1000 升黄色粘球菌发酵中(1031001K 和 1117001K)，总共分离到 11 克埃坡霉素 D，并纯化成白色晶体粉末。最终产物的纯度大于 95%，埃坡霉素 D 的回收效率为 71%。

表 11 概述了纯化中使用的 HPLC 方法

表 11

Epo1 法		
	柱	Inertsil ODS3, 5 μm, 4. 6 x150mm
	流速	1 毫升/分钟
	柱加热炉	50℃
	运行时间	15 分钟
	检测	UV 250 nm 处
	梯度	0 分钟； 60:40 ACN/水 12 分钟； 100:0 ACN/水 12.1 分钟； 60:40 ACN/水
Epo78 法		

	柱	Inertsil ODS3, 5 μm, 4. 6 x150mm
	流速	1 毫升/分钟
	柱加热炉	50℃
	运行时间	5 分钟
	检测	UV 250 nm 处
	梯度	0 分钟; 78:22 ACN/水

本部分使用的材料如下。HP20SS 树脂购自 Mitsubishi。C18 购自 Bakerbond C18 40g，甲醇购自 Fisher Bulk (55 gal)。使用去离子水。

发酵运行 1031001K

步骤 1 XAD 洗脱(K125-173)

使用带有 13 升、150 μm 捕获蓝的主流过滤装置，从发酵培养物中过滤 17 升 XAD-16 树脂。用捕获的 XAD 树脂装填 Amicon VA250 柱，并用 65 升（3.8 倍柱体积）水洗涤，流速 1.0 升/分钟。然后用 230 升溶于水的 80%甲醇将产物埃坡霉素 D 从树脂上洗脱。

步骤 2 固相提取(K125-175)

将 77 升水加入步骤 1 的产物合并液（230 升）中，以将装载溶剂稀释成溶于水的 60%甲醇。将得到的悬液(307 升)混合，并装载用 5 升 HP20SS 树脂填充的 Amicon VA180 柱，该树脂之前已用 5 倍柱体积的 60%甲醇平衡。装载流速为 1 升/分钟。装载后，柱用 13 升 60%甲醇洗涤，并用 77 升 75%甲醇洗脱，流速为 325 毫升/分钟。收集 31 个 2.5 升洗脱级分。发现级分 10-26(42.5 升)含有埃坡霉素 D，将这些部分合并在一起。

步骤 3 层析(K125-179)

用 2 个 20 升的旋转蒸发器将步骤 2 中的产物合并液蒸发成油。在蒸发过程中，为将泡沫减至最小，有必要加入乙醇。干燥材料重悬于 1.0 升甲醇中，并用 0.67 升水稀释，制成 1.67 升 60%甲醇溶液。将得到的溶液装

载 1 升 C18 层析柱(55 x 4.8 厘米)，该柱之前已用 3 倍柱体积的 60%甲醇平衡。装载流速平均为 64 毫升/分钟。装载柱用 1 升 60%甲醇洗涤，并用等梯度 70%甲醇洗脱产物埃坡霉素 D，流速为 33 毫升/分钟。共收集了 27 个级分，第 1 级分含 3.8 升。接着是 3 个 500 毫升级分和 23 个 250 毫升级分。认为级分 5-20 为最好的收集物(K125-179-D)，含有 4.8 克埃坡霉素 D。级分 3-4(K125-179-C)含有 1.4 克埃坡霉素 D。因为该收集物中也含有高浓度埃坡霉素 C，所以将它放到一边以便重做（步骤 3b）。

步骤 4 层析(K119-153)

也含有高浓度类似物埃坡霉素 C 的埃坡霉素 D 级分在 C18 树脂上重新进行如下层析。用 C18 树脂填充 2.5 x 50 厘米柱，以 1 升 100%甲醇洗涤，并用 1 升溶于水的 55%甲醇平衡，流速为 20 毫升/分钟。压力差为 125 psi。起始材料(K125-179-C, 1040 毫升)用 260 毫升水稀释，以便装载溶液含有溶于水的 55%甲醇。得到的溶液(1300 毫升)装载在树脂上，并将另外 250 毫升 55%甲醇通过该柱。柱开始用 5 升 65%甲醇洗脱，接着用 3 升溶于水的 70%甲醇。在 65%甲醇洗脱期间，共收集了 48 个 100 毫升级分。当转为用 70%甲醇后，共收集了 10 个 250 毫升的级分。级分 50-58 是最好的埃坡霉素 D 收集物(K119-153-D)，含有 1.0 克目标产物。

步骤 5a 的结晶(K119-158)

本步骤的起始材料是步骤 3 和 4 层析产物的合并。开始，将 120 毫升乙醇加入 7.9 克含 5.5 克埃坡霉素 D 的固体颗粒中。随着轻轻混合，固体颗粒完全溶解，并将溶液转移到放置在通风橱搅拌平台上的 400 毫升烧杯中。加入 1"搅拌棒，同时溶液得到迅速搅拌。同时在大约 5 分钟的时间内慢慢加入 100 毫升水。当观察到白色小晶体形成时，将溶液再搅拌 15 分钟，直至溶液变稠，并有白色固体。然后将烧杯从搅拌平台上移开，用铝箔覆盖，并在冰箱(2℃)中放置 12 小时。白色固体用 Whatman #50 滤纸过滤，并且在头次收获时，不进行另外的洗涤。固体放置在结晶盘中，并且在真

空烘箱（40℃，15 毫巴）中干燥 1 小时。随后，材料从烘箱中移去，制成更细的颗粒，并在真空烘箱中再干燥 4 小时。本结晶方法产生 3.41 克灰白色固体。Epo1 HPLC 方法用于测定最终产物的层析纯度。HPLC 结果和相应的 ^{1}H 和 ^{13}C NMR 数据一起，都证实干燥材料含有 95%以上的埃坡霉素 D。头次收获物的回收率为 58%。

步骤 5b 结晶化(K119-167)

本步骤的起始材料是来自步骤 5a 的蒸发母液。开始，70 毫升乙醇和 30 毫升水加入 3.4 克含有 2.1 克埃坡霉素 D 的固体颗粒。将清澈溶液转移到烧杯中，并往杯中加入 1 克脱色的活性炭。混合物在中速设置上搅拌 10 分钟，然后用 Whatman #50 滤纸过滤。活性炭用 2 个 10 毫升乙醇洗涤，并再次过滤。用旋转蒸发器使合并的滤出液干燥，并将固体重悬于 50 毫升乙醇中。得到的溶液置于 250 毫升烧杯中，随着充分搅拌，慢慢加入 50 毫升水。为促进晶体的形成，往混合物中加入少量的种子晶体（1 毫克）。搅拌几分钟后，观察到有另外的白色固体形成。当搅拌继续时，使一阵氮气轻轻吹过混合物表面。15 分钟后，将烧杯在冰箱 2℃放置 36 小时。用 Whatman #50 滤纸过滤混合物，以捕获晶体，同时用另外的 7 毫升 50:50 的乙醇:水洗涤固体。随后，晶体在真空烘箱中干燥 4 小时。该结晶步骤产生 1.46 克含 95%以上埃坡霉素 D 的白色晶体。

发酵运行 1117001K

步骤 1 XAD 的洗脱(K125-182)

使用带有 13 升、150 μm 捕获蓝的主流过滤装置，从发酵培养物中过滤 17 升 XAD-16 树脂。用捕获的 XAD 树脂装填 Amicon VA250 柱，并用 58 升（3.4 倍柱体积）水洗涤，流速 1.0 升/分钟。然后用 170 升溶于水的 80%甲醇将产物埃坡霉素 D 从树脂上洗脱。在用水洗涤和首次柱体积洗脱期间，柱的反压稳定地增至 3 巴以上，伴随着最终流速在 300 毫升/分钟以下。因此，将 XAD 树脂从柱中移去，并重新填充另一个 Amicon VA250

柱。交换后，反压下降至 1 巴以下，并且流速保持在 1.0 升/分钟。将单一的 170 升洗脱级分收集在 600 升的不锈钢容器中。根据 HPLC 分析，发现步骤 1 中的产物收集物中含 8.4 克埃坡霉素 D。

步骤 2 固相提取(K145-150)

将 57 升水加入步骤 1 的产物合并液（170 升）中，以将装载溶剂稀释成溶于水的 60%甲醇。得到的悬液（227 升）用高架闪电搅拌器(overhead lightning mixer)搅拌，并装载用 6.5 升 HP20SS 树脂填充的 Amicon VA180 柱，该树脂之前已用 5 倍柱体积的 60%甲醇平衡。装载流速为 1 升/分钟。装载后，柱用 16 升 60%甲醇洗涤，并用 84 升 75%甲醇洗脱，流速为 300 毫升/分钟。收集的 7 个级分的体积分别是 18 升、6 升、6 升、6 升、36 升、6 升和 6 升。级分 4 和 5 含埃坡霉素 D 总计 8.8 克，将它们合并在一起。

步骤 3 层析(K145-160)

用 2 个 20 升的旋转蒸发器，将步骤 2 的产物合并液蒸发成油。在蒸发过程中，为将泡沫减至最小，往混合物中加入 10 升乙醇。干燥材料重悬于 2.8 升甲醇中，并用 3.4 升水稀释，制成 6.2 升 45%的甲醇溶液。得到的溶液泵进 1 升 C18 层析柱(55 x 4. 8 厘米)，该柱之前已用 5 倍柱体积的 45%甲醇平衡。装载流速平均为 100 毫升/分钟。用 1 升 60%甲醇洗涤装载柱，并用分级梯度将产物埃坡霉素 D 从树脂上洗脱下来，流速为 100 毫升/分钟。柱用 5 升 55%甲醇、11.5 升 60%甲醇和 13.5 升 65%甲醇洗脱。在用 55%甲醇洗脱过程中，共收集了 10 个 500 毫升的洗脱级分。转为用 60%甲醇后，共收集了 23 个 500 毫升的洗脱级分。在用最后的 65%甲醇洗脱过程中收集了 11 个 500 毫升的洗脱级分，接着是 8 个 1 升的洗脱级分。最好的埃坡霉素 D 收集液(K145-160-D)由级分 28-50 组成，含有 8.3 克目标产物。污染有 0.4 克埃坡霉素 C 的级分 26-27(K145-160-C)含有 0.2 克埃坡霉素 D。将所有的 25 个级分混合在一起。

为将产物合并液稀释成溶于水的 40%甲醇，将 9.5 升水加至 15.8 升装

载溶液中。然后将得到的溶液（25.3 升）泵进 700 毫升 C18 层析柱(9 x 10 厘米)，该柱之前已用 4 倍柱体积的 40%甲醇平衡。装载流速平均为 360 毫升/分钟。用 1 升 40%甲醇洗涤装载柱，用 3.75 升 100%乙醇将产物埃坡霉素 D 从树脂上洗脱。洗脱物用旋转蒸发器蒸发干。将该固体颗粒重悬于 100 毫升丙酮，不溶物质用 Whatman #2 滤纸从溶液中滤出。将过滤颗粒用另外 115 毫升丙酮洗涤，并再次过滤。丙酮提取之后，往合并滤液中加入 2 克脱色活性炭。混合物在中速设置上搅拌 1 小时，并用 Whatman #50 滤纸过滤。活性炭用 180 毫升乙醇洗涤，并再次过滤。合并滤液，并旋转蒸发至干。

步骤 4 层析(K119-174)

来自步骤 3 的干燥材料重悬于 5.0 升溶于水的 50%甲醇，并装载 1 升 C18 层析柱(55 x 4. 8 厘米)，该柱之前已用 3 倍柱体积 50%甲醇平衡。装载流速平均为 80 毫升/分钟。随后，用 1 升 50%甲醇洗涤柱子，并且产物埃坡霉素 D 用 70%甲醇、按相同的流速从树脂上等梯度洗脱下来。共收集了 48 个洗脱级分，其中开始 47 个级分含有 240 毫升，最后一个级分含有 1 升。级分 25-48 认为是最好的合并液(K119-174-D)，含有 7.4 克埃坡霉素 D。级分 21-24(K119-174-C)含有 1.1 克埃坡霉素 D。因为该合并液也含有高浓度的埃坡霉素 C，所以将它放到一边，以便重做。

步骤 5 结晶(K119-177)

为在结晶步骤之前进行溶剂的交换，将 3.9 升水加入来自步骤 5 的 6.4 升最好的埃坡霉素 D 合并液(K119-174-D)，以将装载溶液稀释成溶于水的 40%甲醇。然后将所得溶液装载 200 毫升 C18 层析柱(2. 5 x 10 厘米)，该柱之前已用 3 倍柱体积的 40%甲醇平衡。用 200 毫升 40%甲醇洗涤装载柱，并用 1 升 100%乙醇将产物埃坡霉素 D 从树脂上洗脱下来。洗脱物用旋转蒸发器蒸发至干，并将固体重悬于 150 毫升 100%乙醇。将清澈溶液转移到烧杯中，并伴随着良好的搅拌，慢慢加入 175 毫升水。溶液中也加入小

块种子晶体（1 毫克），以促进晶体形成。当可观察到白色小晶体形成时，溶液再搅拌 15 分钟，直至溶液变稠，并伴随有白色固体。然后将烧杯从搅拌平台上移开，覆盖铝箔，并在冰箱（2℃）中放置 12 小时。白色固体用 Whatman #50 滤纸过滤，在此首次收获时，没有进行另外的洗涤。将固体置于结晶盘，并在真空烘箱(40℃，15 毫巴)中干燥 6 小时。本结晶方法产生 6.2 克含 95%以上埃坡霉素 D 的白色固体。首次收获的回收率是 74%。

结果

运行 1031001K 的埃坡霉素 D 回收率是纯度约为 97. 5-98. 8%的 4. 8 克晶体物质。运行 1117001K 的埃坡霉素 D 回收率是纯度约为 97. 7%的 6. 2 克晶体物质。这些运行方法的杂质特性如表 12 所示。

表 12

1031001K 运行	步骤	产物	Epo C	Epo490	Epo D
	2	SPE	23	4	74
	3-4	总色谱	0.7	0.7	90.6
	5a	结晶	1.0	1.0	97.5
	5b	结晶	0.7	0.5	98.8
1117001K 运行	步骤	产物	Epo C	Epo490	Epo D
	2	SPE	18	2	60
	3	C18 色谱	5.2	1.6	81.4
	4	C18 色谱	1.6	1.8	96.6
	5	结晶	0.8	1.4	97.7

“Epo490”是本发明的一种新埃坡霉素化合物，为 10,11-脱氢埃坡霉素 D，该化合物由粘球菌宿主细胞生产。

本纯化方法起于对埃坡霉素 D 纯化方法而努力做的大规模改进，为在发酵培养基中适应于油酸甲酯的使用。埃坡霉素 D 产物从 XAD 树脂上的

洗脱以直接的方式进行。不使用 100%甲醇，而用 10 倍柱体积的 80%甲醇从柱中的珠上洗脱产物。在 XAD 洗脱步骤中，注意到发酵肉汤中裂解细胞的存在可能会使纯化柱堵塞。103100-1K 发酵运行在明显的细胞裂解发生之前收获，而 111700-1K 发酵运行只在大量细胞裂解发生后才收获。然而，在洗脱过程时，只在后一运行中观察到高的反压和低流速。因此，可能是此运行中的裂解细胞聚集，并随后堵塞了柱的过滤器。

这些纯化运行表明，埃坡霉素 D 在 80%甲醇中于室温至少稳定存在 1 天。根据 HPLC 分析，在这些条件下，未检测到产物的降解。该发现允许将来自 XAD 洗脱步骤的 170 升产物合并液在 600 升不锈钢容器中过夜，而不需冷冻。为进一步改善该方法，使用溶剂交换柱，这比用旋转蒸发来浓缩产物合并液的体积费时和费力更少。因此，可用溶剂交换步骤代替大规模旋转蒸发。

虽然在 XAD 洗脱步骤中，有显著量的油依然结合在树脂上，但在洗脱液中仍存在相当量的油。甚至在 HP20SS 固相提取后，在产物合并液中可清楚看到油滴，且在 C18 层析中是个问题。为得到最佳层析特性，装载溶液中埃坡霉素 D 的浓度应维持在 2 克/升以下。在更高浓度时，起始材料在柱子上出油的倾向。

当供给物质含有 3%以上埃坡霉素 C 或 epo490 时，结晶是不可能的。在 1117001K 纯化就是如此。第 1 次层析步骤产生的产物含有 5% 埃坡霉素 C。多次尝试后，没有完成该物质的结晶。然而，将该物质通过第 2 次层析步骤可将埃坡霉素 C 降低至 1 %，并产生易于结晶的供给物质。

实施例 4

构建具无功能 epoK 基因的粘球菌菌株

通过插入灭活 epoK 基因，从 K111-32.25 菌株构建 K111-40-1 菌株。为构建该 epoK 突变体，将卡那霉素抗性盒插入 epoK 基因。从 pKOS35-79.85 分离含 epoK 基因的 4879 bp 片段，并将其连入 pBluescriptSKII+的 NotI 位点，从而完成该构建。该质粒 pKOS35-83.5 用 ScaI 部分切割，并且将

7.4 kb 片段和 1.5 kb 含 pBJ180-2 的卡那霉素抗性基因的 EcoRI-BamHI 片段连接，产生质粒 pKOS90-55，其中后者的 1.5 kb 片段具有用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段补平的 DNA 平端。最后，将来自 pBJ183 的约 400 bp RP4 oriT 片段连入 XbaI 和 EcoRI 位点，以产生 pKOS90-63。该质粒用 DraI 线性化，并电穿孔入黄色粘球菌菌株 K111-32.25，挑选转化子，以提供黄色粘球菌菌株 K111-40.1。菌株 K111-40.1 根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2712 下得到。

为产生无标记的 epoK 突变，pKOS35-83.5 用 ScaI 切割，并将 2.9 kb 和 4.3 kb 的片段连接起来。质粒 pKOS90-101 在 epoK 上有一框架内缺失。接着，将 KG2 中的 3 kb BamHI 和 NdeI 片段连入 pKOS90-101 的 DraI 位点，以构建 pKOS90-105，其中前者的 3 kb 片段有用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段补平的 DNA 平端，并含有卡那霉素抗性和 galK 基因。将该质粒电穿孔入 K111-32.25，同时挑选卡那霉素抗性电穿孔子。为用缺失体替换野生型 epoK 拷贝，通过在半乳糖平板上生长来挑选第 2 次重组事件。检测半乳糖抗性菌落的埃坡霉素 C 和 D 的产生，并将生产菌株命名为 K111-72.4.4，并且根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2713 下可获得。

实施例 5

matBC 的添加

matBC 基因分别编码丙二酸单酰 CoA 合成酶和二羧酸酯载体蛋白。见 An 和 Kim, 1998, 欧洲生物化学杂志（Eur. J. Biochem.）257 : 395-402，此处引用作为参考。这 2 种蛋白质在细胞内负责将外源丙二酸酯转换为丙二酸单酰 CoA。这 2 种基因产物可运输二羧酸，并将它们转换成 CoA 衍生物（见 PCT 专利申请号 US00/28573，此处引用作为参考）。这 2 种基

因可插入黄色粘球菌染色体，以增加丙二酸单酰 CoA 和甲基丙二酸单酰 CoA 的细胞浓度，从而增加聚酮化合物的产量。这可通过如下途径实现，用 BglII 和 SpeI 切割 pMATOP-2，并将其连入 pKOS35-82.1 的 BglII 和 SpeI 位点，其中 pKOS35-82.1 含有四环素抗性赋予基因、Mx8 att 位点和驱使 matBC 表达的黄色粘球菌 pilA 启动子。该质粒可电穿孔导入黄色粘球菌。因为 pilA 启动子被高效转录，所以在本事件中有必要插入较弱的启动子，因为过多的 MatB 和 MatC 影响细胞生长。其它启动子包括卡那霉素抗性赋予基因的启动子。

实施例 6

装载组件中的 KS^Y 突变

启动埃坡霉素生物合成的假设机制是丙二酸酯与装载结构域的 ACP 结合，以及随后通过装载 KS 结构域的脱羧作用。装载 KS 结构域在活性位点的半胱氨酸处含有一个酪氨酸(KS^Y)，这使得该活性位点不能进行缩合反应。然而，认为它仍可进行脱羧反应。用鼠脂肪酸合酶进行的实验显示，在活性中心半胱氨酸处含有一个谷氨酰胺(KS^Q)的 KS 结构域，它与野生型相比可使脱羧作用上升 2 个数量级，但将该氨基酸改变成丝氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、甘氨酸或苏氨酸却不会提高脱羧作用。因此，将 KS^Y 改变成 KS^Q 会增加埃坡霉素的起动，从而使埃坡霉素的产量增加。为在菌株 K111-32.25 中产生该变化，构建具有约 850 bp 埃坡霉素 KS 装载组件编码序列的质粒 pKOS39-148。通过定点诱变在该质粒中产生 KS^Q 突变。为在 K111-32.25 中进行基因替换，将来自 KG2 的卡那霉素抗性和 galK 基因插入 pKOS39-148 的 DraI 位点，以产生质粒 pKOS111-56.2A 和 pKOS111-56.2B。这些质粒中的卡那霉素-galK 盒的方向不同。这些质粒电穿孔入 K111-32.25，并挑选卡那霉素抗性菌落，从而产生菌株 K111-63。为取代野生型装载组件 KS，将 K111-63 铺于 CYE 半乳糖平板，并通过 PCR 和测序来筛选 KS^Q 突变。

实施例 7

mtaA 的添加

为增加磷酸泛酰巯基乙基转移酶(PPTase)蛋白质的水平，将来自橙色标桩囊菌菌株 DW4 的 PPTase 加入 K111-32.25。这通过如下方法实现：用以下引物

111-44.1 (AAAAGCTTCGGGGCACCTCCTGGCTGTCGGC) (SEQ ID NO:4) 和 111-44.4 (GGTTAATTAATCACCCTCCTCCCACCCCGGGCAT) (SEQ ID NO:5).

