



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117070482 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 17

(21) 申请号 202311218367.6

C12N 15/70 (2006.01)

(22) 申请日 2023.09.19

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 33/02 (2006.01)

(71) 申请人 黄冈人福药业有限责任公司

C12R 1/19 (2006.01)

地址 438000 湖北省黄冈市黄州区火车站
经济开发区知青路一号

(72) 发明人 刘明欣 艾勇泉 陈海林 何鑫
汪声晨 赵静 汪洋 刘林
金海程 王晓宇 应娟 刘诚
王瑞康

(74) 专利代理机构 武汉天领众智专利代理事务
所(普通合伙) 42300
专利代理师 严志加

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

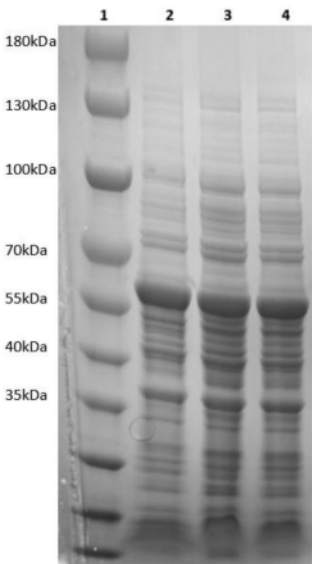
权利要求书1页 说明书7页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体、编码基因、载体
及应用

(57) 摘要

本发明提出了基于野生型3-甾酮-1,2-脱氢酶改造后的突变体,氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,相比野生型具有更好的催化活性,用于6-亚甲基雄烯二酮脱氢转化为依西美坦具有显著的经济价值;本发明还利用3-甾酮-1,2-脱氢酶制备依西美坦,通过优化反应体系,可使反应底物浓度能够达到75~100g/L,在转化20h后转化率能够达到98%以上且产物单一无其他杂质产生,克服现有技术脱氢过程收率低,周期长、转化率低的缺陷,具有良好的生产效益。



1. 氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体。
2. 编码权利要求1所述突变体的基因。
3. 表达载体,其特征在于,含有权利要求2所述的基因。
4. 一种菌株,其特征在于,包含有权利要求3所述的表达载体。
5. 根据权利要求4所述的菌株,其特征在于,所述菌株为大肠杆菌。
6. 3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体的生产方法,其特征在于,包括基于权利要求4所述菌株生成的酶突变体库中筛选突变体的步骤。
7. 权利要求1所述3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体在6-亚甲基雄烯-4-烯-3,17-二酮脱氢制备依西美坦中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述制备过程为,向6-亚甲基雄烯-4-烯-3,17-二酮中加入电子受体、乳化剂及3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体,调整pH后,在含氧条件下恒温搅拌反应后经后处理得到依西美坦。
9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述电子受体为甲萘醌;反应条件采用氧气保护或者向溶液通气;反应体系pH为7.5,温度为35℃,使用PEG 200、PEG 300、PEG 400或PEG 600作为乳化剂。
10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体的用量与底物质量之比为400u/g;
和/或,所述电子受体的用量为1wt %;
和/或,所述乳化剂为PEG 300。

3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体、编码基因、载体及应用

技术领域

[0001] 本发明属于甾体药物制备技术领域,具体涉及3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体、编码基因、载体及应用。

背景技术

[0002] 现有制备依西美坦的工艺,多为从雄烯二酮为起始原料,经过引入 $\Delta 1,2$ -双键以及C6-亚甲基得到最终成品,或者以雄烯二酮为原料,先引入C6-亚甲基,再通过化学法或者细胞发酵的方法引入 $\Delta 1,2$ -双键合成依西美坦成品,在现有依西美坦的合成工艺中,引入 $\Delta 1,2$ -双键的方法有化学法和生物法。

[0003] 化学法多为使用DDQ(二氯二氧基苯醌)脱氢,强酸试剂催化的DDQ氧化,溴化脱氢,IBX(2-碘酰苯甲酸)脱氢及钨催化脱氢等,但是使用DDQ脱氢的方法收率较低且DDQ价格昂贵;采用溴化脱氢的方法对环境污染较大,且对生产设备要求较高,不适宜大规模生产;采用IBX及钨催化脱氢的方法成本较高且有机试剂用量大,对环境污染大。

[0004] 生物法实现 $\Delta 1,2$ 脱氢的方法多为利用分枝杆菌和简单节杆菌,通过细胞发酵的方法将底物6-亚甲基雄烯二酮转化为依西美坦,细胞发酵的方法虽然环境友好,反应条件温和,但是由于底物6-亚甲基雄烯二酮水溶性极差,导致利用细胞发酵进行脱氢反应的底物投料浓度低,最终收率较低,且转化周期长,转化率较低。

发明内容

[0005] 本发明提出3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体,可用于6-亚甲基雄烯二酮转化依西美坦,克服现有技术脱氢过程收率低,周期长、转化率低的缺陷。

[0006] 基于此,本发明的技术方案如下:

[0007] 本发明的第一个方面,提出氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体。

[0008] 本发明的第二个方面,提出编码以上所述3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体的基因。