从 DW4 的染色体 DNA 通过 PCR 扩增 matA。见 Silakowski 等，1999，生物化学杂志 274 (52) : 37391-37399，此处引用作为参考。该约 800 bp 片段用 NcoI 切割，并连入用 PstI 切割后，将其 DNA 末端用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段补平、并用 NcoI 切割的 pUHE24-2B。该质粒命名为 pKOS111-54。将 mtaA 基因转移到含有四环素抗性赋予基因、Mx8 att 位点和驱动 mtaA 表达的黄色粘球菌 pilA 启动子的质粒 pKOS35-82.1 中。将该质粒导入黄色粘球菌，并整合 Mx8 噬菌体附着位点。

实施例 8

启动子置换质粒的构建

为提高埃坡霉素的产量水平，并阐明在本发明的宿主细胞中可用于表达 PKS 基因的多种启动子，用其它适当启动子置换纤维堆囊菌埃坡霉素 PKS 基因启动子，构建了一系列载体和宿主细胞，如本实施例中所述。

A、带有下游侧翼区质粒的构建

粘粒 pKOS35-70.8A3 用 NsiI 和 AvrII 切割。将 9.5 kb 片段与用 PstI 和 AvrII 切割的 pSL1190 连接，产生 pKOS90-13。质粒 pKOS90-13 约为 12.9 kb。将它用 EcoRI/AvrII 切割。将 5.1kb 片段与用 EcoRI/SpeI 消化的 pBluescript 连接，以产生 pKOS90-64 (~8.1 kb)。该质粒含有启动子（epoA 和起始密码子上游的一些序列）的下游侧翼区。EcoRI 位点在 epoA

基因的起始密码子上游约 220 bp。AvrII 位点在 EcoRI 位点下游 5100 bp。

B、上游侧翼区的克隆

用引物 90-66.1 和 90-67（如下所示）克隆上游侧翼区。引物 90-67 在 PCR 片段的 5'末端，且引物 90-66. 1 在 PCR 片段的 3'末端，该片段终止于 epoA 基因起始密码子之前的 2481 bp。将~2. 2 kb 片段用 HindIII 切割。加入克列诺聚合酶补平 HindIII 位点。将该片段连入 pNEB193 的 HincII 位点。挑选那些具有正确插入方向，也就是 EcoRI 位点在插入片段下游末端、并且 HindIII 在插入片段上游末端的克隆，并命名为 pKOS90-90。

90-66.1: 5′ GCGGG AAGCTT TCACGGCGCAGGCCCTCGTGGG 3′ (SEQ ID NO:6)

接头 *HindIII* 引物

90-67: 5′ GC GGTACC TTCAACAGGCAGGCCGTCTCATG 3′ (SEQ ID NO:7)

接头 *KpnI* 引物

C、最终质粒的构建

质粒 pKOS90-90 用 EcoRI 和 HindIII 切割。将 2. 2 kb 片段与用 EcoRI/HindIII 消化的 pKOS90-64 连接，构建 pKOS 90-91 (10. 3 kb)。质粒 pKOS90-91 含有启动子的上游侧翼区，接着是 pBluescript 的下游侧翼区。在 2 个侧翼区中间，有一个可克隆目标启动子的 PacI 位点。然后将 galK/kan^r 盒插入，使其能够重组进入黄色粘球菌。质粒 pKOS90-91 用 DraI 切割。DraI 在 amp 基因内切割一次，在载体内（amp 基因附近）切割 2 次。质粒 KG-2 用 BamHI/NdeI 切割，并加入克列诺聚合酶将片段补平。将 3 kb 片段（含 galK/kan^r 基因）与 pKOS90-91 的~9. 8 kb DraI 片段连接，以产生 pKOS90-102 (12. 8 kb)。

D、构建带有其它前导序列的质粒

埃坡霉素 PKS 基因的天然前导区可用具不同核糖体结合位点的前导

序列替换。质粒 pKOS39-136（如美国专利申请系列号 09/443, 501 所述，申请日 1999 年 11 月 19 日）用 PacI/AscI 切割。分离含有前导序列和部分 epoA 序列的 3 kb 片段，并与 pKOS90-102 的 9. 6 kb PacI/AscI 片段连接，以产生 pKOS90-106 (~12. 7 kb)。

E、构建启动子置换质粒

I、MTA (粘噻唑菌醇) 启动子

用引物 111-44. 3 和 111-44. 5(如下所示)从橙色标桩囊菌染色体 DNA（菌株 DW4）中 PCR 扩增粘噻唑菌醇启动子。将~554 bp 条带克隆入 pNEB193 的 HincII 位点，以产生 pKOS90-107。质粒 pKOS90-107 用 PstI 和 XbaI 切割，并用克列诺补平。将 560 bp 条带克隆入用 PacI 切割、并用克列诺补平的 pKOS90-102 和 pKOS90-106（PacI 在 pKOS90-102 和 pKOS90-106 中只切割 1 次）。筛选正确插入方向的质粒。MTA 启动子/pKOS90102 质粒命名为 pKOS90-114 (13. 36 kb)，同时，MTA 启动子/pKOS90-106 质粒命名为 pKOS90-113 (13. 26 kb)。

111-44.3 5′ AA AAGCTT AGGCGGTATTGCTTTCGTTGCACT 3′ (SEQ ID NO:8)
接头 HindIII 引物

111-44.5 5′ GG TTAATTAA GGTCAGCACACGGTCCGTGTGCAT 3′ (SEQ ID NO:9)
接头 PacI 引物

将这些质粒电穿孔入含有埃坡霉素 PKS 基因的粘球菌宿主细胞，挑选卡那霉素抗性重组子以鉴定单一交换体重组子。对这些重组子筛选半乳糖抗性，以确定双交换重组子，这些重组子通过 Southern 分析和 PCR 进行筛选，从而鉴定那些含有目标重组事件的重组子。将目标重组子进行培养，并检测埃坡霉素的产生。

II、TA 启动子

用下列引物:

111-44.8 (AAAGATCTCTCCCGATGCGGGAAGGC) (SEQ ID NO:10) 和 111-44.9 (GGGGATCCAATGGAAGGGGATGTCCGCGGAA) (SEQ ID NO:11).

从菌株 TA 中 PCR 扩增推定的 TA 启动子和 taA，taA 编码推定的转录抗终止子。该大约 1.1 kb 片段用 BamHI 和 BglII 切割，并连入用 BamHI 切割的 pNEB193。该质粒命名为 pKOS111-56.1。质粒 pKOS111-56.1 用 EcoRI 和 HindIII 切割，并用克列诺补平。该~1.1 kb 条带克隆入用 PacI 切割、并用克列诺补平的 pKOS90-102 和 pKOS90-106(PacI 在 pKOS90-102 和 pKOS90-106 中只切割 1 次）。筛选具有正确插入方向的质粒。TA 启动子/90-102 质粒命名为 pKOS90-115 (13.9kb)，TA 启动子/pKOS90-106 质粒命名为 pKOS90-111 (13.8kb)。

这些质粒电穿孔入含有埃坡霉素 PKS 基因的粘球菌宿主细胞，同时挑选卡那霉素抗性重组子以鉴定单一交换重组子。对这些重组子挑选半乳糖抗性，以鉴定双交换重组子，这些重组子通过 Southern 分析和 PCR 进行筛选，从而鉴定那些含有目标重组事件的重组子。将目标重组子进行培养，并检测埃坡霉素的产生。

III、pilA 启动子

质粒 pKOS35-71B 用 EcoRI 切割，并用克列诺补平。将 800 bp 片段克隆入用 PacI 切割、并用克列诺补平的 pKOS90-102 和 pKOS90-106。筛选具有正确插入方向的质粒。pilA 启动子/pKOS90-102 质粒命名为 pKOS90-120 (13.6 kb)，pilA 启动子/pKOS90-106 命名为 pKOS90-121 (13.5 kb)。

这些质粒电穿孔入含有埃坡霉素 PKS 基因的粘球菌宿主细胞，同时挑选卡那霉素抗性重组子以鉴定单一交换重组子。对这些重组子挑选半乳糖抗性，以鉴定双交换重组子，这些重组子通过 Southern 分析和 PCR 进行筛选，从而鉴定那些含有目标重组事件的重组子。将目标重组子进行培养，并检测埃坡霉素的产生。

IV、kan 启动子

质粒 pBJ180-2 用 BamHI/Bgl II 切割，并用克列诺补平。将 350 bp 片段克隆入用 PacI 切割、并用克列诺补平的 pKOS90-102 和 pKOS90-106。筛选具有正确插入方向的质粒。kan 启动子/pKOS90-102 质粒命名为 pKOS90-126 (13. 15 kb)， kan 启动子 pKOS/90-106 质粒命名为 pKOS90-122 (13. 05 kb)。

这些质粒电穿孔导入含有埃坡霉素 PKS 基因的粘球菌宿主细胞，同时挑选卡那霉素抗性重组子以鉴定单一交换具有重组子。对这些重组子挑选半乳糖抗性，以鉴定双交换重组子，这些重组子通过 Southern 分析和 PCR 进行筛选，从而鉴定那些含有目标重组事件的重组子。将目标重组子进行培养，并检测埃坡霉素的产生。

V、So ce90 启动子

用引物 111-44. 6 和 111-44. 7（如下所示），从 So ce90 染色体 DNA 扩增 So ce90 启动子。该~900 bp 条带用 Pacl 切割，并克隆入用 PacI 切割的 pNEB193，以产生 pKOS90-125。质粒 pKOS90-125 用 PacI 切割。将 924 bp 条带克隆入用 PacI 切割的 pKOS90-102 和 pKOS90-106。筛选具有正确插入方向的质粒。Soce90 启动子/pKOS90-102 质粒命名为 pKOS90-127 (13. 6 kb)，Soce90 启动子/pKOS90-106 质粒命名为 pKOS90-128 (13. 7 kb)。

这些质粒电穿孔入含有埃坡霉素 PKS 基因的粘球菌宿主细胞，同时挑选卡那霉素抗性重组子以鉴定单一交换重组子。对这些重组子挑选半乳糖抗性，以鉴定双交换重组子，这些重组子通过 Southern 分析和 PCR 进行筛选，从而鉴定那些含有目标重组事件的重组子。将目标重组子进行培养，并检测埃坡霉素的产生。

111-44.6 5′ GG TTAATTAA CATCGCGCTATCAGCAGCGCTGAG 3′ (SEQ ID NO:12)
接头 PacI 引物

111-44.7 5′ GG TTAATTAA TCCTCAGCGGCTGACCCGCTCGCG 3′ (SEQ ID NO:13)
接头 PacI 引物

实施例 9

KS2 敲除菌株的构建

本实施例描述了以下埃坡霉素 PKS 衍生物的构建，其中通过突变将活性位点半胱氨酸密码子改变为丙氨酸密码子，使延伸组件 2 的 KS 结构域失活。对所得的衍生物 PKS 提供合成的前体（如下面的实施例所述），以制备本发明的埃坡霉素衍生物。

用下列引物: 90-103 (5′-AAAAAATGCATCTACCTCGCTCGTGGCGGTT-3′) (SEQ ID NO:14) 和 90-107.1 (5′-CCCCC TCTAGA ATAGGTCGGCAGCGGTACCCG-3′) (SEQ ID NO:15)

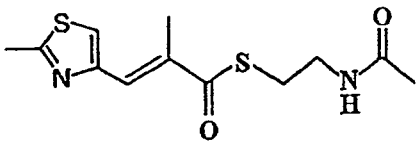
从质粒 pKOS35 -78.2 中扩增埃坡霉素 PKS 基因的下游侧翼区。~2 kb 的 PCR 产物用 NsiI/XbaI 切割，并与用 NsiI 和 SpeI 消化的 pSL1190 连接，以产生 pKOS90-123 (~5. 4 kb)。用下列引物:

90-105 (5′-TTTTTATGCATGCGGCAGTTTGAACGG-AGATGCT-3′) (SEQ ID NO:16) 和 90-106 (5′-CCCCCGAATTCTCCCGGAAGGCACACGGAGAC-3′) (SEQ ID NO:17)

从 pKOS35-78. 2 DNA 扩增~2 kb 的 PCR 片段，将该片段用 NsiI 切割，并与用 NsiI/EcoRV 消化的 pKOS90-123 连接，以产生 pKOS90-130 (~7. 5 kb)。当该质粒用 NsiI 切割、DNA 末端用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段补平，并重新连接时，产生了质粒 pKOS90-131。为将 galK/kan^r 盒克隆入该质粒，用 BamHI/NdeI 切割质粒 KG-2，并用 DNA 聚合酶的克列诺片段补平。将 3 kb 的片段克隆入 pKOS90-131 的 DraI 位点（DraI 在该载体中切

割 3 次），构建质粒 pKOS90-132 (10. 5 kb)。为产生从半胱氨酸到丙氨酸的预期改变，使用 NsiI 位点以实现 KS2 敲除。当 pKOS90-130 用 NsiI 切割、用 DNA 聚合酶 I 的克列诺片段补平，并重新连接时，丙氨酸密码子替换了半胱氨酸密码子。根据上面所述产生目标菌株的方法，将得到的质粒导入本发明的黄色粘球菌菌株，以产生目标菌株。

通过本方法（使用埃坡霉素 A、B、C 和 D 生产株 K111-32.25），构建黄色粘球菌菌株 K90-132.1.1.2，并根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2715 下可得到。为表明当提供适当的二酮起始单位时，由菌株生产的所得到的 PKS 可合成埃坡霉素类，使菌株 K90-132. 1. 1. 2 在 50 毫升 CTS 加 20%XAD 中于 30℃生长 3 天，然后提供 200 毫克/毫升如下所示的噻唑二酮:



菌株再培养另一个 5 天，收集 XAD，并用 10%甲醇提取埃坡霉素类。将提取物干燥，重悬于 0.2 毫升乙腈，并用 LC/MS 分析 0.05 毫升样品，结果如预期一样，显示存在埃坡霉素类 B 和 D。如下列实施例所讨论的一样，本系统可用于生产多种埃坡霉素类似物。

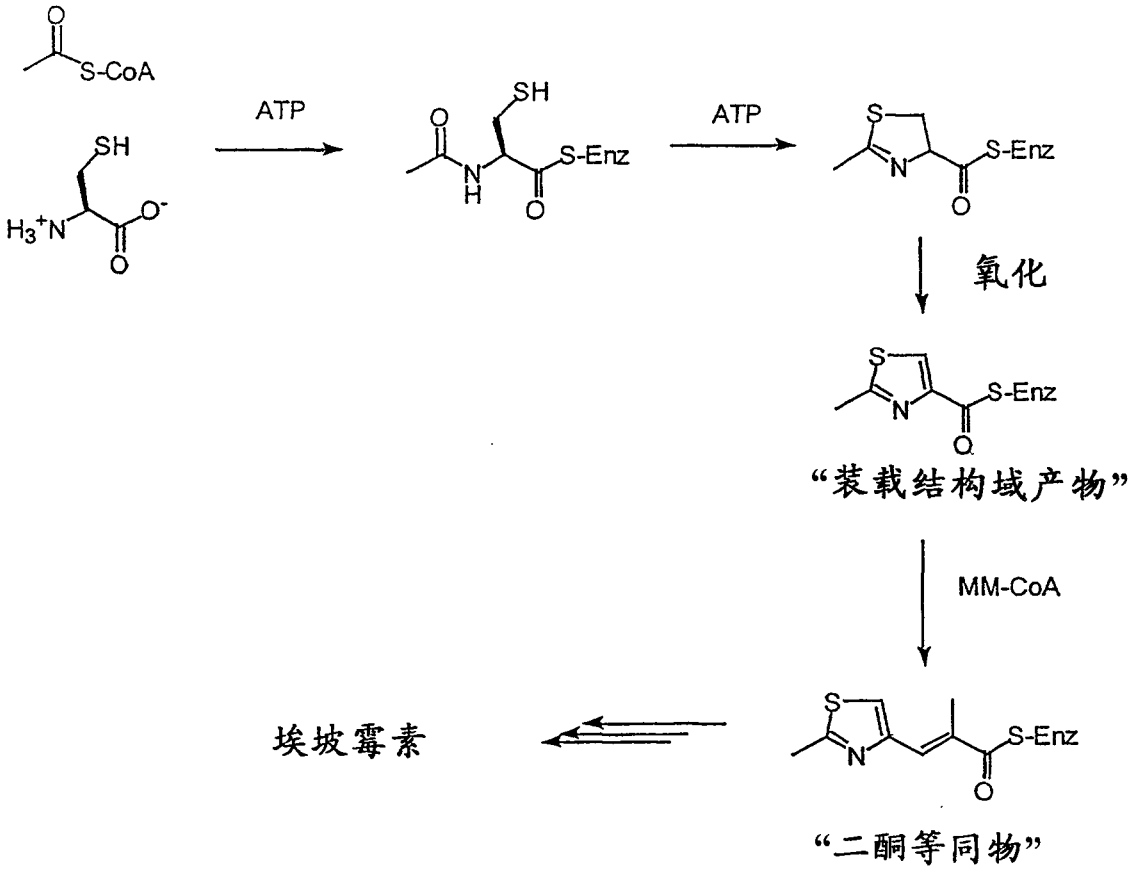
实施例 10

来自化学生物合成的修饰埃坡霉素

本实施例描述了用于通过化学生物合成产生埃坡霉素衍生物的一系列硫酯。来自纤维堆囊菌的埃坡霉素生物合成基因簇的 DNA 序列显示，PKS 的起动涉及到聚酮化合物和氨基酸组分的混合物。起动涉及用丙二酸单酰 CoA 装载装载组件的 PKS 样部分，接着是脱羧作用和用半胱氨酸装载延伸组件的 NRPS，然后进行缩合作用形成酶结合的 N-乙酰半胱氨酸。环化

作用形成二氢噻唑之后是氧化作用，以形成酶结合的 2-甲基噻唑-4-羧酸酯，它是装载组件和 NRPS 的产物。随后通过组件 2 的酮合酶与甲基丙二酸单酰 CoA 的缩合作用提供二酮的等同物，如图解 6 所示。

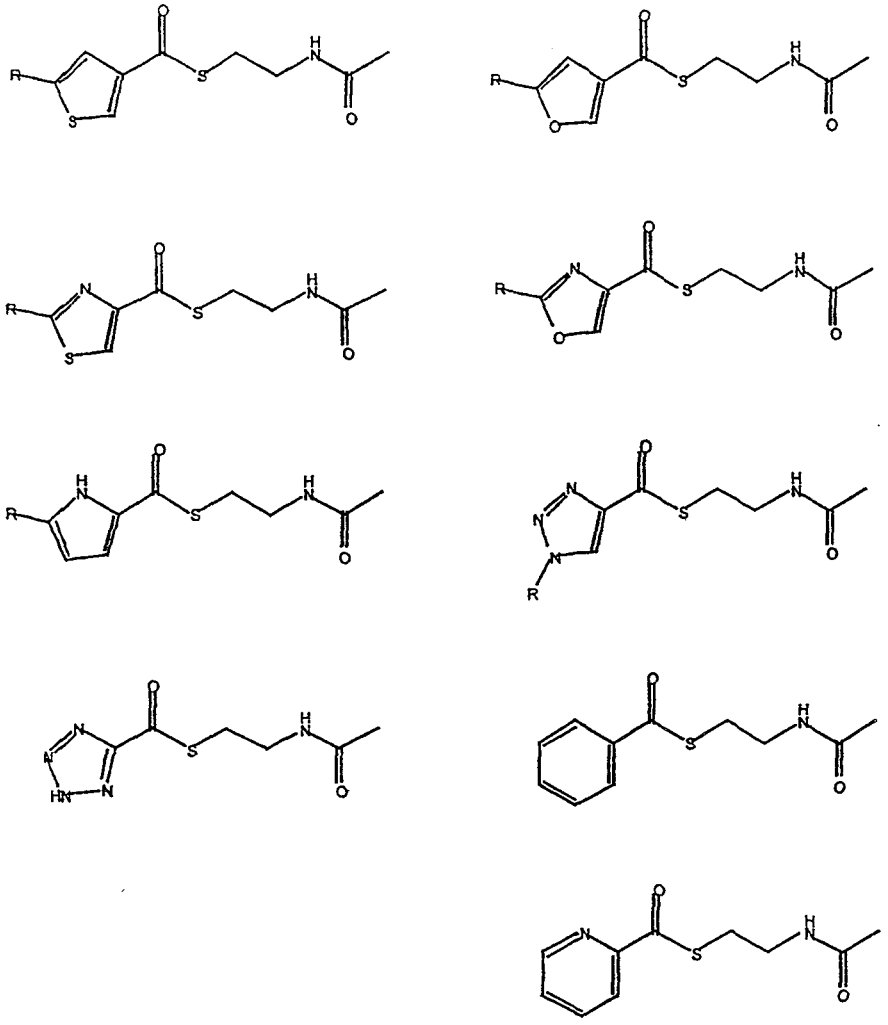
图解 6



本发明以一种类似于 PCT 公开号 99/03986 和 97/02358 中描述的制备 6-dEB 和红霉素类似物的方式提供了用于化学生物合成产生埃坡霉素衍生物的方法和试剂。提供了 2 类供给底物：NRPS 产物的类似物和二酮等同物的类似物。NRPS 产物类似物和带突变 NRPS 样结构域的 PKS 酶一起使用，且二酮等同物和在组件 2 内带突变 KS 结构域（如实施例 9 中所述）的 PKS 酶一起使用。在下面方案 7 和 8 的结构中，R、R^1 和 R^2 可独立地选自甲基、乙基、低碳烷基(C_1-C_6)和取代的低碳烷基。

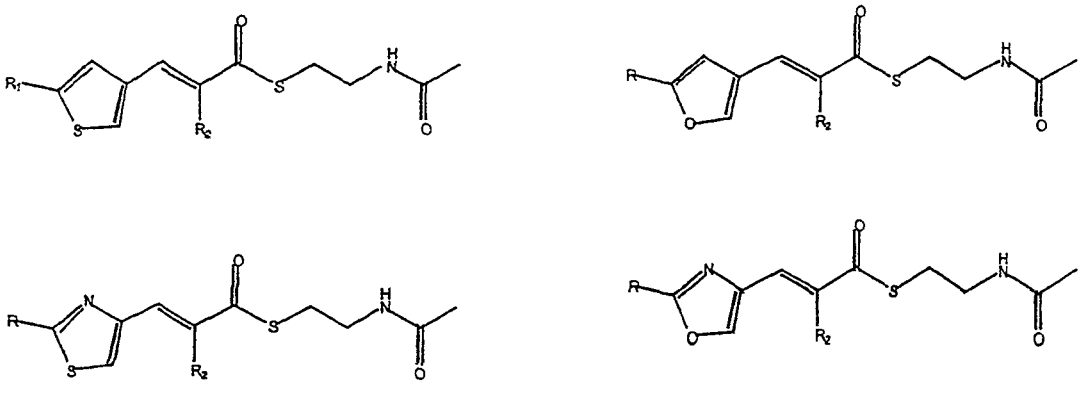
图解 7 显示的是装载组件类似物的例子。

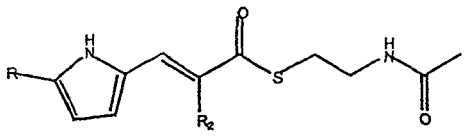
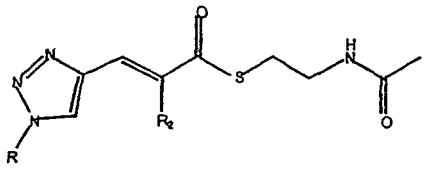
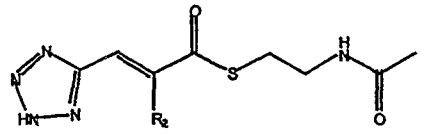
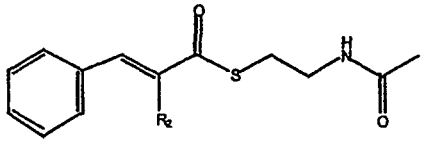
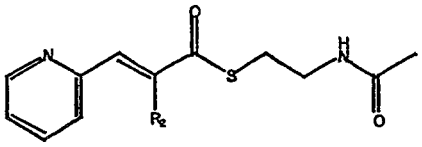
图解 7



通过活化相应的羧酸，并用 N-乙酰半胱胺处理来制备装载组件类似物。活化方法包括形成酰基氯、混合酸酐，或与缩合试剂如碳化二亚胺反应。

图解 8 显示的是二酮等同物的例子：



二酮等同物用三步法制备。首先，将相应的醛用维悌希试剂或等同物处理，形成取代的丙烯酸酯。将该酯皂化成酸，然后活化，并用 N-乙酰半胱胺处理。

接着是制备装载组件产物类似物和二酮等同物的反应图解的示例。其它适合制备二酮等同物的化合物如图 1 所示的羧酸（或者可转换成羧酸的醛），它们可转化成 N-乙酰半胱胺，用于提供本发明的宿主细胞。

A、噻吩-3-羧酸-N-乙酰半胱胺-硫酯

噻吩-3-羧酸（128 毫克）在 2 毫升无水四氢呋喃中的溶液在惰性环境下，用三乙胺（0.25 毫升）和二苯基磷酰基氮化物 (0.50 毫升)处理。1 小时后，加入 N-乙酰半胱胺（0.25 毫升），并让反应进行 12 小时。将混合物倒入水中，并用等体积乙酸乙酯提取 3 次。合并有机提取物，接下来用水、1 N HCl、饱和 $CuSO_4$ 和盐水洗涤，然后在 $MgSO_4$ 上干燥、过滤，并于真空浓缩。用乙醚，接着用乙酸乙酯在 SiO_2 上层析，可提供在静止状态下可结晶的纯产物。

B 、呋喃-3-羧酸-N-乙酰半胱胺-硫酯

呋喃-3-羧酸（112 毫克）在 2 毫升无水四氢呋喃中的溶液在惰性环境下，用三乙胺（0.25 毫升）和二苯基磷酰基氮化物(0.50 毫升)处理。1 小时后，加入 N-乙酰半胱胺（0.25 毫升）并让反应进行 12 小时。将混合物倒入水中，并用等体积乙酸乙酯提取 3 次。合并有机提取物，接下来用水、1 N HCl、饱和 $CuSO_4$ 和盐水洗涤，然后在 $MgSO_4$ 上干燥、过滤，并在真空中浓缩。用乙醚，接着用乙酸乙酯在 SiO_2 上层析，可提供在静止状态下可结晶的纯产物。

C、吡咯-2-羧酸-N-乙酰半胱胺-硫酯

吡咯-2-羧酸（112 毫克）在 2 毫升无水四氢呋喃中的溶液在惰性环境下，用三乙胺（0.25 毫升）和二苯基磷酰基氮化物(0.50 毫升)处理。1 小时后，加入 N-乙酰半胱胺（0.25 毫升）并让反应进行 12 小时。将混合物倒入水中，并用等体积乙酸乙酯提取 3 次。合并有机提取物，接下来用水、1 N HCl、饱和 $CuSO_4$ 和盐水洗涤，然后在 $MgSO_4$ 上干燥、过滤，并在真空中浓缩。用乙醚，接着用乙酸乙酯在 SiO_2 上层析，可提供在静止状态下可结晶的纯产物。

D、2-甲基-3- (3-噻吩基) 丙烯酸-N-乙酰半胱胺-硫酯

（1）乙基-2-甲基-3- (3-噻吩基) 丙烯酸酯：噻吩-3-羧醛（1.12 克）和(乙氧甲酰基亚乙基)三苯基膦（4.3 克）在无水四氢呋喃（20 毫升）中的混合物加热回流 16 小时。将混合物冷至周围环境温度，并在真空下浓缩至干。将固体残留物悬于 1:1 的乙醚/己烷中，并过滤除去三苯基膦氧化物。滤出物用 1:1 的乙醚/己烷，使滤出物通过 SiO_2 填料过滤，以提供浅黄色油形式的产物（1.78 克，91%）。

（2）2-甲基-3-(3-噻吩基) 丙烯酸：来自(1)的酯溶于甲醇（5 毫升）和 8 N KOH (5 毫升)的混合物中，并加热回流 30 分钟。将混合物冷至周围环境温度，用水稀释，并用乙醚洗 2 次。水相用 1N HCl 酸化，然后用等体

积乙醚提取3次。合并有机提取物，用$MgSO_4$干燥，过滤，并在真空下浓缩至干。从2:1己烷/乙醚中结晶可提供无色针状形式的产物。

（3）2-甲基-3-(3-噻吩基) 丙烯酸N-乙酰半胱胺硫酯：2-甲基-3-(3-噻吩基) 丙烯酸（168毫克）在2毫升无水四氢呋喃中的溶液，在惰性环境下用三乙胺（0.56毫升）和二苯基磷酰基氮化物(0.45毫升)处理。15分钟后，加入N-乙酰半胱胺（0.15毫升），并让反应进行4小时。将混合物倒入水中，并用等体积乙酸乙酯提取3次。合并有机抽体物，接下来用水、1 N HC1、饱和$CuSO_4$和盐水洗涤，然后用$MgSO_4$干燥，过滤，并在真空下浓缩。用乙酸乙酯在SiO_2上层析，可提供在静止状态下可结晶的纯产物。

将上述化合物提供给含有本发明的重组埃坡霉素PKS的宿主细胞培养物，以制备相应的本发明的埃坡霉素衍生物，其中所述本发明的重组埃坡霉素PKS中的延伸组件2的NRPS或KS结构域已通过突变而失活。

实施例11

埃坡霉素类似物的的生产

A、13-酮-埃坡霉素类似物的产生

失活埃坡霉素PKS中延伸组件4的KR结构域，导致产生了用于产生13-酮-埃坡霉素的本发明的杂合PKS。通过用多种如下所述的缺失变体替换野生型基因来改变延伸组件4的KR结构域。首先，用质粒pKOS39-118B（来自粘粒pKOS35-70.4 epoD基因的亚克隆）作为模板，扩增片段。形成该缺失左侧的寡核苷酸引物是TL3和TL4，如下所示：

TL3: 5′-ATG*AATTC*ATGATGGCCCGAGCAGCG (SEQ ID NO:18); 和

TL4: 5′-ATC*TGCAG*CCAGTACCGCTGCCGCTGCCA (SEQ ID NO:19).

形成该缺失右侧的寡核苷酸引物是TL5和TL6，如下所示：

TL5: 5′-GC*TCTAGA*ACCCGGAACTGGCGTGGCCTGT (SEQ ID NO:20); 和

TL6: 5-GC*AGATCT*ACCGCGTGAGGACACGGCCTT (SEQ ID NO:21).

将 PCR 片段克隆入载体 Litmus 39，并测序以证实已获得目标片段。然后，用限制性酶 PstI 和 BamHI 消化含有 TL3/TL4 片段的克隆，并分离~4.6kb 片段。将用引物 TL5/TL6 获得的 2.0kb PCR 片段用限制酶 BglII 和 XbaI 处理，然后连入（i）短 KR 接头 TL23 和 TL24（它们一起退火，形成带有单链突出的双链接头），产生 pKOS122-29；或（ii）用引物 TL33+TL34 通过 PCR 获得、然后用限制酶 NsiI 和 SpeI 处理的长(epoDH3*)接头，产生质粒 pKOS122-30。这些寡核苷酸接头和引物的序列如下所示：

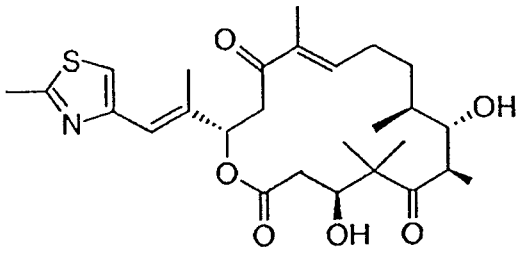
TL23: 5′-GGCGCCGGCCAAGAGCGCCGCGCCGGTCGGCGGGCCAGCCGGGGACGGGT (SEQ ID NO:22);

TL24: 5′-CTAGACCCGTCCCCGGCTGGCCCGCCGACCGGCGCGGCGCTCTTGGCCG-GCGCCTGCA (SEQ ID NO:23);

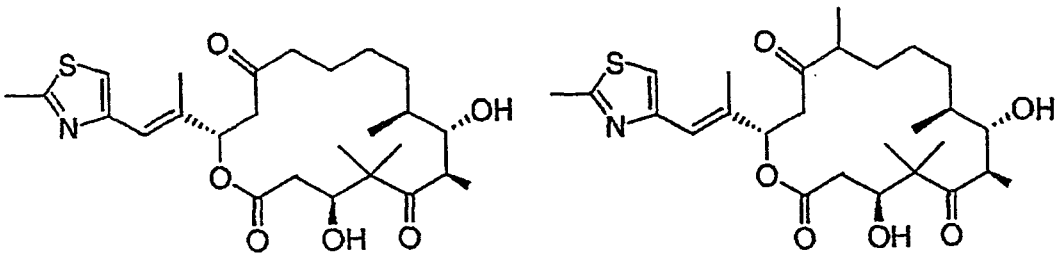
TL33: 5′-GG*ATGCATGCGCCGGCCGAAGGGCTCGGA* (SEQ ID NO:24); 和

TL34: 5′-TC*ACTAGT*CAGCGACACCGGCGCTGCGTTT (SEQ ID NO:25).

通过测序确认含有预期置换的质粒，然后用限制酶 DraI 消化。然后，将每个克隆的大片段与卡那霉素抗性和 galK 基因（KG 或 kan-gal）盒连接，以提供递送质粒。通过电穿孔将递送质粒转化入埃坡霉素 B 生产菌株黄色粘球菌 K111-32. 25。筛选转化子，并挑选卡那霉素抗性、半乳糖抗性存活株，以鉴定除去 KG 基因的克隆。通过 PCR 证明重组菌株中已除去 KG，并且已替换预期基因。重组菌株在装有 50 毫升 CTS 培养基和 2% XAD-16 的瓶中发酵 5 天，埃坡霉素类似物用 10 毫升甲醇从 XAD 上洗脱。根据 LC/MS 谱和 NMR 测定其结构。命名为 K122-56 的菌株根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2714 下可得到。K122-56 菌株（来自质粒 pKOS122-29）产生的产物以 13-酮-11, 12-脱氢-埃坡霉素 D 为主，其结构如下所示。



K122-56 菌株也产生作为次要产物的 13-酮-埃坡霉素 C 和 D，它们各自的结构如下。



从来源于质粒 pKOS122-30 的菌株 K122-30 得到类似的结果。这些化合物、菌株和产生它们的 PKS 酶是本发明的新化合物、新菌株和新 PKS 酶。

可生产 13-酮-11, 12 脱氢埃坡霉素类的其它本发明的菌株，包括那些通过一个或多个点突变而使 KR 结构域失活的菌株。例如，将 KR 结构域的组成型酪氨酸残基突变成苯丙氨酸，使 KR 活性下降大约 10%，并导致某些 13-酮-埃坡霉素的产生。KR 结构域的其它突变可使 KR 活性下降更多，或者消除所有的 KR 活性，但也使埃坡霉素产量下降。

B、13-羟基-埃坡霉素类似物的产生

用异源 KR 结构域，如雷帕霉素 PKS 的延伸组件 2 或 FK520 PKS 的延伸组件 3 的 KR 结构域，替换埃坡霉素 PKS 的延伸组件 5 的 KR、DH 和 ER 区，将导致用于产生 13-羟基-埃坡霉素的杂合 PKS 的形成。按与本实施例的 A 部分所述类似的方法完成构建。用质粒 pKOS39-118B 作为模

板来扩增 epoD 基因目标部分的寡核苷酸引物是:

TL7: 5′-GCGCTCGAGAGCGCGGGTATCGCT (SEQ ID NO:26);

TL8: 5′-GAGATGCATCCAATGGCGCTCACGCT (SEQ ID NO:27);

TL9: 5′-GCTCTAGAGCCGCGCGCCTTGGGGCGCT (SEQ ID NO:28); 和

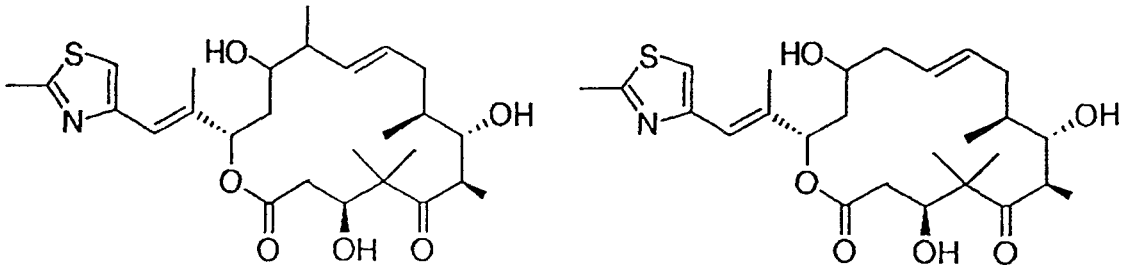
TL10: 5-GCAGATCTTGGGGCGCTGCCTGTGGAA (SEQ ID NO:29).

将由引物 TL7/TL8 产生的 PCR 片段克隆入载体 LITMUS 28，得到的克隆用限制酶 NsiI 和 BglII 消化，分离 5.1kb 片段，与用 TL9/TL10 产生的、用限制酶 BglII 和 XbaI 处理、并连接到 KR 盒的 2.2kb 片段连接。用引物 TL31 和 TL32，通过 PCR 制备 FK520 PKS 的 KR 盒，然后用限制酶 XbaI 和 PstI 消化。这些引物如下所示:

TL31: 5′-GGCTGCAGACCCAGACCGCGGGCGACGC (SEQ ID NO:30); 和

TL32: 5′-GCTCTAGAGGTGGCGCCGGCCGCCCGGCG (SEQ ID NO:31).

除了黄色粘球菌 KIII-72. 4. 4 用作受体菌外，菌株构建的其余部分类似于本实施例的 A 部分所述进行。用 FK520 PKS 延伸组件 3 的 KR 结构域替换埃坡霉素 PKS 延伸组件 5 的 KR、DH 和 ER 结构域的菌株命名为 K122-148，其根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)，10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2711 下可得到。菌株 K122-148 产生的主要产物为 13-羟基-10, 11-脱氢-埃坡霉素 D，C 衍生物为次要产物，其结构如下所示。



命名为 K122-52 的类似菌株产生同样的化合物，在该菌株内，用雷帕

霉素 PKS 延伸组件 2 的 KR 结构域作为替换物。这些化合物、菌株和产生它们的 PKS 酶是本发明中的新化合物、新菌株和新 PKS 酶。

C、9-酮-埃坡霉素类似物的产生

失活埃坡霉素 PKS 延伸组件 6 的 KR 结构域，导致本发明的能产生 9-酮-埃坡霉素类的新 PKS 产生。KR 结构域可通过位点专一诱变改变一个或多个保守残基而失活。埃坡霉素 PKS 延伸组件 6 的 KR 结构域的 DNA 和氨基酸序列如下所示:

```
 36710      36720      36730      36740      36750
GACGGCACCTACCTCGTGACCGGCGGTCTGGGTGGGCTCGGTCTGA
 D  G  T  Y  L  V  T  G  G  L  G  G  L  G  L>
     36760      36770      36780      36790      36800
GCGTGGCTGGATGGCTGGCCGAGCAGGGGGCTGGGCATCTGGTGCTGGTG
S  V  A  G  W  L  A  E  Q  G  A  G  H  L  V  L  V>
     36810      36820      36830      36840      36850
GGCCGCTCCGGTGCGGTGAGCGCGGAGCAGCAGACGGCTGTCGCCGCGCT
 G  R  S  G  A  V  S  A  E  Q  Q  T  A  V  A  A  L>
     36860      36870      36880      36890      36900
CGAGGCGCACGGCGCGCGTGTCACGGTAGCGAGGGCAGACGTCGCCGATC
  E  A  H  G  A  R  V  T  V  A  R  A  D  V  A  D>
     36910      36920      36930      36940      36950
GGGCGCAGATCGAGCGGATCCTCCGCGAGGTTACCGCGTCGGGGATGCCG
R  A  Q  I  E  R  I  L  R  E  V  T  A  S  G  M  P>
     36960      36970      36980      36990      37000
CTCCGCGGCGTCGTTCATGCGGCCGGTATCCTGGACGACGGGCTGCTGAT
 L  R  G  V  V  H  A  A  G  I  L  D  D  G  L  L  M>
     37010      37020      37030      37040      37050
GCAGCAAACCCCCGCGCGGTTCCGCGCGGTCATGGCGCCCAAGGTCCGAG
  Q  Q  T  P  A  R  F  R  A  V  M  A  P  K  V  R>
         37060      37070      37080      37090      37100
   GGGCCTTGCACCTGCATGCGTTGACACGCGAAGCGCCGCTCTCCTTCTTC
   G  A  L  H  L  H  A  L  T  R  E  A  P  L  S  F  F>
         37110      37120      37130      37140      37150
   GTGCTGTACGCTTCGGGAGCAGGGCTCTTGGGCTCGCCGGGCCAGGGCAA
    V  L  Y  A  S  G  A  G  L  L  G  S  P  G  Q  G  N>
         37160      37170      37180      37190      37200
```

CTACGCCGCGGCCAACACGTTCCTCGACGCTCTGGCACACCACCGGAGGG

Y A A A N T F L D A L A H H R R>

37210 37220 37230 37240 37250

CGCAGGGGCTGCCAGCATTGAGCATCGACTGGGGCCTGTTCGCGGACGTG

A Q G L P A L S I D W G L F A D V>

GGTTTG (SEQ ID NO:32)

G L> (SEQ ID NO:33)

本发明提供的新 9-酮-埃坡霉素 PKS 延伸组件 6 的突变和失活 KR 结构域的 DNA 和氨基酸序列如下所示:

36710 36720 36730 36740 36750

GACGGCACCTACCTCGTGACCGGCGCTCTGGGTGGGCTCGGTCTGA

D G T Y L V T G A L G G L G L>

36760 36770 36780 36790 36800

GCGTGGCTGGATGGCTGGCCGAGCAGGGGGCTGGGCATCTGGTGCTGGTG

S V A G W L A E Q G A G H L V L V>

36810 36820 36830 36840 36850

GGCCGCTCCGGTGCGGTGAGCGCGGAGCAGCAGACGGCTGTCGCCGCGCT

G R S G A V S A E Q Q T A V A A L>

36860 36870 36880 36890 36900

CGAGGCGCACGGCGCGCGTGTCACGGTAGCGAGGGCAGACGTCGCCGATC

E A H G A R V T V A R A D V A D>

36910 36920 36930 36940 36950

GGGCGCAGATCGAGCGGATCCTCCGCGAGGTTACCGCGTCGGGGATGCCG

R A Q I E R I L R E V T A S G M P>

36960 36970 36980 36990 37000

CTCCGCGGCGTCGTTCATGCGGCCGGTATCCTGGACGACGGGCTGCTGAT

L R G V V H A A G I L D D G L L M>

37010 37020 37030 37040 37050

GCAGCAAACCCCCGCGCGGTTCCGCGCGGTCATGGCGCCCAAGGTCCGAG

Q Q T P A R F R A V M A P K V R>

37060 37070 37080 37090 37100

GGGCCTTGCACCTGCATGCGTTGACACGCGAAGCGCCGCTCTCCTTCTTC

G A L H L H A L T R E A P L S F F>

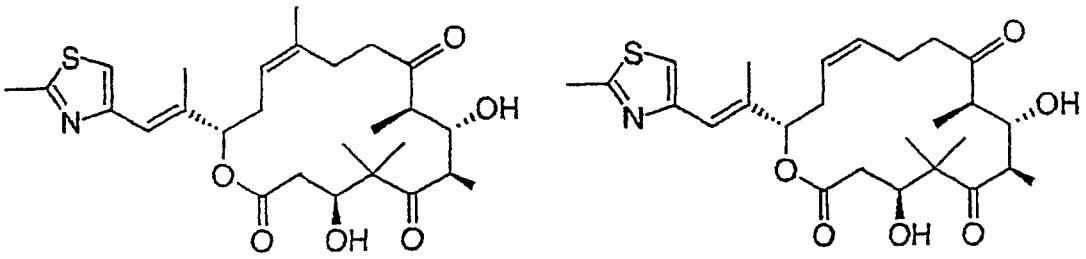
37110 37120 37130 37140 37150

GTGCTGTACGCTTCGGGAGCAGGGCTCTTGGGCTCGCCGGGCCAGGGCAA

V L Y A S G A G L L G S P G Q G N>

```
    37160      37170      37180      37190      37200
CTTCGCCACGGCCAACACGTTCCTCGACGCTCTGGCACACCACCGGAGGG
  F  A  T  A  N  T  F  L  D  A  L  A  H  H  R  R>
    37210      37220      37230      37240      37250
CGCAGGGGCTGCCAGCATTGAGCATCGACTGGGGCCTGTTCGCGGACGTG
A  Q  G  L  P  A  L  S  I  D  W  G  L  F  A  D  V>
GGTTTG (SEQ ID NO:34)
 G  L> (SEQ ID NO:35)
```

除了将黄色粘球菌 K111-72.4.4 作为受体菌外，包括该突变 KR 结构域编码序列的菌株一般按本实施例的 A 部分所述进行构建。延伸组件 6 的 KR 结构域已失活的菌株命名为 K39-164，并且根据布达佩斯条约于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国，且在保藏号 PTA-2716 下可得到。菌株 K39-164 产生作为主产物的 9-酮-埃坡霉素 D，C 衍生物为次要产物，其结构如下所示：



这些化合物、菌株和产生它们的 PKS 酶是本发明的新化合物、新菌株和新 PKS 酶。

D、2-甲基-埃坡霉素类似物的产生

通过将延伸组件 9 的 AT 结构域("epoAT9")编码序列用甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域的编码序列替换，构建埃坡霉素 A、B、C 和 D

的 2-甲基-埃坡霉素类似物。合适的置换体 AT 结构域编码序列可例如从编码 FK520 PKS 的延伸组件 2 (“FKAT2”；见 PCT 公开号 00/020601, 此处引用作为参考)、埃坡霉素 PKS 的延伸组件 2(“epoAT2”)和 tmbA 基因编码的 PKS 的延伸组件 3(“tmbAT3”；见美国专利号 6, 090, 601 和美国专利申请系列号 60/271, 245，申请日 2001 年 2 月 15 日，此处引用作为参考)的基因获得。置换一般按如上所述进行，产生的具体埃坡霉素仅仅取决于已转导置换体的粘球菌宿主产生何种埃坡霉素。

这样，用带有设计的 Bgl II (AGATCT) 和 NsiI (ATGCAT)限制酶交接处识别序列的 epoAT2（核苷酸 12251 至核苷酸 13287）、或 FKAT2、或 tmbAT3 编码序列替换 epoAT9 编码序列（从核苷酸 50979 至核苷酸 52026）。

以 pKOS39-125 DNA 作为模板，第 1 轮 PCR 用来产生~1.6kb 片段。将该 PCR 片段亚克隆入载体 LITMUS28 的 HindIII 和 BgIII 位点，并测序；带有目标序列的质粒命名为 P1。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TLII-1: 5′-ACAAGCTTGCGAAAAAGAACGCGTCT (SEQ ID NO:36); 和

TLII-2: 5′-CGAGATCTGCCGGGCGAGGAAGCGGCCCTG (SEQ ID NO:37).

以 pKOS39-125 DNA 作为模板，第 2 轮 PCR 用来产生~1.9kb 片段。将该 PCR 片段亚克隆入载体 LITMUS28 的 NsiI 和 SpeI 位点，并测序；带有目标序列的质粒命名为 P2。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TLII-3B: 5′-GCATGCATGCGCCGGTCGATGGTGAG (SEQ ID NO:38); 和

TLII-4: 5′-AGACTAGTCACCGGCTGGCCCACCACAAGG (SEQ ID NO:39).

然后用限制酶 Bgl II 和 SpeI 消化质粒 P1，分离 4.5kb 片段，与来自质粒 P2 的~1.9kb NsiI-SpeI 限制性片段连接，并与作为 NsiI-Bgl II 限制性片段分离的 3 个置换体 AT 片段(FKAT2, epoAT2, tmbAT3)中的 1 个连接，以获得质粒 P3. 1、P3. 2 和 P3. 3。通过 PCR 产生置换体 AT 片段，使用了下面的寡核苷酸引物:

对 FKAT2:

TLII-20: 5′-GCATGCATCCAGTAGCGGTCACGGCGGA (SEQ ID NO:40); 和

TLII-21: 5′-CGAGATCTGTGTTCGCGTTCCCCGGGCAG (SEQ ID NO:41);

对 tmbAT3 :

TLII-13: 5′-GCATGCATCCAGTAGCGCTGCCGCTGGAAT (SEQ ID NO:42); 和

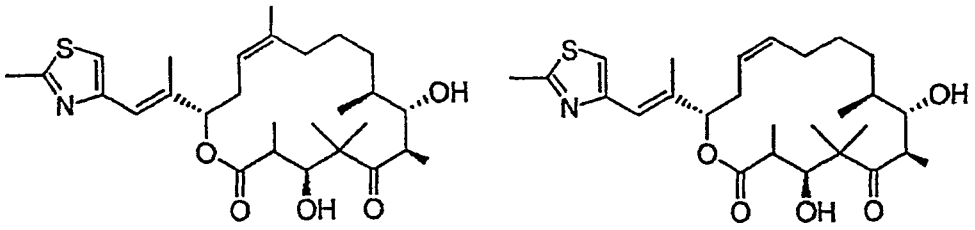
TLII-14: 5′-GCAGATCTGTGTTCGTGTTCCCCGGCCA (SEQ ID NO:43);以及

对 epoAT2 :

TLII-17: 5′-GCATGCATCCAGTACCGCTCGCGCTG (SEQ ID NO:44); 和

TLII-18: 5′-CGAGATCTGTCTTCGTCTTTCCCGGCCAG (SEQ ID NO:45).

然后通过在 kan-gal 盒的 DraI 位点的插入，对质粒 P3. 1、P3. 2 和 P3. 3 进行改变。得到的质粒转化本发明的埃坡霉素生产菌黄色粘球菌宿主细胞(即 KIII-72. 4. 4)，培养细胞，并如上所述挑选双交换重组事件的细胞。通过 PCR 筛选挑选的克隆。显示有预期重组事件的克隆在 50 毫升培养基中培养，并通过 LC/MS 筛选产生目标化合物的克隆。预期产物是 2-甲基-埃坡霉素 D 和 2-甲基-埃坡霉素 C，其结构如下所示。



E、6-去甲基-埃坡霉素类似物的产生

通过用丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域的编码序列替换延伸组件 7 AT 结构域(“epoAT7”)的编码序列，构建埃坡霉素 A、B、C 和 D 的 6-去甲基-埃坡霉素类似物。合适的置换体 AT 结构域编码序列例如可从编码 FK520 PKS 的延伸组件 3、埃坡霉素 PKS 的延伸组件 5(“epoAT5”)和 tmbA 基因编码的 PKS 的延伸组件 4 的基因获得，此处引用作为参考。置换一般按如上所述进行，产生的具体埃坡霉素仅仅取决于已转导置换体的粘球菌

宿主产生何种埃坡霉素。

这样，用带有设计的 BalII (AGATCT)和 NsiI (ATGCA7) 限制酶交接处识别序列的 epoAT5 (核苷酸 26793 至核苷酸 27833)、或 FKAT3、或 tmbAT4 编码序列替换 epoAT7 编码序列（从核苷酸 39585 至核苷酸 40626）。

以 pKOS39-125 DNA 作为模板，第 1 轮 PCR 用来产生~1.8kb 片段。将该 PCR 片段亚克隆入载体 LITMUS28 的 NsiI 和 SpeI 位点，并测序；带有目标序列的质粒命名为 P4。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TLII-5: 5′-GGATGCATGTCGAGCCTGACGCCCGCCG (SEQ ID NO:46); 和

TLII-6: 5′-GCACTAGTGATGGCGATCTCGTCATCCGCCGCCAC (SEQ ID NO:47).

以 pKOS039-118B DNA 作为模板，第 2 轮 PCR 用来产生~2.1kb 片段。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TL16: ACAGATCTCGGCGCGCTGCCGCCGGAG (SEQ ID NO:48); 和

TL15: GGTCTAGACTCGAACGGCTCGCCACCGC (SEQ ID NO:49).

将 PCR 片段亚克隆入 LITMUS 28 的 EcoRV 限制位点，通过测序鉴定带有目标序列的质粒，并命名为质粒 pKOS122-4。然后，用限制酶 Bgl II 和 SpeI 消化质粒 pKOS122-4，分离 4.8kb 片段，与来自质粒 P4 的~1.8kb NsiI-SpeI 限制片段连接，并与作为 NsiI-Bgl II 限制片段分离的 3 个置换体 AT 片段(FKAT3, epoAT5, tmbAT4)中的 1 个连接，获得质粒 P5. 1、P5. 2 和 P5. 3。通过 PCR 产生置换体 AT 片段，使用了下面的寡核苷酸引物:

对 FKAT3 :

TLII-11: 5′-GTATGCATCCAGTAGCGGACCCGCTCGA (SEQ ID NO:50); 和

TLII-12: 5′-GCAGATCTGTGTGGCTCTTCTCCGGACA (SEQ ID NO:51);

对 tmbAT4 :

TLII-15; 5′-GCATGCATCCAGTAGCGCTGCCGCTGGAAC (SEQ ID NO:52); 和

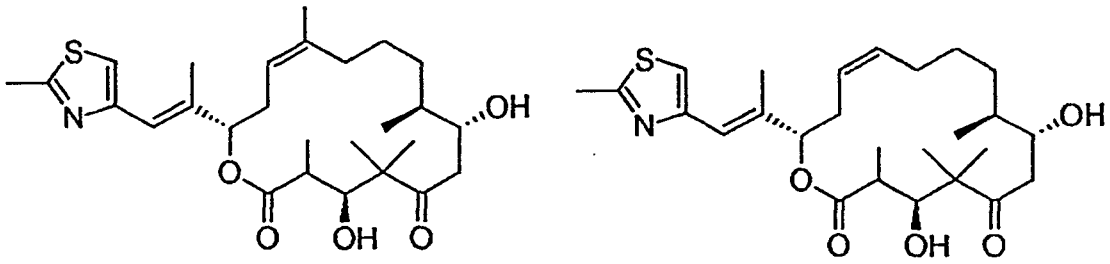
TLII-16; 5′-GGAGATCTGCGGTGCTGTTCACGGGGCA (SEQ ID NO:53); 以及

对 epoAT5 的 PCR:

TLII-19; 5′-GTAGATCTGCTTTCCTGTTCACCGGACA (SEQ ID NO:54); 和

TL8 (见本实施例的 B 部分)。

然后，通过在 kan-gal 盒 DraI 位点的插入，对质粒 P5.1、P5.2 和 P5.3 进行改变。得到的质粒转化本发明的埃坡霉素生产菌黄色粘球菌宿主细胞(即 K111-72.4.4)，培养细胞，并如上所述挑选双交换重组事件的细胞。通过 PCR 筛选挑选的克隆。显示有预期重组事件的克隆在 50 毫升培养基中培养，并通过 LC/MS 筛选产生目标化合物的克隆。预期产物是 6-去甲基-埃坡霉素 D 和 6-去甲基-埃坡霉素 C，其结构如下所示。



F、10-甲基-埃坡霉素类似物的产生

通过用甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域的编码序列替换延伸组件 5 AT 结构域(“epoAT5”)的编码序列，构建埃坡霉素类 A、B、C 和 D 的 10-甲基-埃坡霉素类似物。合适的置换体 AT 结构域编码序列可例如从编码 FK520 PKS 的延伸组件 2（此处引用作为参考）、埃坡霉素 PKS 的延伸组件 2(“epoAT2”)和 tmbA 基因编码的 PKS 的延伸组件 3 的基因获得。置换一般按如上所述进行，产生的具体埃坡霉素类仅仅取决于已转导置换体的粘球菌宿主产生何种埃坡霉素。

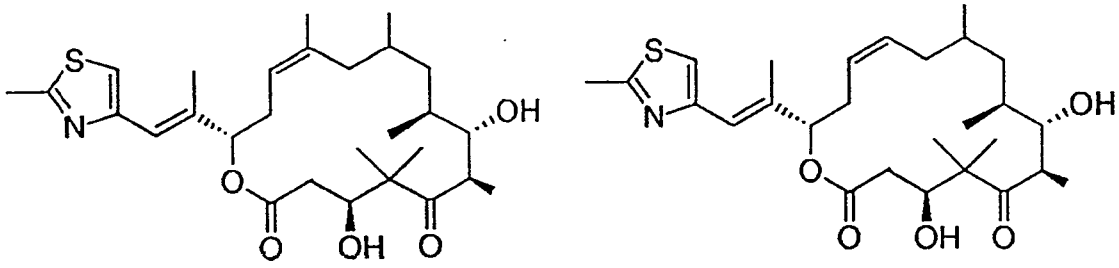
这样，用交接处带有设计的 Bgl II (AGATCT) 和 NsiI (ATGCAT)限制酶识别序列的 epoAT2 (核苷酸 12251 至核苷酸 13287)、或 FKAT2、或 tmbAT3 编码序列替换 epoAT5 编码序列（从核苷酸 26793 至核苷酸 27833）。

将用质粒 pKOS39-118B 为模板、根据引物 TL11 和 TL12 产生的 PCR 片段克隆入载体 LITMUS 28。使用的 PCR 引物是:

TL11: 5′-GGATGCATCTCACCCCGCGAAGCG (SEQ ID NO:55); 和

TL12: 5′-GTACTAGTCAAGGGCGCTGCGGAGG (SEQ ID NO:56).

通过 DNA 测序鉴定含有目标插入片段的质粒。然后用限制酶 NsiI 和 XbaI 消化质粒，并分离 4.6kb 片段。该片段与从引物 TL5 和 TL6（如本实施例的 A 部分所述）获得的、已用限制酶 BglII 和 XbaI 消化的 2.0kb PCR 片段连接，并与作为 NsiI-BglII 限制片段分离的 3 个置换 AT 片段(FKAT2, epoAT2, tmbAT3)中的 1 个连接，以获得质粒 P6.1、P6.2 和 P6.3。然后，通过在 kan-gal 盒 DraI 位点的插入，对后面的 3 个质粒进行改变。得到的质粒转化本发明的埃坡霉素生产菌黄色粘球菌宿主细胞(即 K111-72.4.4)，培养细胞，并如上所述挑选双交换重组事件的细胞。通过 PCR 筛选挑选的克隆。显示有目标重组事件的克隆在 50 毫升培养基中培养，并通过 LC/MS 筛选产生预期化合物的克隆。预期产物是 10-甲基-埃坡霉素 D 和 10-甲基-埃坡霉素 C，其结构如下所示。



G、14-甲基-埃坡霉素类似物的生产

通过用甲基丙二酸单酰 CoA 特异的 AT 结构域的编码序列替换延伸组件 3 AT 结构域(“epoAT3”)的编码序列，构建埃坡霉素类 A、B、C 和 D 的 14-甲基-埃坡霉素类似物。合适的置换体 AT 结构域编码序列可例如从编码 FK520 PKS 延伸组件 2、埃坡霉素 PKS 的延伸组件 2(“epoAT2”)和 tmbA 基因编码的 PKS 的延伸组件 3 的基因获得。置换一般按如上所述进行，产生的具体埃坡霉素仅仅取决于已转导置换体的粘球菌宿主产生何种埃坡霉素。

这样，用交接处带有设计的 Bgl II (AGATCT)和 NsiI (ATGCAT) 限

制酶识别序列的 epoAT2 (核苷酸 12251 至核苷酸 13287)、或 FKAT2、或 tmbAT3 编码序列替换 epoAT3 编码序列（从核苷酸 17817 至核苷酸 18858）。

以 pKOS39-124 DNA 作为模板，第 1 轮 PCR 用来产生~1.8kb 片段。将该 PCR 片段亚克隆入载体 LITMUS28 的 XbaI 和 BglII 位点，并测序；带有目标序列的质粒命名为 P9。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TLII-7: 5′-GCAGATCTGCCGCGCGAGGAGCTCGCGAT (SEQ ID NO:57); 和

TLII-8: 5′-CATCTAGAGCCGCTCCTGTGGAGTCAC (SEQ ID NO:58).

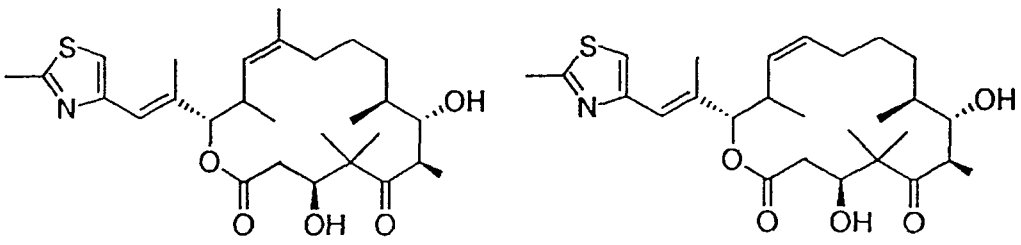
以 pKOS39-124 DNA 作为模板，第 2 轮 PCR 用来产生~1.9kb 片段。将该 PCR 片段亚克隆至载体 LITMUS28 的 NsiI 和 SpeI，并测序；带有目标序列的质粒命名为 P10。该 PCR 使用的寡核苷酸是:

TLII-9B: 5′-GGATGCATGCGCCGGCCGAAGGGCTCGGAG (SEQ ID NO:59);

和

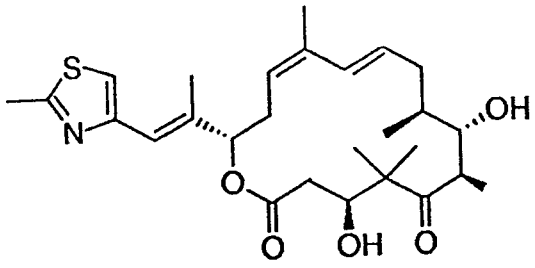
TLII-10: 5′-GCACTAGTGATGGCGATCGGGTCCTCTGTCGC (SEQ ID NO:60).

然后，质粒 P9 用限制酶 Bgl II 和 SpeI 消化，分离 4.5kb 片段，与来自质粒 P4 的~1.9kb NsiI-SpeI 限制片段，并与作为 NsiI-Bgl II 限制片段分离的 3 个置换体 AT 片段(FKAT2, epoAT2, tmbAT3)中的 1 个连接，以获得质粒 P11.1、P11.2 和 P11.3。然后，通过在 kan-gal 盒 DraI 位点的插入，对后面的 3 个质粒进行改变。得到的质粒转化本发明的埃坡霉素生产菌黄色粘球菌宿主细胞(即 K111-72. 4. 4)，培养细胞，并如上所述挑选双交换重组事件的细胞。通过 PCR 筛选挑选的克隆。显示有目标重组事件的克隆在 50 毫升培养基中培养，并通过 LC/MS 筛选产生预期化合物的克隆。预期产物是 14-甲基-埃坡霉素 D 和 14-甲基-埃坡霉素 C，其结构如下所示。



H、10,11-脱氢-埃坡霉素类似物的产生

在一个实施方案中，本发明提供了一种新埃坡霉素，即 10,11-脱氢-埃坡霉素 D，以及产生该化合物的重组宿主细胞。10,11-脱氢-埃坡霉素 D 的结构如下所示。



在另一个实施方案中，本发明提供了通过灭活产生相应埃坡霉素的埃坡霉素 PKS 延伸组件 5 的 ER 区而制备任一 10,11-脱氢-埃坡霉素类似物的方法。

在一个实施方案中，通过灭活延伸组件 5 的烯酰还原酶(ER)区，构建产生 10,11-脱氢埃坡霉素 D 的菌株。在一个实施方案中，通过将 NADPH 结合区的 2 个甘氨酸(-Gly-Gly-)改变成丙氨酸和丝氨酸(-Ala-Ser-)，实现 ER 的失活。来自质粒 pKOS39-118B（来自粘粒 pKOS35-70.4 的 epoD 基因的亚克隆）的 2.5kb BbvCI-HindIII 片段已克隆入 pLitmus28，得到的 pTL7 作为定点诱变的模板。在 NADPH 结合区引入-Gly-Gly-至-Ala-Ser-突变的寡核苷酸引物是:

TLII-22, 5′-TGATCCATGCTGCGGCCGC*TA*GCGTGGGCATGGCCGC (SEQ ID NO:61).

TLII-23, 5′-GCGGCCATGCCCACGC*TA*GCGGCCGCAGCATGGATCA (SEQ ID NO:62).

通过测序确定含有置换的 PCR 克隆，并用限制酶 DraI 消化和用虾碱性磷酸酶处理。然后，将每个克隆的大片段与卡那霉素抗性和 galK 基因(KG 或 kan-gal)盒连接，以提供递送质粒。通过电穿孔，将递送质粒转化埃坡霉素 D 生产菌黄色粘球菌 K111-72-4.4 或 K111-40-1。筛选转化子，挑选卡那霉素敏感、半乳糖抗性的存活者以鉴定除去 KG 基因的克隆。重组菌株中 KG 的除去和目的基因的置换的确认通过 PCR 进行。重组菌株

在装有 50 毫升 CTS 培养基（酪胨，5 克/升；$MgSO_4$，2 克/升；L-丙氨酸，1 毫克/升；L-丝氨酸，1 毫克/升；甘氨酸，1 毫克/升和 HEPES 缓冲液，50 mM）和 2% XAD-16 的瓶中发酵 7 天，并且用 10ml 甲醇将 10,11-脱氢-埃坡霉素 D 从 XAD 树脂上洗脱下来。

I、通过发酵生产含噁唑的埃坡霉素类

在一个实施方案中，通过在补加 L-丝氨酸的培养基中发酵产生埃坡霉素的菌株，如本发明提供的纤维堆囊菌菌株或 粘球菌菌株，本发明提供了获得含噁唑的埃坡霉素类（相应埃坡霉素的噻唑部分用噁唑取代）的方法。

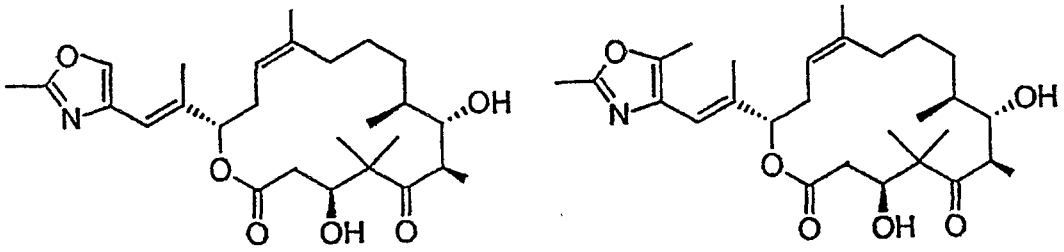
为说明本发明的该方面，除 L-丝氨酸以分批培养基中基本丝氨酸浓度(2.3 mM)的 11、51 x、101 x 和 201 x 出现外，黄色粘球菌菌株 Klll-40.1 或 K111-72.4.4 的培养根据实施例 3 的方法发酵。这样，含 50 毫升培养物的分批培养基含有：20 克/升 XAD-16；5 克/升酪胨；2 克/升 $MgSO_4$；7 毫升/升油酸甲酯和 4 毫升/升痕量金属溶液，并加入适当浓度过滤除菌的 1.25M L-丝氨酸溶液。在基本培养基中观察到的分批滴度是：Epo C：0.4 毫克/升，Epo D：2 毫克/升，Epo H1 (C 的噁唑类似物)：未检测到，以及 Epo H2 (D 的噁唑类似物)：0.02 毫克/升。增加丝氨酸浓度会降低 epoC 和 epoD 的浓度（在 51X 补加时几乎达到检测不到的水平）。这样，培养基中补加 51X L-丝氨酸的基本滴度是：Epo C：0.03 毫克/升，Epo D：0.05 毫克/升，Epo H1：0.12 毫克/升和 Epo H2：0.13 毫克/升。补料分批法可使观察到的滴度增加大约 10 倍。

J、埃坡霉素类似物的构建

在一个实施方案中，本发明提供了由本发明的重组埃坡霉素 PKS 酶产生的埃坡霉素和埃坡霉素衍生物，其中（i）延伸组件 1 NRPS 的特异性已由半胱氨酸改变成另一个氨基酸；(ii)装载结构域已改变成 NRPS 或 CoA 连接酶）；或（iii）(i)和(ii)都有。本实施例描述了怎样构建本发明中这样的重组埃坡霉素 PKS 酶；本实施例引用的参考文献列于本实施例的末尾，

通过引用号查阅文中的参考文献，此处引用作为参考。

埃坡霉素类含有氨基酸半胱氨酸，该氨基酸已被环化和氧化形成了噻唑。其它 2 个氨基酸，丝氨酸和苏氨酸，可经过相似的环化和氧化，分别产生噁唑和甲基噁唑。例如，埃坡霉素 D 的噁唑和甲基噁唑衍生物如下所示。



为构建带有噁唑或甲基噁唑的埃坡霉素类似物，进行延伸组件 1 的 NRPS 结构域的设计。延长正在生长分子的 NRPS 结构域最少包括激活氨基酸区、腺苷酰化区、将氨基酸限制在 NRPS 的 PCP 或肽基载体蛋白质区和将氨基酸缩合至正在生长分子的羧基以形成肽键的缩合区(5、7)。发现决定氨基酸特异性的识别序列位于腺苷酰化区的内部，具体地说在 A4 和 A5 共有序列之间(4)。分析该区域显示，该蛋白质区域的主要氨基酸可预测 NRPS 利用哪个氨基酸（2、8）。将该完整的 NRPS 腺苷酰化区与另一个完整的 NRPS 腺苷酰化区进行交换的实验已进行，该实验导致具有新腺苷酰化区的氨基酸特异性的杂合 NRPS 的形成(6、9)。使用腺苷酰化区的较小区域，如 A4 和 A5 共有序列之间的区域的实验还未见报道。在一个实施方案中，通过用利用苏氨酸、来自 vibF 和 blmVII 的腺苷酰化区的 A4 和 A5 共有序列之间的区域和利用丝氨酸、来自博来霉素基因簇 blm VI 的 NRPS-4 区域替换来自 epoB 的腺苷酰化区的 A4 和 A5 共有序列之间的区域，构建本发明的杂合 PKS (3)。

最近的实验显示，如果不正确氨基酸已接合至 PCP 上，可以检测到缩合区 (1)。一旦检测到不正确氨基酸，缩合反应的效率降低。为避免这种现象，除交换腺苷酰化区外，也可带有同源缩合结构域，以便改变腺苷酰

化区的特异性和设计具有完全活性的 NRPS。

本发明也提供了产生埃坡霉素的噁唑和甲基噁唑形式的 16 去甲基衍生物的重组埃坡霉素 PKS 酶。通过将延伸组件 2 的 AT 结构域 epoC 从甲基丙二酸单酰特异改变成丙二酸单酰特异来构建这样的酶。可用于制备构建体的 AT 结构域包括，来自埃坡霉素簇的延伸组件 5 和 9 以及来自 soraphen 基因簇的延伸组件 2 和 4 的 AT 结构域。

本发明也提供了已用 NRPS 置换 EpoA 蛋白质的重组 PKS 酶。本发明也提供这些酶产生的新埃坡霉素类。通过将丙二酸酯装载至装载组件的 ACP，即 EpoA，起始埃坡霉素的生物合成。随后，该丙二酸酯通过 KS 区脱羧，然后以乙酰基转移至 NRPS 组件 EpoB。该分子已通过 EpoB 起作用后，得到的化合物是 2-甲基噻唑。

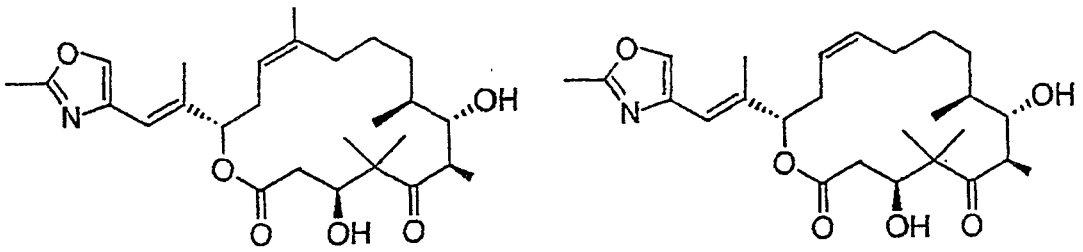
为制备氨基酸附着在噻唑 2 位上的类似物，需要对 epoA 进行缺失，并插入 NRPS 组件。可使用任何 NRPS 组件；然而，为制备最保守的变化，可用 NRPS 组件置换可天然与下游 NRPS 组件交流的 epoA。而且，因为置换 epoA 的 NRPS 是装载组件，所以不需要缩合区。这可通过获得延伸 NRPS 组件并移去缩合区，或者使用本身为装载组件且因此缺少缩合区的 NRPS 而实现。一个示例的 NRPS 装载组件来自 safB 的 NRPS 装载组件，其利用丙氨酸且来源于黄色粘球菌。

在构建 epoA 位置含有 safB 装载组件的黄色粘球菌菌株时，可确定新装载组件和 epoB 的最佳边界。PKS 蛋白质之间的接头区域对那些蛋白质之间的“交流”常常很关键。可构建 3 个不同的菌株来检验最佳接头。首先，将 EpoA 的 ACP 区融合到 safB 装载组件的腺苷酰化区。该构建需要 EpoA 的 ACP 行使 PCP 的功能。虽然 PCP 和 ACP 区在功能上类似，但是它们没有显示出高度的序列同源性，并且这样可对它们的识别和结合位点有限制。第 2 个构建体融合了 SafB 装载组件的 PCP 区的 EpoA 下游的最后几个氨基酸，这样提供用于与 EpoB“交流”的杂合装载组件的必要接头区域。最后，SafB 装载组件和 EpoB 的融合将得到构建。因为 SafB 包含 2 个组件，所以可取出 SafB 的所有装载组件，并直接将它融合至 EpoB，

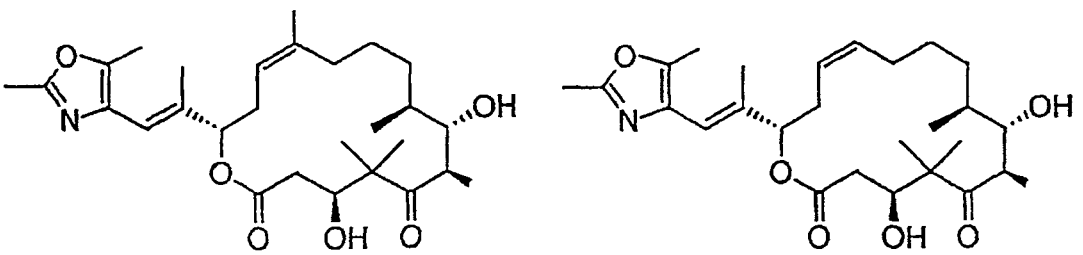
从而产生融合蛋白质，该蛋白质应优化SafB装载组件和EpoB之间的交流。

一旦使用 SafB 或任何其它装载 NRPS 区用氨基酸替换埃坡霉素噻唑上的2-甲基，则可在新装载NRPS组件中发生变化，从而便任何氨基酸可用于起始埃坡霉素类似物的合成。可用于这些交换的潜在氨基酸和它们相应的NRPS组件的综合列表由Challis等提供(2)。

可在含有埃坡霉素基因的黄色粘球菌菌株K111-32.25、或者在含有埃坡霉素类基因而其中的 epoK 基因不生产功能性产物的黄色粘球菌菌株K111-40-1，或本发明的任一其它埃坡霉素生产菌株、或在纤维堆囊菌中进行所有这些置换。在粘球菌中，使用galK和卡那霉素选择，在质粒上可产生适当的构建体，并可应用于用工程基因置换野生型基因。例如，用丝氨酸特异的NRPS置换K111-40-1中的NRPS，预期会产生埃坡霉素D的2-甲基-噁唑衍生物和埃坡霉素C的2-甲基-噁唑衍生物，它们分别为主要和次要产物。这些化合物的结构如下所示：

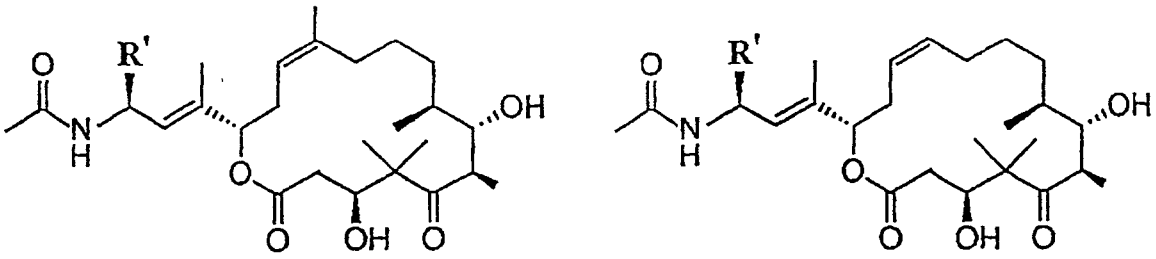


用苏氨酸特异的NRPS置换K111-40-1中的NRPS，预期会产生下面的化合物，且分别是主要和次要产物。



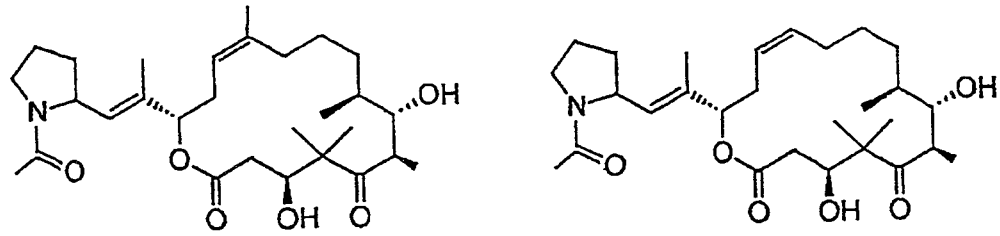
用甘氨酸、丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、异亮氨

酸、亮氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、精氨酸、缬氨酸和酪氨酸特异的 NRPS 置换 K111-40-1 中的 NRPS，每个预期产生下面的化合物，它们分别作为主要和次要产物。



其中 R'对应于氨基酸的特异侧链（例如，在氨基酸通式 NH_2-CHR'COOH 中对甘氨酸而言 R'是 H，对丙氨酸而言是甲基，等等）。

用脯氨酸特异的 NRPS 置换 Klll-40-1 的 NRPS，预期会产生下面的化合物，它们分别作为主要和次要产物。



本小节中引用的参考文献如下:

1、Belshaw 等，1999，氨酰基-CoAs 在非核糖体肽合成中作为缩合结构域选择性的探测剂，科学，284 : 486-9。

2、Challis 等，2000，预测的、基于结构的非核糖体肽合成酶腺苷酰化结构域氨基酸识别模型，化学与生物学（Chem Biol），7 : 211-24。

3、Du 等，2000，来自支持非核糖体肽合成酶和聚酮化合物合酶功能性相互作用的轮枝链霉菌(Streptomyces verticillus)ATCC15003 抗肿瘤药物博来霉素的生物合成基因簇，化学与生物学，7 : 623-42。

4、Konz 等，1999，肽合成酶怎样产生结构多样性？化学与生物学，6：R39-48。

5、Marahiel 等，1997，组件式肽合成酶参与非核糖体肽合成，化学评论（Chem. Rev），97：2651-2673。

6、Schneider 等，1998，通过合理的组件交换，靶向性改变肽合成酶的底物特异性，分子普通遗传学（Mol Gen Genet），257：308-18。

7、Stachelhaus 等，1995，通过分解多功能酶 GrsA 揭示肽合成酶的组件式结构，生物化学杂志，270：616-39。

8、Stachelhaus 等，1999，在非核糖体肽合成酶中腺苷酰化结构域的特异性赋予密码，化学与生物学，6：493-505。

9、Stachelhaus 等，1995，通过靶向性置换细菌和真菌结构域合理设计肽抗生素，科学，269：69-72。

实施例 12

生物活性

利用硫氰酸胺 B（sulforhodamine B；SRB）实验，在 4 种不同的人肿瘤细胞系中筛选 10, 11-脱氢-埃坡霉素 D 的抗癌活性。10, 11-脱氢-埃坡霉素 D 在所有 4 种细胞系中显示生长抑制效果，IC_{50S} 为 28 nM-40 nM。通过基于细胞的微管蛋白聚合分析确定作用机制，该分析揭示该化合物促进微管蛋白的聚合。从国立癌症研究所获得人癌细胞系 MCF-7（乳腺）、NCI/ADR-Res (乳腺，MDR)、SF-268 (胶质瘤)和 NCI-H460 (肺)。细胞维持在补加 10%胎牛血清（Hyclone）和 2mM L-谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基（Life Technology）中，置于 5%CO_2 和潮湿环境以及 37℃维持。

10, 11-脱氢-埃坡霉素 D 的细胞毒性通过 SRB 实验确定 (Skehan 等，国立癌症研究所杂志（J. Natl. Cancer Inst），82：1107-1112 (1990)，此处引用作为参考)。培养细胞用胰蛋白酶消化、记数，并将每 100 微升用生长培养基稀释至下面的浓度：MCF-7，5000；NCI/ADR-Res，7500；NCI-H460，5000 和 SF-268，7500。将细胞按 100 微升/孔种于 96 孔微滴

定板。24 小时后，将 100 微升 10, 11 脱氢-埃坡霉素 D（用生长培养基稀释，浓度为 1000 nM- 0. 001 nM）加至每孔中。与该化合物孵育 3 天后，细胞用 100 微升 10%三氯酸(“TCA”)于 4℃固定 1 小时，并用 0. 2% SRB/1%乙酸于室温染色 20 分钟。未结合的染料用 1%乙酸漂洗掉，然后用 200 微升 10 mM Tris 碱提取结合的 SRB。与总细胞蛋白含量相关的结合染料的量通过 OD 515 nm 确定。然后，用 Kaleida Graph 程序分析数据，并计算 $IC_{50's}$。平行测试化学合成的埃坡霉素 D 作为比较。

对于微管蛋白聚合实验，MCF-7 细胞在 35 mm 培养皿中生长至汇合，并用 1 μM 10, 11-脱氢-埃坡霉素 D 或埃坡霉素 D 于 37℃处理 0、1 或 2 小时（Giannakakou 等，生物化学杂志，271 : 17118-17125 (1997)；国际癌杂志（Int. J. Cancer），75 : 57-63 (1998)，此处引用作为参考）。用 2 毫升不含钙或镁的 PBS 洗涤细胞 2 次后，细胞用 300 微升裂解缓冲液(20 mM Tris，PH 6. 8，1 mM $MgCl_2$，2 mM EGTA，1 % Triton X-100 和蛋白酶抑制剂）于室温裂解 5-10 分钟。将细胞刮下，并将裂解物转移至 1.5 毫升微离心管。然后，在室温于 18000 g 离心裂解物 12 分钟。从含不溶的或聚合的(细胞骨架)微管蛋白的沉淀中分离含可溶或未聚合(胞液)微管蛋白的上清，并转移至新管中。然后将沉淀重悬于 300 微升裂解缓冲液。通过用 SDS-PAGE、接着使用抗微管蛋白抗体(Sigma)的免疫印迹法，分析每一样品的等体积小份，确定细胞中微管蛋白聚合的变化。

几个实验的结果显示，10, 11-脱氢-埃坡霉素 D (命名为"Epo490")针对 4 种不同人肿瘤细胞系的 IC_{50} 范围为 28 nM - 40 nM。

表 13

细胞系	EpoD (nM)	Epo490 (nM)
	N=3	N=2
MCF-7	21 ± 10	28 ± 8
NCI/ADR	40 ± 12	35 ± 9
SF-268	34 ± 8	40 ± 5
NCI-H460	30 ± 2	34 ± 1

微管蛋白聚合实验揭示，10,11-脱氢埃坡霉素 D 具有与埃坡霉素 D 同样的作用机制。在 MCF-7 细胞中，10,11-脱氢-埃坡霉素 D 在测定条件下强烈促进微管蛋白的聚合，具有与埃坡霉素 D 类似的动力学和效果。通过替换 10,11-脱氢-埃坡霉素 D 的目的化合物，可用类似方法测定本发明的其它化合物。

实施例 13

噁唑衍生物

本实施例描述了应用发酵条件调节宿主细胞产生埃坡霉素化合物的类型。通过给宿主细胞补加过量的丝氨酸，由宿主细胞正常产生的化合物以一种利于噁唑对应物产生的方式而被调节。例如，可使主要产生式 V 的一种化合物或多种化合物的细胞有利于产生相应于分子式 VI 的化合物的噁唑对应物。

在一个实施方案中，主要产生埃坡霉素 C 和 D 的黄色粘球菌菌株 K111-40-1，用于显著增加埃坡霉素 C 和 D 的噁唑对应物埃坡霉素 H_1 和 H_2 的产生。菌株 K111-40-1 (PTA-2712) 于 2000 年 11 月 21 日保藏于美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd.,马纳萨斯，VA, 20110-2209 美国。菌株 K111-40-1 在补加或不补加额外丝氨酸的培养基中生长。未补加的培养基中成分的最终浓度是：水解酪蛋白（胰消化物，购自 Difco，商标名酪胨），5 克/升；$MgSO_4$ $7H_2O$, 2 克/升；XAD-16, 20 克/升；痕量元素溶液，4 毫升/升；油酸甲酯，7 毫升/升和 Hepes 缓冲液，40 mM (用 KOH 将 pH 滴定至 7.6)。痕量元素溶液包括：浓缩 H_2SO_4，10 毫升/升；$FeCl_3$ $6H_2O$，14.6 克/升；$ZnCl_2$，2.0 克/升；$MnCl_2$ $4H_2O$，1.0 克/升；$CuCl_2$ $2H_2O$，0.42 克/升；H_3BO_3，0.31 克/升；$CaCl_2$ $6H_2O$，0.24 克/升和 Na_2MoO_4 $2H_2O$，0.24 克/升。丝氨酸的基本水平认为是 4.82% w/w，该值通过对酪胨具体批次的 Difco 氨基酸分析而确定。因此，丝氨酸的基本浓度是 2.3 mM，该值从培养基中 5 克/升酪胨的终浓度计算而来。丝氨酸补加的培养基含有 50 倍的更高丝氨酸浓度：117 mM。

细胞于匣式摇床上的瓶中，在30℃、250转/分钟生长120小时。通过捕获树脂、在水中洗涤树脂1次，并在20毫升甲醇中提取树脂中的化合物30分钟，从而提取菌株在发酵过程中产生的化合物。通过HPLC和质谱对样品进行分析。

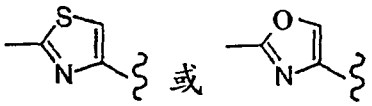
分析细胞生产的化合物显示，与在未补加丝氨酸的培养基中生长的细胞产生的产物相比，丝氨酸水平增加50倍导致埃坡霉素H_1的产量增加30倍(0.12 mg/L)，同时埃坡霉素H_2的产量增加5倍(0.12 mg/L)。值得注意的是，细胞产生的埃坡霉素C和D几乎检测不到(<50微克/升)。

由于丝氨酸的供给，含噁唑的化合物增加同时含噻唑的化合物减少，这提供了从正常情况下产生含噻唑对应物的宿主细胞中获得噁唑化合物的方法。例如，制备9-氧代-埃坡霉素D的重组构建体（如实施例11的子部分C所述）可在如上所述的类似条件下生长，以制备9-氧代-埃坡霉素D的噁唑对应物 17-去(2-甲基-4-噻唑基)-17- (2-甲基-4-噁唑基)-9-氧代-埃坡霉素D。同样，本发明的其它重组构建体，包括实施例11所描述的那些，可在过量丝氨酸中生长，以提供相应的噁唑化合物。

实施例14

从C-21甲基到C-21羟甲基的微生物转化

本实施例描述了从式I化合物的C-21甲基到C-21羟甲基的微生物转化，其中Ar是



一瓶冷冻(约2毫升)的如PCT公开号WO 00/39276中所述的Amycolata autotrophica ATCC 35203或放线菌sp.菌株PTA-XXX用来接种含有100毫升培养基的1500毫升瓶。1升去离子水中的植物培养基包含1克葡萄糖、10麦芽膏提取物、10克酵母提取物和1克蛋白胨。植物培养物在旋转振荡器上于28℃、250转／分钟孵育3天。将得到的1毫升培养物加入62个500毫升瓶中的每一瓶，这些瓶中含有与植物培养基同样组分的转化培养

基。培养物在28℃、250转/分钟孵育24小时。将本发明中的适当化合物溶于155毫升乙醇，并将溶液分送至该62瓶。然后，将瓶放回振荡器，并于28℃、250转/分钟再孵育43小时。然后，处理反应培养物，以回收起始化合物的21-羟基对应物。

实施例15

利用EpoK的环化作用

本实施例描述了式I化合物的酶环化作用，其中R^8和R^{10}一起形成碳碳双键（本发明的脱氧化合物）。epoK基因产物在大肠杆菌中表达为带有多聚组氨酸标签(his 标签)的融合蛋白质，并按PCT公开WO 00/31247所述进行纯化，此处引用作为参考。100 μL体积中反应由50 mM Tris (pH7.5)、21 μM菠菜铁氧化还原蛋白、0.132单位菠菜铁氧化还原蛋白：$NADP^+$氧化还原酶、0.8单位葡萄糖－6－磷酸脱氢酶、1.4 mM NADP和7.1 mM葡萄糖－6－磷酸、100 μM或200 μM本发明的脱氧化合物和1.7 μM 氨基端组氨酸标记的EpoK或1.6 μM 羧基端组氨酸标记的EpoK。反应于30℃孵育67分钟，并于90℃加热2分钟终止。不溶物质通过离心移去，并将50微升含预期产物的上清在LC/MS上分析。

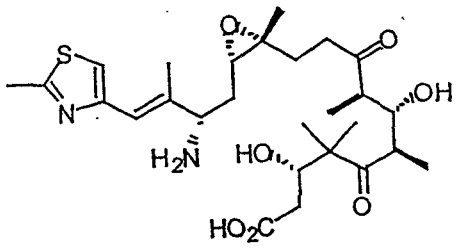
实施例16

化学环化

本实施例描述了式I化合物的化学环化，其中R^8和R^{10}一起形成碳碳双键（本发明的脱氧化合物）。将二甲基二氧杂环丙烷(0.1 M，溶于丙酮，17毫升)溶液于-78℃逐滴加入本发明的脱氧化合物（505毫克）在10毫升CH_2C1_2中的溶液。混合物升温至-50℃，维持1小时，然后加入另一部分二甲基二氧杂环丙烷溶液（5毫升），反应于-50℃继续另外1.5小时。然后反应在氮气流中于-50℃干燥。通过在SiO_2上快速层析对产物进行纯化。

实施例17

(3S, 6R, 7S, 8R,12R,13S,15S,16E)-15-氨基-3,7-二羟基-5,9-二氧代-12,13-环氧- 4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17-(2-甲基噻唑-4-基-16-十七碳烯酸



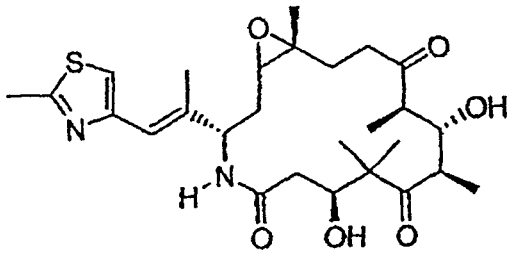
步骤 1 9-氧代-埃坡霉素 B。二甲基二氧杂环丙烷溶液（0.1 M，溶于丙酮，17 毫升）于-78℃逐滴加入 9-氧代-埃坡霉素 D (505 毫克)在 10 毫升 CH_2Cl_2 中的溶液。混合物升温至-50℃，维持 1 小时，然后加入另一部分的二甲基二氧杂环丙烷溶液（5 毫升），反应于-50℃继续另外 1.5 小时。然后反应在氮气流中于-50℃干燥。通过在 SiO_2 上快速层析对产物进行纯化。

步骤 2 (3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S, 15S, 16E)-15-叠氮基-3, 7-二羟基-5, 9-二氧代-12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸。在氩气下，用四(三苯基膦)钯(0.58 克)处理 9-氧代－埃坡霉素 B (2. 62 克)和叠氮化钠 (0. 49 克)在 55 毫升脱气的四氢呋喃／水(10 : 1 v/v)中的溶液。混合物在 45℃维持 1 小时，然后用 50 毫升水稀释，并用乙酸乙酯提取。提取物用盐水洗涤，在 Na_2SO4 上干燥，过滤，并蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

步骤 3 (3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S, 15S, 16E)-15-氨基-3, 7-二羟基-5, 9-二氧代 12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸。在氩气下，于环境温度，用 1. 0 M 三甲基膦在甲苯中的溶液（3 毫升）处理(3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S, 15S, 16E)-15-叠氮基-3, 7-二羟基-5, 9－二氧代-12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸(565 毫克)在 15 毫升 THF/水 (10 : 1 v/v)中的溶液 2 小时。浓缩混合物，通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

实施例 18

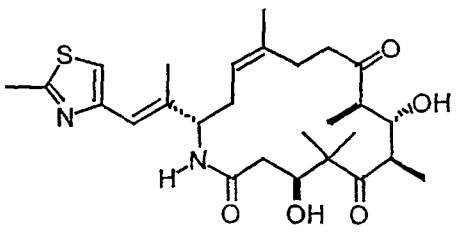
(4S, 7R, 8S, 9R, 13R, 14S, 16S)-13, 14-环氧-4, 8-二羟基-2, 6, 10-三氧代-5, 5, 7, 9, 13- 五甲基-16- (l-(2-甲基噻唑-4-基) 丙烯-2-基)-l-氮杂-11-环十六碳烯。



将(3S, 6R, 7S,8R,12R,13S,15S,16E)-15-氨基-3, 7-二羟基-5, 9－二氧代-12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸(540 毫克) 在乙腈/二甲基甲酰胺(20 : 1 v/v, 150 毫升)中的溶液冷至 0 ℃，并接下来用 1-羟基苯并三唑(0. 135 克)和 1- (3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸 (0.5 克)处理。将混合物保温至环境温度，并维持 12 小时，然后用水稀释，并用乙酸乙酯提取。提取物接下来用水、饱和 $NaHCO_3$ 和盐水洗涤，然后在 Na_2SO_4 上干燥，过滤，并蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

实施例 19

(4S, 7R, 8S, 9R, 13Z, 16S)-4, 8-二羟基-2, 6, 10-三氧代-5, 5, 7, 9, 13-五甲基-16-(1-(2-甲基噻唑-4-基)丙烯-2-基)-1-氮杂-11-环十六碳烯

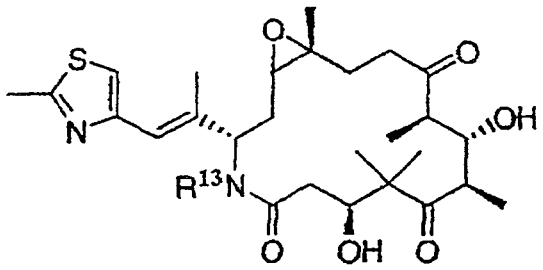


在-78℃的六氯化钨(0.76 克)在四氢呋喃中的溶液（20ml）用 1.6 M 正

丁基锂在己烷中的溶液（2.5 毫升）处理。让混合物保温至环境温度 20 分钟。在环境温度下，将得到的绿色溶液中的 13.8 毫升室温下加入(4S,7R,8S,9R,13R,14S,16S)-4, 8-二羟基-13,14-环氧-2, 6, 10-三氧代-5, 5, 7, 9, 13-五甲基-16-(1-(2-甲基噻唑-4-基) 丙烯-2-基)-1-氮杂-11-环十六碳烯(360 毫克)在 2 毫升四氢呋喃中的溶液。30 分钟后，将反应冷却至 0℃，并用饱和 $NaHCO_3$(10 毫升)处理。混合物用水稀释，并用 CH_2C1_2 提取。提取物在 Na_2SO_4 上干燥，过滤，并蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

实施例 20

(4S,7R,8S,9R,13R,14S,16S)-13,14- 环氧-4,8- 二羟基-2,6,10- 三氧代-1,5,5,7,9,13－六甲基-16-（1-（2-甲基噻唑-4-基）丙烯-2-基）-l-氮杂-11-环十六碳烯。



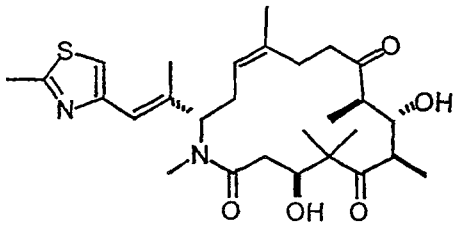
步骤 1 (3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S,15S,16E)-3, 7-二羟基-5, 9-二氧代-12, 13-环氧－4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-15- (甲基氨基)-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸。用 37％含水甲醛（1 毫升）、乙酸（25 微升）和氰基氢硼化钠(100 毫克)处理 (3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S, 15S, 16E)-15-氨基-3, 7- 二羟基-5, 9-二氧代-12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸(540 毫克) 在 10 毫升甲醇中的溶液。1 小时后，用 1N HCL 处理混合物，然后用乙酸乙酯和水稀释。水相用乙酸乙酯提取，并合并有机相，在 Na_2SO_4 上干燥，过滤，并蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

步骤 2 (4S, 7R, 8S, 9R, 13R, 14S, 16S)-13, 14-环氧-4, 8-二羟基-2, 6,

10-三氧代- 1, 5, 5, 7, 9, 13-六甲基-16-(1-(2-甲基噻唑-4-基)丙烯-2-基)-1-氮杂-11-环十六碳烯。将(3S, 6R, 7S, 8R, 12R, 13S, 15S, 16E)- 3, 7-二羟基-5, 9－二氧代-12, 13-环氧-4, 4, 6, 8, 12, 16-六甲基-15- (甲基氨基)-17- (2-甲基噻唑-4-基)-16-十七碳烯酸(554 毫克)在乙腈/二甲基甲酰胺 (20:1 v/v, 150 毫升)中的溶液冷却至 0℃，接下来 1-羟基苯并三唑(0.135 克)和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸(0.5 克)处理。混合物保温至环境温度，并维持 12 小时，然后用水稀释，并用乙酸乙酯提取。提取物继续用水、饱和 $NaHCO_3$、盐水洗涤，然后在 Na_2SO_4 上干燥，过滤，并蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

实施例 21

(4S,7R,8S,9R,13Z,16S)-4,8-二羟基-2, 6, 10-三氧代-1, 5, 5, 7, 9, 13-六甲基-16- (l- (2- 甲基噻唑-4-基) 丙烯-2-基)-1-氮杂-11-环十六碳烯。



用正丁基锂在己烷中的 1.6M 溶液（2.5 毫升）处理-78℃的六氯化钨(0.76 克)在四氢呋喃中的溶液（20 毫升）。让混合物保温至环境温度 20 分钟。将得到的绿色溶液中的 13. 8 毫升于环境温度下加入(4S, 7R, 8S, 9R, 13R, 14S, 16S)-13, 14-环氧-4, 8-二羟基-2, 6, 10-三氧-1, 5, 5, 7, 9, 13－六甲基-16- (l- (2-甲基噻唑-4-基)丙烯-2-基)-l-氮杂-11-环十六碳烯 (370 毫克)在 2 毫升四氢呋喃中的溶液。30 分钟后，将反应冷却至 0℃，并用饱和 $NaHCO_3$ (10 毫升)处理。用水稀释混合物，并用 CH_2Cl_2 提取。提取物在 Na_2SO_4 上干燥，过滤，蒸发。通过在 SiO_2 上快速层析，对产物进行纯化。

实施例 22

脂质体组合物

本实施例描述了含 9-氧代埃坡霉素的脂质体组合物。脂类和 9-氧代-埃坡霉素 D 的混合物溶解于乙醇中，并在减压下通过旋转将该溶液干燥成薄膜。通过加入水相，使得到的脂膜被水合，并将该含脂质体的埃坡霉素衍生物的粒度调至预期范围。优选地，平均颗粒直径小于 10 微米，优选地从约 0.5 微米至约 4 微米。粒度可减少至预期水平，例如，通过使用研磨机（如空气喷射磨机、球磨机或振动磨机）、微沉淀、喷雾干燥、冷冻干燥、高压均化、从超临界介质中重结晶，或通过使脂质体的含水悬液挤压穿过具有所选选的统一孔径的一系列膜（如聚碳酸脂膜）。在一个实施方案中，脂质体组合物包含: 发明的化合物（1.00 毫克）；磷脂酰胆碱(16.25 毫克); 胆固醇(3.75 毫克); 聚乙二醇衍生的二硬脂基磷脂酰乙醇胺(5.00 毫克)；乳糖(80.00 毫克)；柠檬酸 (4.20 毫克)；酒石酸(6.00 毫克)；NaOH (5.44 毫克)；水（至 1 毫升）。在另一实施方案中，脂质体组合物包含: 发明的化合物(1.00 毫克)；磷脂酰胆碱(19.80 毫克)；胆固醇(3.75 毫克)；二硬脂基磷脂酰胆碱 (1.45 毫克)；乳糖(80.00 毫克)；柠檬酸(4.20 毫克)；酒石酸(6.00 毫克)；NaOH (5.44 毫克)；水(至 1 毫升)。又在另一个实施方案中，脂质体组合物包含: 本发明的化合物(1.00 毫克)；1-棕榈酰-2-油基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(17.50 毫克)；1-棕榈酰-2-油基-sn-甘油基-3-甘油磷酸, Na (7.50 毫克)；乳糖(80. 毫克)；柠檬酸(4.20 毫克)；酒石酸(6.00 毫克)；NaOH (5.44 mg)；水(至 1 毫升)。包含本发明的其它化合物的脂质体组合物用类似于如上所述的条件制备。

实施例 23

聚谷氨酸共轭物

本实施例描述了聚谷氨酸-21-羟基-9-氧代-埃坡霉素 D 共轭物的制造。用水溶解聚 (l-谷氨酸) ("PG") 钠盐 (MW 34 K, Sigma, 0.35 克)。用 0.2 M HCl 将水溶液的 pH 调至 2。收集沉淀，用蒸馏水透析，并冷冻干燥，产生 0.29 克 PG。将 20 毫克 21-羟基-9-氧代-埃坡霉素 D、15 毫克二环己

基碳二亚胺(“DCC”)和痕量的二甲基氨基吡啶加入 PG(75 毫克，重复单元 FW 170, 0. 44 mM)在无水 DMF 的溶液中（1.5 毫升）。反应在室温进行 4 小时，或者直至薄层层析指示结束。将反应混合物倒入氯仿，收集得到的沉淀，并在真空中干燥，产生大约 65 毫克 PG-21-羟基-9-氧代-埃坡霉素 D 共轭物。改变起始材料中本发明化合物与 PG 的重量比将导致 21-羟基-10, 11-脱氢埃坡霉素 D 的多种浓度的聚合共轭物。本发明的其它化合物的共轭物用类似于如上所述的条件制备。

实施例 24

静脉内制剂

本实施例描述了 9-氧代-埃坡霉素 D 的静脉内制剂。制剂含有 10 毫克/毫升 9-氧代-埃坡霉素 D，甚至含 30%丙二醇、20% Creomophor EL 和 50%乙醇的载体中。将称量的乙醇（591.8 克）放入装有搅拌棒的烧杯中，往溶液中加入 Creomophor EL (315. 0 克)，并混合 10 分钟；然后往溶液中加入丙二醇（466.2 克），并再混合 10 分钟，依此制备载体。将 9-氧代-埃坡霉素 D（1 克）加入装有 400-600 毫升载体的 1 升容量瓶，并混合 5 分钟。10，11-脱氢-埃坡霉素 D 加入溶液后，将体积补至 1 升；再混合 10 分钟；并用 0. 22 μm Millipore Millipak 滤器过滤。用测量蠕动泵将得到的溶液无菌注入无菌的 5 毫升小瓶，目标注入体积为 5.15 毫升/瓶。注满的小瓶立即塞紧，并折缝。

用生理盐水或 5%葡萄糖溶液稀释含 10 毫克/毫升 9-氧代-埃坡霉素 D 的小瓶以施与患者，并用非 PVC、非-DEHP 袋和施用装置施与。产品在 1-6 小时期间注入，并递送预期的剂量。

在一个实施方案中，在静脉注入之前，用无菌生理盐水将制剂稀释 20 倍。最终注入浓度是 0.5 毫克/毫升本发明的化合物、1. 5%丙二醇、1% Chremophor EL 和 2. 5 %乙醇，在 1-6 小时期间注入，并递送预期的剂量。

含本发明的其它化合物的静脉内制剂可用类似的方法制备和使用。

实施例 25

Cremophor® 毒性的预处理

本实施例描述了 Cremophor® 毒性的预处理方案。包含 Cremophort® 的本发明化合物的制剂对患者可导致毒性。用类固醇预处理可用于预防过敏反应。可使用任何适当的皮质类固醇或将皮质类固醇与 H_1 拮抗剂和/或 H_2 拮抗剂使用。在一个实施方案中，受试者在用本发明化合物在含有 Cremophor® 制剂处理前 1 小时，口服 50 毫克二苯基羟基胺和 300 毫克甲氰咪胍。在另一实施方案中，受试者在用本发明化合物在含有 Cremophor® 制剂处理前至少 1 小时，静脉内施用 20 毫克地塞米松。在另一个实施方案中，受试者在用本发明化合物在含有 Cremophor® 制剂处理前至少 1 小时，静脉内施用 50 毫克二苯基羟基胺、300 毫克甲氰咪胍和 20 毫克地塞米松。又在另一个实施方案中，将受试者的体重考虑进去，且受试者在用本发明化合物在含有 Cremophor® 制剂处理前至少 1 小时，预先施用二苯基羟基胺（5 毫克/千克, i. v.）、甲氰咪胍(5 毫克/千克, i. v)和地塞米松(1 毫克/千克, i. m.)。

此处的所有科学公开和专利公开在此处引用作为参考。本发明现在已通过书面描述和实施例进行了描述，本领域技术人员将认识到，本发明可用于多种实施方案，前面的描述和实施例是用于阐述的目的，并不用于限制下面的权利要求。

序 列 表

<110> 科塞生物科学有限公司

<120> 聚酮化合物的制备

<130> 300622003153

<140> 未授予
<141> 2001-04-26

<150> PCT/US01/13793
<151> 2001-04-26

<150> US 09/560,367
<151> 2000-04-28

<150> US 60/232,696
<151> 2000-09-14

<150> US 60/257,517
<151> 2000-12-21

<150> US 09/825,856
<151> 2001-04-03

<150> US 09/825,876
<151> 2001-04-03

<150> US 60/269,020
<151> 2001-04-13

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 Seq1

<400> 1
agcggataac aatttcacac aggaaacagc 30

<210> 2
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 Mxpil1

<400> 2
ttaattaaga gaaggttgca acgggggc 29

<210> 3
<211> 848
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> pilA 启动子的序列

<400> 3
cgacgcaggt gaagctgctt cgtgtgctcc aggagcggaa ggtgaagccg gtcggcagcg 60
ccgcggagat tcccttccag gcgcgtgtca tcgcggcaac gaaccggcgg ctcgaagccg 120
aagtaaaggc cggacgcttt cgtgaggacc tcttctaccg gctcaacgtc atcacgttgg 180
agctgcctcc actgcgcgag cgttccggcg acgtgtcgtt gctggcgaac tacttcctgt 240
ccagactgtc ggaggagttg gggcgacccg gtctgcgttt ctcccccgag acactggggc 300
tattggagcg ctatcccttc ccaggcaacg tgcggcagct gcagaacatg gtggagcggg 360
ccgcgaccct gtcggattca gacctcctgg ggccctccac gcttccaccc gcagtgcggg 420
gcgatacaga ccccgccgtg cgtcccgtgg agggcagtga gccagggctg gtggcgggct 480
tcaacctgga gcggcatctc gacgacagcg agcggcgcta tctcgtcgcg gcgatgaagc 540
aggccggggg cgtgaagacc cgtgctgcgg agttgctggg cctttcgttc cgttcattcc 600
gctaccggtt ggccaagcat gggctgacgg atgacttgga gcccgggagc gcttcggatg 660
cgtaggctga tcgacagtta tcgtcagcgt cactgccgaa ttttgtcagc cctggaccca 720
tcctcgccga ggggattgtt ccaagccttg agaattgggg ggcttggagt gcgcacctgg 780
gttggcatgc gtagtgctaa tcccatccgc gggcgcagtg ccccccgttg caaccttctc 840
ttaattaa 848

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.1

<400> 4
aaaagcttcg gggcacctcc tggctgtcgg c 31

<210> 5
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.4

<400> 5
ggttaattaa tcaccctcct cccaccccgg gcat 34

<210> 6
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-66.1

<400> 6
gcgggaagct ttcacggcgc aggccctcgt ggg 33

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-67

<400> 7
gcggtacctt caacaggcag gccgtctcat g 31

<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.3

<400> 8
aaaagcttag gcggtattgc tttcgttgca ct 32

<210> 9
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.5

<400> 9
ggttaattaa ggtcagcaca cggtccgtgt gcat 34

<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.8

<400> 10
aaagatctct cccgatgcgg gaaggc 26

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.9

<400> 11
ggggatccaa tggaagggga tgtccgcgga a 31

<210> 12
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.6

<400> 12
ggttaattaa catcgcgcta tcagcagcgc tgag 34

<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 111-44.7

<400> 13
ggttaattaa tcctcagcgg ctgacccgct cgcg 34

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-103

<400> 14
aaaaaatgca tctacctcgc tcgtggcggt t 31

<210> 15
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-107.1

<400> 15
ccccctctag aataggtcgg cagcggtacc cg 32

<210> 16
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-105

<400> 16
tttttatgca tgcggcagtt tgaacggaga tgct 34

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 90-106

<400> 17
cccccgaatt ctcccggaag gcacacggag ac 32

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL3

<400> 18
atgaattcat gatggcccga gcagcg 26

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL4

<400> 19
atctgcagcc agtaccgctg ccgctgcca 29

<210> 20
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL-5

<400> 20
gctctagaac ccggaactgg cgtggcctgt 30

<210> 21
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL-6

<400> 21
gcagatctac cgcgtgagga cacggcctt 29

<210> 22
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 TL23

<400> 22
ggcgccggcc aagagcgccg cgccggtcgg cgggccagcc ggggacgggt 50

<210> 23
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 TL24

<400> 23
ctagacccgt ccccggctgg cccgccgacc ggcgcggcgc tcttggccgg cgcctgca 58

<210> 24
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL33

<400> 24
ggatgcatgc gccggccgaa gggctcgga 29

<210> 25
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL34

<400> 25
tcactagtca gcgacaccgg cgctgcgttt 30

<210> 26
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL7

<400> 26
gcgctcgaga gcgcgggtat cgct 24

<210> 27
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL8

<400> 27
gagatgcatc caatggcgct cacgct 26

<210> 28
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL9

<400> 28
gctctagagc cgcgcgcctt ggggcgct 28

<210> 29
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL10

<400> 29
gcagatcttg gggcgctgcc tgtggaa 27

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL31

<400> 30
ggctgcagac ccagaccgcg ggcgacgc 28

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物 TL32
<400> 31
gctctagagg tggcgccggc cgcccggcg 29

<210> 32
<211> 552
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 埃坡霉素 PKS 的延伸组件 6 的 KR 结构域的 DNA 序列

<221> CDS
<222> (1)...(552)

<400> 32

```
gac ggc acc tac ctc gtg acc ggc ggt ctg ggt ggg ctc ggt ctg agc        48
Asp Gly Thr Tyr Leu Val Thr Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gly Leu Ser
 1               5                  10                  15

gtg gct gga tgg ctg gcc gag cag ggg gct ggg cat ctg gtg ctg gtg        96
Val Ala Gly Trp Leu Ala Glu Gln Gly Ala Gly His Leu Val Leu Val
            20                  25                  30

ggc cgc tcc ggt gcg gtg agc gcg gag cag cag acg gct gtc gcc gcg       144
Gly Arg Ser Gly Ala Val Ser Ala Glu Gln Gln Thr Ala Val Ala Ala
        35                  40                  45

ctc gag gcg cac ggc gcg cgt gtc acg gta gcg agg gca gac gtc gcc       192
Leu Glu Ala His Gly Ala Arg Val Thr Val Ala Arg Ala Asp Val Ala
    50                  55                  60

gat cgg gcg cag atc gag cgg atc ctc cgc gag gtt acc gcg tcg ggg       240
Asp Arg Ala Gln Ile Glu Arg Ile Leu Arg Glu Val Thr Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atg ccg ctc cgc ggc gtc gtt cat gcg gcc ggt atc ctg gac gac ggg       288
Met Pro Leu Arg Gly Val Val His Ala Ala Gly Ile Leu Asp Asp Gly
                85                  90                  95

ctg ctg atg cag caa acc ccc gcg cgg ttc cgc gcg gtc atg gcg ccc       336
Leu Leu Met Gln Gln Thr Pro Ala Arg Phe Arg Ala Val Met Ala Pro
            100                 105                 110

aag gtc cga ggg gcc ttg cac ctg cat gcg ttg aca cgc gaa gcg ccg       384
Lys Val Arg Gly Ala Leu His Leu His Ala Leu Thr Arg Glu Ala Pro
        115                 120                 125

ctc tcc ttc ttc gtg ctg tac gct tcg gga gca ggg ctc ttg ggc tcg       432
Leu Ser Phe Phe Val Leu Tyr Ala Ser Gly Ala Gly Leu Leu Gly Ser
    130                 135                 140

ccg ggc cag ggc aac tac gcc gcg gcc aac acg ttc ctc gac gct ctg       480
Pro Gly Gln Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Asn Thr Phe Leu Asp Ala Leu
```

145 150 155 160

gca cac cac cgg agg gcg cag ggg ctg cca gca ttg agc atc gac tgg 528
Ala His His Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu Ser Ile Asp Trp
165 170 175

ggc ctg ttc gcg gac gtg ggt ttg 552
Gly Leu Phe Ala Asp Val Gly Leu
180

<210> 33
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 埃坡霉素 PKS 的延伸组件 6 的 KR 结构域的氨基酸序列

<400> 33
Asp Gly Thr Tyr Leu Val Thr Gly Gly Leu Gly Gly Leu Gly Leu Ser
1 5 10 15
Val Ala Gly Trp Leu Ala Glu Gln Gly Ala Gly His Leu Val Leu Val
20 25 30
Gly Arg Ser Gly Ala Val Ser Ala Glu Gln Gln Thr Ala Val Ala Ala
35 40 45
Leu Glu Ala His Gly Ala Arg Val Thr Val Ala Arg Ala Asp Val Ala
50 55 60
Asp Arg Ala Gln Ile Glu Arg Ile Leu Arg Glu Val Thr Ala Ser Gly
65 70 75 80
Met Pro Leu Arg Gly Val Val His Ala Ala Gly Ile Leu Asp Asp Gly
85 90 95
Leu Leu Met Gln Gln Thr Pro Ala Arg Phe Arg Ala Val Met Ala Pro
100 105 110
Lys Val Arg Gly Ala Leu His Leu His Ala Leu Thr Arg Glu Ala Pro
115 120 125
Leu Ser Phe Phe Val Leu Tyr Ala Ser Gly Ala Gly Leu Leu Gly Ser
130 135 140
Pro Gly Gln Gly Asn Tyr Ala Ala Ala Asn Thr Phe Leu Asp Ala Leu
145 150 155 160
Ala His His Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu Ser Ile Asp Trp
165 170 175
Gly Leu Phe Ala Asp Val Gly Leu
180

<210> 34
<211> 552
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 新9-酮-埃坡霉素PKS的延伸组件6的突变KR结构域的DNA序列
<221> CDS
<222> (1)...(552)

<400> 34

```
gac ggc acc tac ctc gtg acc ggc gct ctg ggt ggg ctc ggt ctg agc       48
Asp Gly Thr Tyr Leu Val Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Gly Leu Ser
 1               5                  10                  15

gtg gct gga tgg ctg gcc gag cag ggg gct ggg cat ctg gtg ctg gtg       96
Val Ala Gly Trp Leu Ala Glu Gln Gly Ala Gly His Leu Val Leu Val
            20                  25                  30

ggc cgc tcc ggt gcg gtg agc gcg gag cag cag acg gct gtc gcc gcg      144
Gly Arg Ser Gly Ala Val Ser Ala Glu Gln Gln Thr Ala Val Ala Ala
        35                  40                  45

ctc gag gcg cac ggc gcg cgt gtc acg gta gcg agg gca gac gtc gcc      192
Leu Glu Ala His Gly Ala Arg Val Thr Val Ala Arg Ala Asp Val Ala
    50                  55                  60

gat cgg gcg cag atc gag cgg atc ctc cgc gag gtt acc gcg tcg ggg      240
Asp Arg Ala Gln Ile Glu Arg Ile Leu Arg Glu Val Thr Ala Ser Gly
65                  70                  75                  80

atg ccg ctc cgc ggc gtc gtt cat gcg gcc ggt atc ctg gac gac ggg      288
Met Pro Leu Arg Gly Val Val His Ala Ala Gly Ile Leu Asp Asp Gly
                85                  90                  95

ctg ctg atg cag caa acc ccc gcg cgg ttc cgc gcg gtc atg gcg ccc      336
Leu Leu Met Gln Gln Thr Pro Ala Arg Phe Arg Ala Val Met Ala Pro
            100                 105                 110

aag gtc cga ggg gcc ttg cac ctg cat gcg ttg aca cgc gaa gcg ccg      384
Lys Val Arg Gly Ala Leu His Leu His Ala Leu Thr Arg Glu Ala Pro
        115                 120                 125

ctc tcc ttc ttc gtg ctg tac gct tcg gga gca ggg ctc ttg ggc tcg      432
Leu Ser Phe Phe Val Leu Tyr Ala Ser Gly Ala Gly Leu Leu Gly Ser
```

130 135 140

ccg ggc cag ggc aac ttc gcc acg gcc aac acg ttc ctc gac gct ctg 480
Pro Gly Gln Gly Asn Phe Ala Thr Ala Asn Thr Phe Leu Asp Ala Leu
145 150 155 160

gca cac cac cgg agg gcg cag ggg ctg cca gca ttg agc atc gac tgg 528
Ala His His Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu Ser Ile Asp Trp
165 170 175

ggc ctg ttc gcg gac gtg ggt ttg 552
Gly Leu Phe Ala Asp Val Gly Leu
180

<210> 35
<211> 184
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 新9-酮-埃坡霉素PKS的延伸组件6的突变KR结构域的氨基酸序列

<400> 35
Asp Gly Thr Tyr Leu Val Thr Gly Ala Leu Gly Gly Leu Gly Leu Ser
1 5 10 15
Val Ala Gly Trp Leu Ala Glu Gln Gly Ala Gly His Leu Val Leu Val
20 25 30
Gly Arg Ser Gly Ala Val Ser Ala Glu Gln Gln Thr Ala Val Ala Ala
35 40 45
Leu Glu Ala His Gly Ala Arg Val Thr Val Ala Arg Ala Asp Val Ala
50 55 60
Asp Arg Ala Gln Ile Glu Arg Ile Leu Arg Glu Val Thr Ala Ser Gly
65 70 75 80
Met Pro Leu Arg Gly Val Val His Ala Ala Gly Ile Leu Asp Asp Gly
85 90 95
Leu Leu Met Gln Gln Thr Pro Ala Arg Phe Arg Ala Val Met Ala Pro
100 105 110
Lys Val Arg Gly Ala Leu His Leu His Ala Leu Thr Arg Glu Ala Pro
115 120 125
Leu Ser Phe Phe Val Leu Tyr Ala Ser Gly Ala Gly Leu Leu Gly Ser
130 135 140
Pro Gly Gln Gly Asn Phe Ala Thr Ala Asn Thr Phe Leu Asp Ala Leu
145 150 155 160
Ala His His Arg Arg Ala Gln Gly Leu Pro Ala Leu Ser Ile Asp Trp

165 170 175

Gly Leu Phe Ala Asp Val Gly Leu
180

<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-1

<400> 36
acaagcttgc gaaaaagaac gcgtct 26

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-2

<400> 37
cgagatctgc cgggcgagga agcggccctg 30

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-3

<400> 38
gcatgcatgc gccggtcgat ggtgag 26

<210> 39
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-4

<400> 39
agactagtca ccggctggcc caccacaagg 30

<210> 40
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-20

<400> 40
gcatgcatcc agtagcggtc acggcgga 28

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-21

<400> 41
cgagatctgt gttcgcgttc cccgggcag 29

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-13

<400> 42
gcatgcatcc agtagcgctg ccgctggaat 30

<210> 43
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-14

<400> 43
gcagatctgt gttcgtgttc cccggcca 28

<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TLII-17

<400> 44
gcatgcatcc agtaccgctc gcgctg 26

<210> 45
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-18

<400> 45
cgagatctgt cttcgtcttt cccggccag 29

<210> 46
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-5

<400> 46
ggatgcatgt cgagcctgac gcccgccg 28

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-6

<400> 47
gcactagtga tggcgatctc gtcatccgcc gccac 35

<210> 48
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL16

<400> 48
acagatctcg gcgcgctgcc gccggag 27

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL15

<400> 49
ggtctagact cgaacggctc gccaccgc 28

<210> 50
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-11

<400> 50
gtatgcatcc agtagcggac ccgctcga 28

<210> 51
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-12

<400> 51
gcagatctgt gtggctcttc tccggaca 28

<210> 52
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-15

<400> 52
gcatgcatcc agtagcgctg ccgctggaac 30

<210> 53
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-16

<400> 53
ggagatctgc ggtgctgttc acggggca 28

<210> 54
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-19

<400> 54
gtagatctgc tttcctgttc accggaca 28

<210> 55
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL11

<400> 55
ggatgcatct caccccgcga agcg 24

<210> 56
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TL12

<400> 56
gtactagtca agggcgctgc ggagg 25

<210> 57
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-7

<400> 57
gcagatctgc cgcgcgagga gctcgcgat 29

<210> 58
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-8

<400> 58
catctagagc cgctcctgtg gagtcac 27

<210> 59
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-9B

<400> 59
ggatgcatgc gccggccgaa gggctcggag 30

<210> 60
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-10

<400> 60
gcactagtga tggcgatcgg gtcctctgtc gc 32

<210> 61
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-22

<400> 61
tgatccatgc tgcggccgct agcgtgggca tggccgc 37

<210> 62
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TLII-23

<400> 62
gcggccatgc ccacgctagc ggccgcagca tggatca 37

用于生物合成埃坡霉素类似物的其它起始物

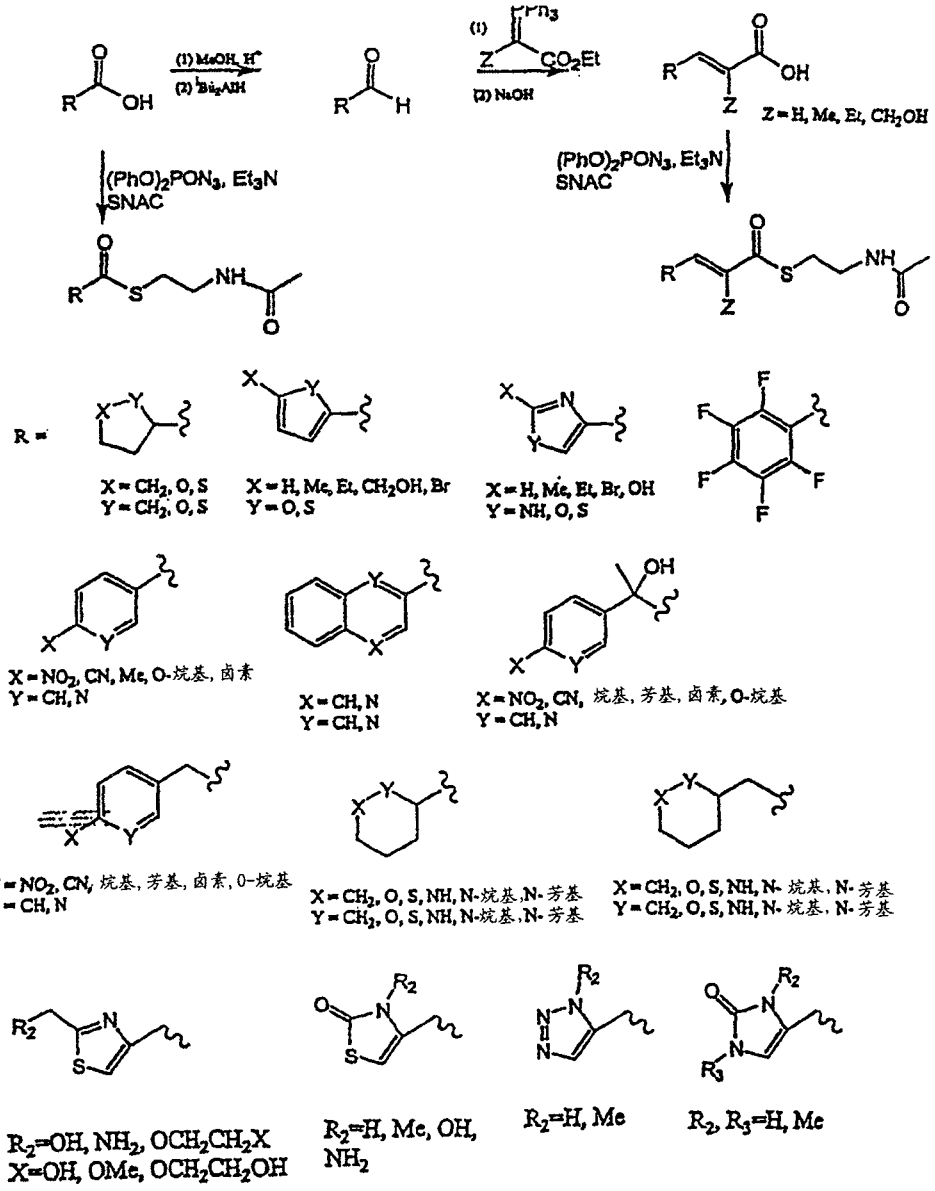


图1

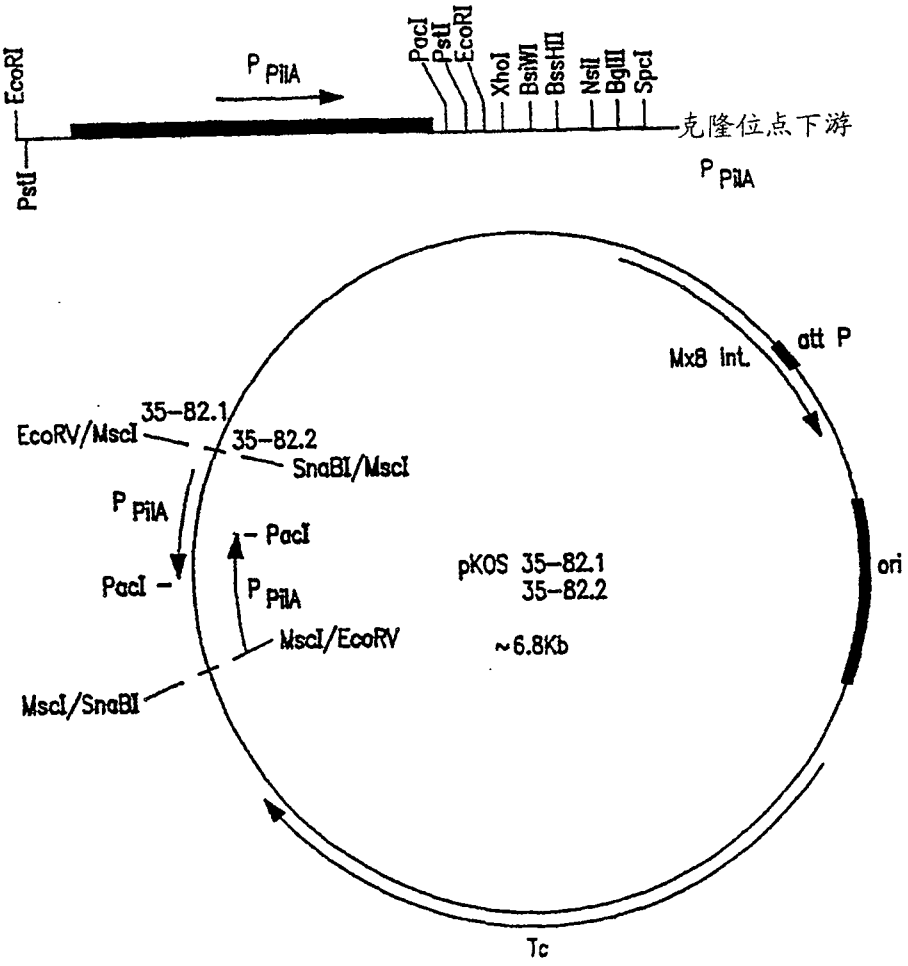

EcoRI
PstI
P PilA
PacI
PstI
EcoRI
XhoI
BsiWI
BssHII
NsiI
BglII
SpeI
克隆位点下游
P PilA
att P
Mx8 int.
35-82.1
EcoRV/MscI
35-82.2
SnaBI/MscI
P PilA
PacI
PacI
P PilA
MscI/EcoRV
MscI/SnaBI
pKOS 35-82.1
35-82.2
~6.8Kb
ori
Tc

图2

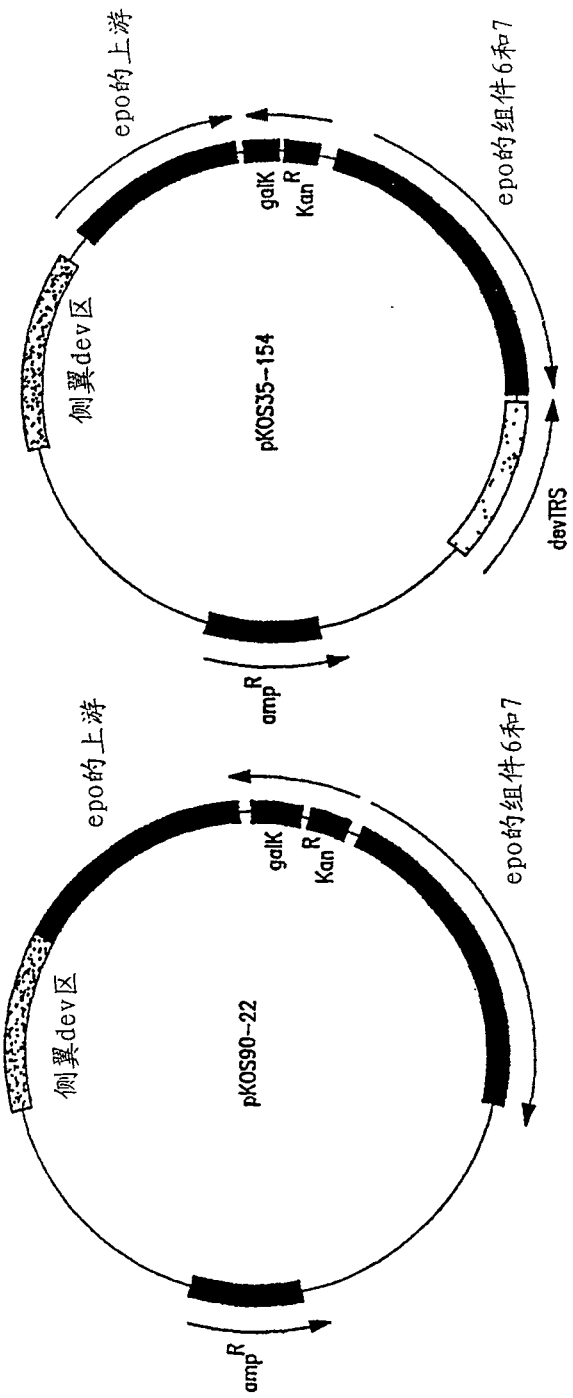

epo的上游
galK
Kan R
epo的组件6和7
侧翼dev区
pKOS35-154
devTRS
amp R
epo的上游
galK
Kan R
epo的组件6和7
侧翼dev区
pKOS90-22
amp R

图3

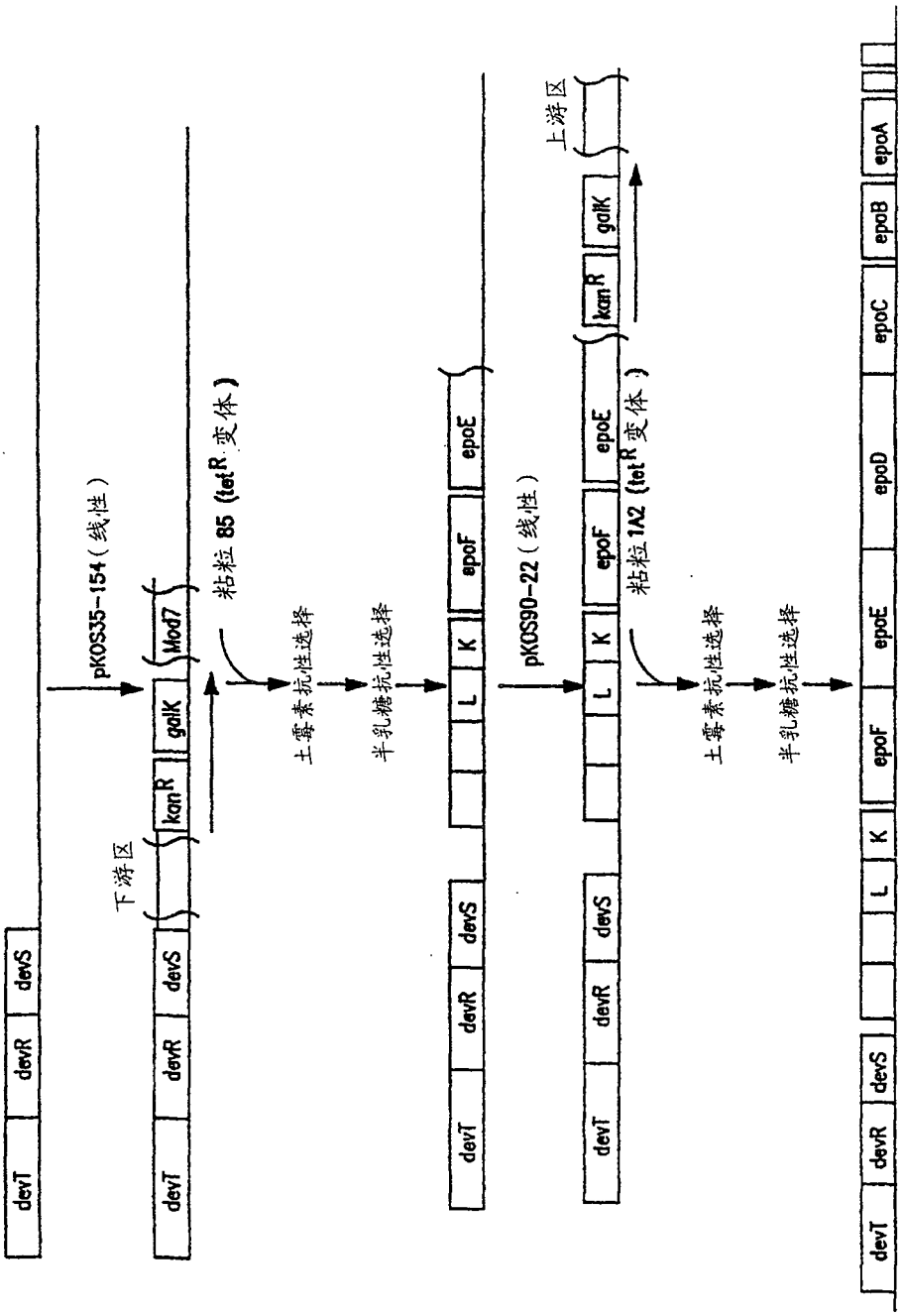

devT
devR
devS
pKOS35-154（线性）
下游区
kanR
galK
Mod7
粘粒 85 (tetR 变体)
土霉素抗性选择
半乳糖抗性选择
L
K
epoF
epoE
pKOS90-22（线性）
上游区
粘粒 1A2 (tetR 变体)
epoD
epoC
epoB
epoA

图4

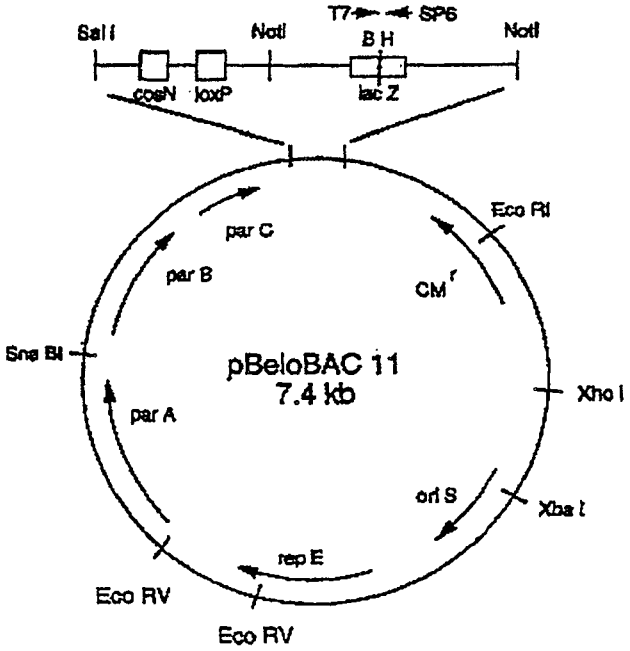

Sal I
Not I
T7
SP6
B H
Not I
cosN
loxP
lac Z
par C
par B
Eco RI
CM r
Sna BI
pBeloBAC 11
7.4 kb
Xho I
par A
ori S
Xba I
rep E
Eco RV
Eco RV

图5

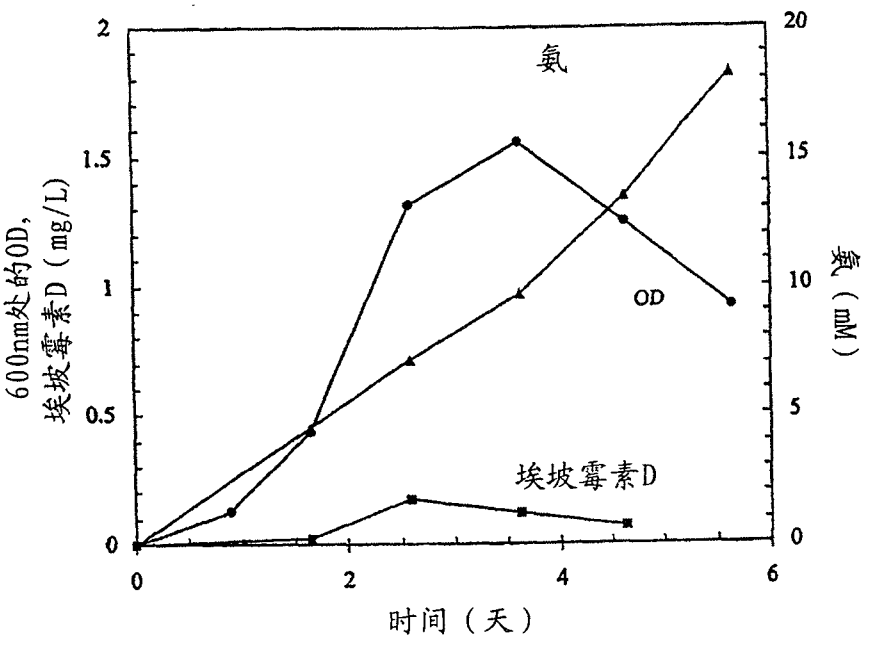

600nm处的OD,
埃坡霉素D（mg/L）
氨（mM）
时间（天）
氨
OD
埃坡霉素D
0
0.5
1
1.5
2
0
5
10
15
20
0
2
4
6

图6

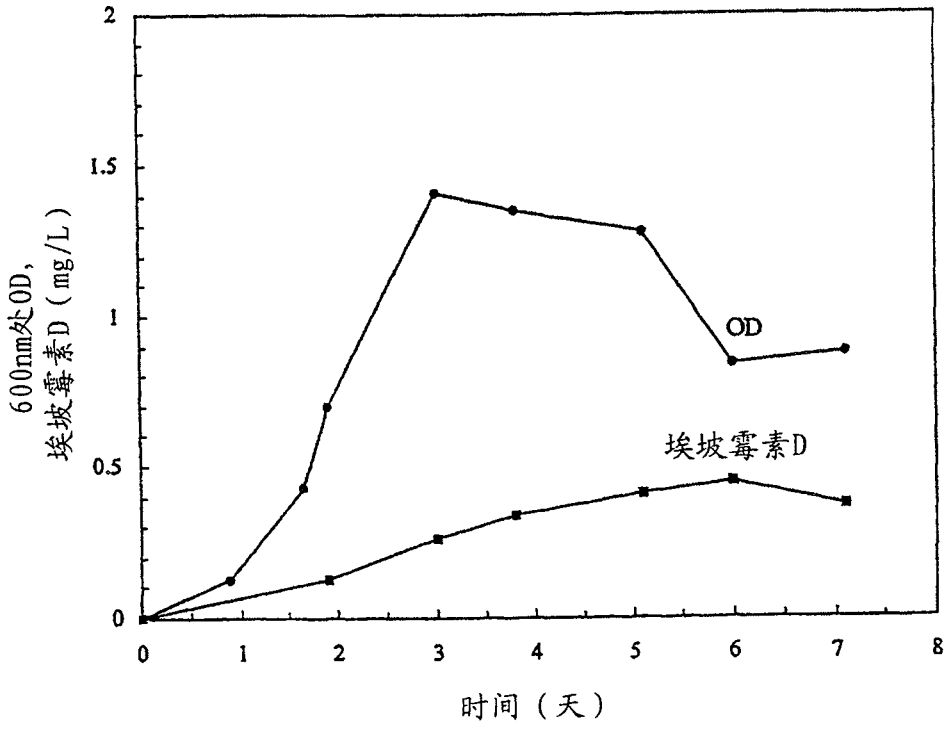


图7

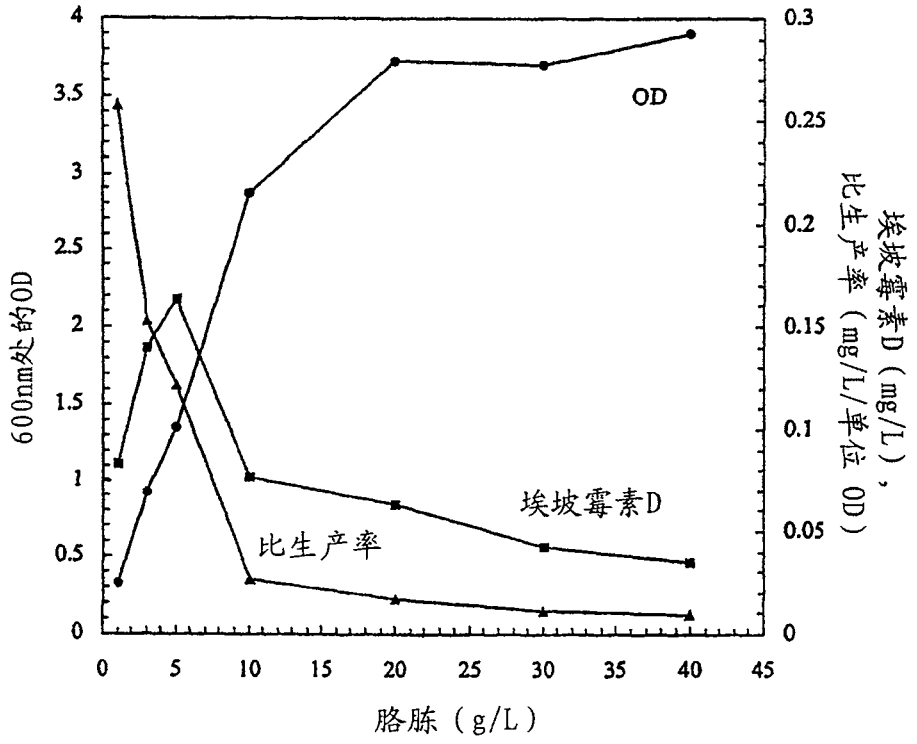

600nm处的OD
埃坡霉素D（mg/L），
比生产率（mg/L/单位 OD）
OD
埃坡霉素D
比生产率
胳胨（g/L）
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
0.05
0.1
0.15
0.2
0.25
0.3
5
10
15
20
25
30
35
40
45

图8

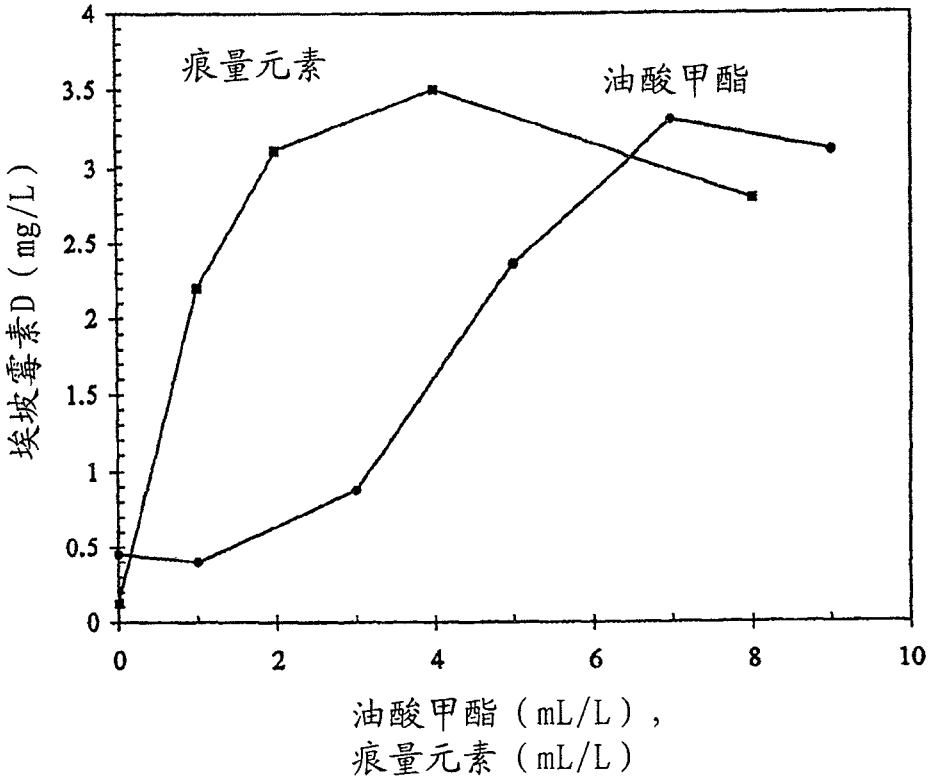

痕量元素
油酸甲酯
埃坡霉素D（mg/L）
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
2
4
6
8
10
油酸甲酯（mL/L），
痕量元素（mL/L）

图9

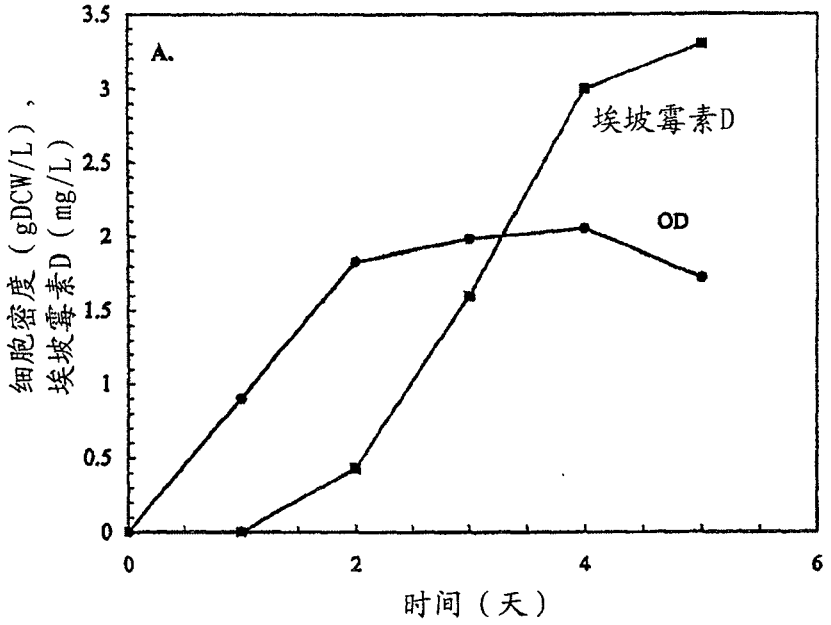


图10A

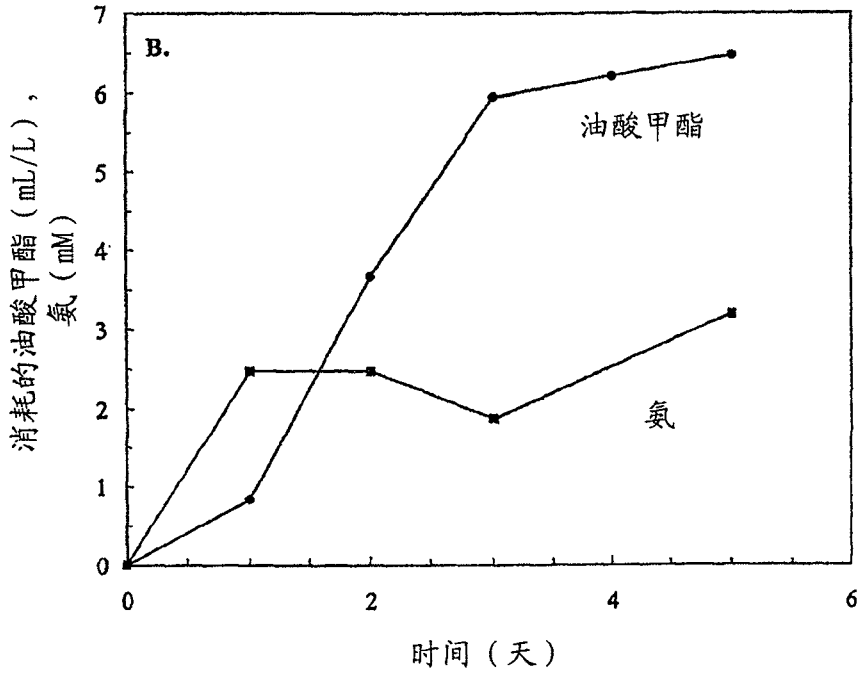


图10B

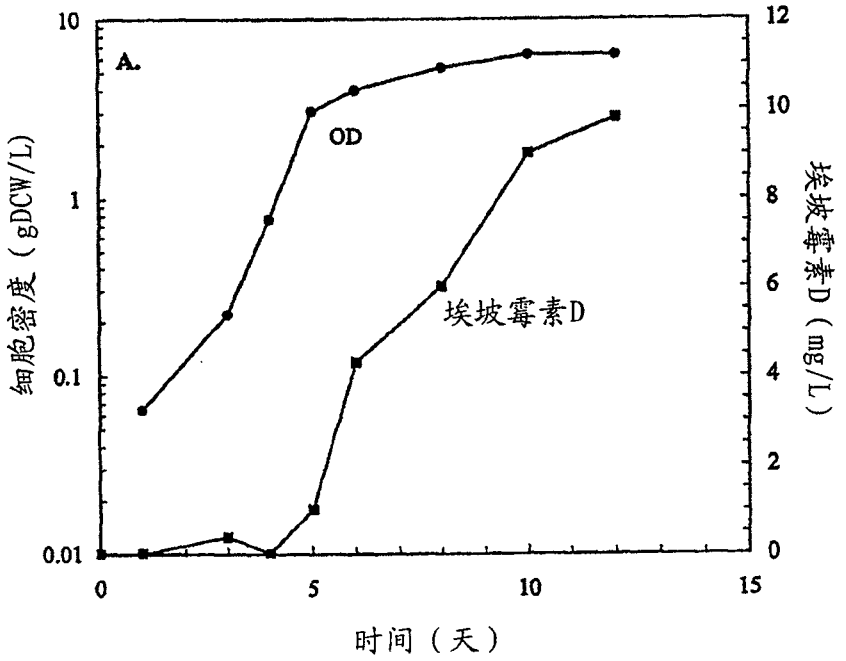

A.
OD
埃坡霉素D
细胞密度（gDCW/L）
埃坡霉素D（mg/L）
时间（天）
10
1
0.1
0.01
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15

图11A

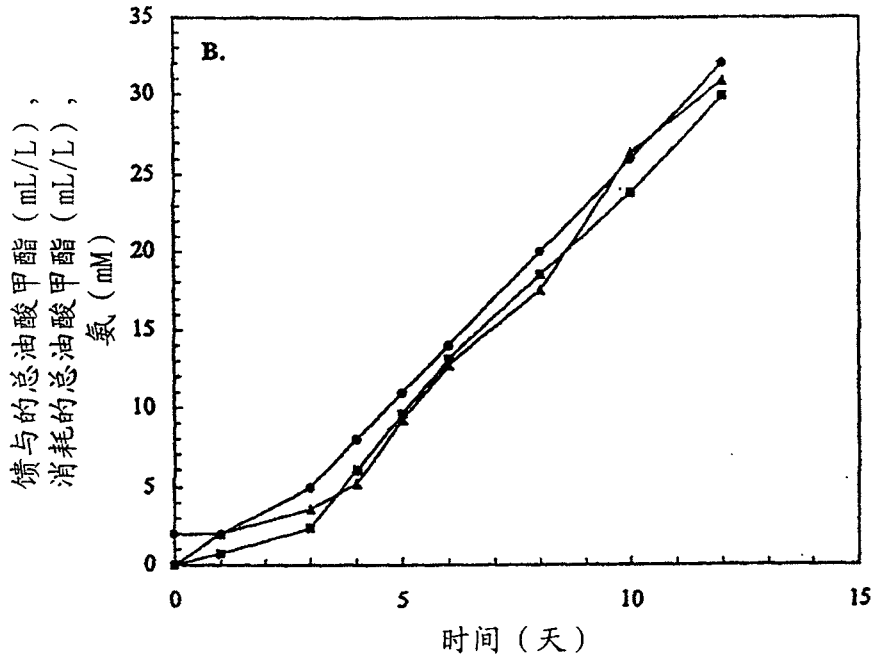


图11B

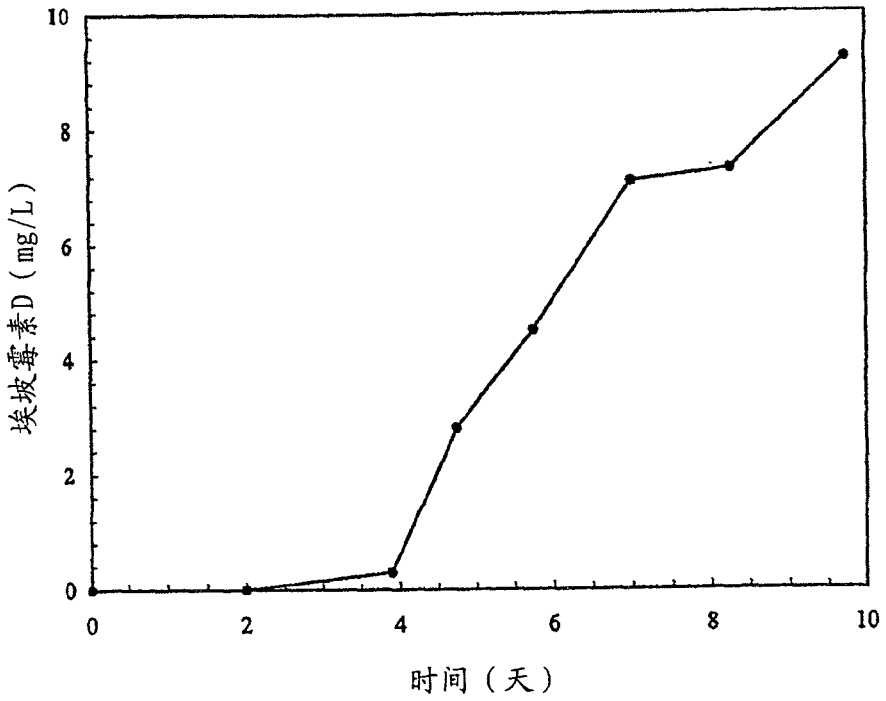


图12

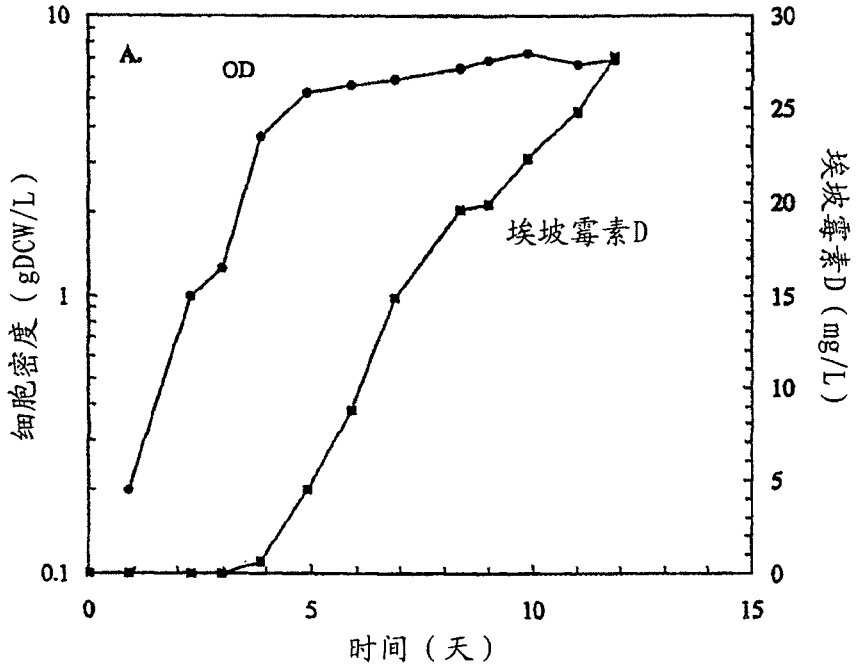

A.
OD
埃坡霉素D
细胞密度（gDCW/L）
埃坡霉素D（mg/L）
时间（天）
10
1
0.1
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15

图13A

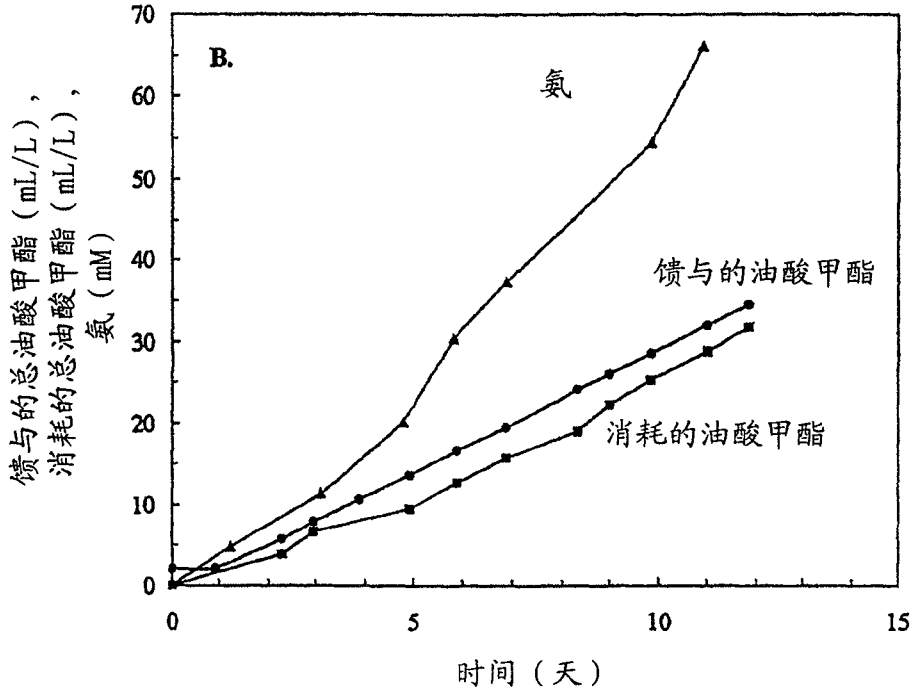

B.
氨
馈与的油酸甲酯
消耗的油酸甲酯
馈与的总油酸甲酯（mL/L），
消耗的总油酸甲酯（mL/L），
氨（mM）
时间（天）
0
10
20
30
40
50
60
70
0
5
10
15

图13B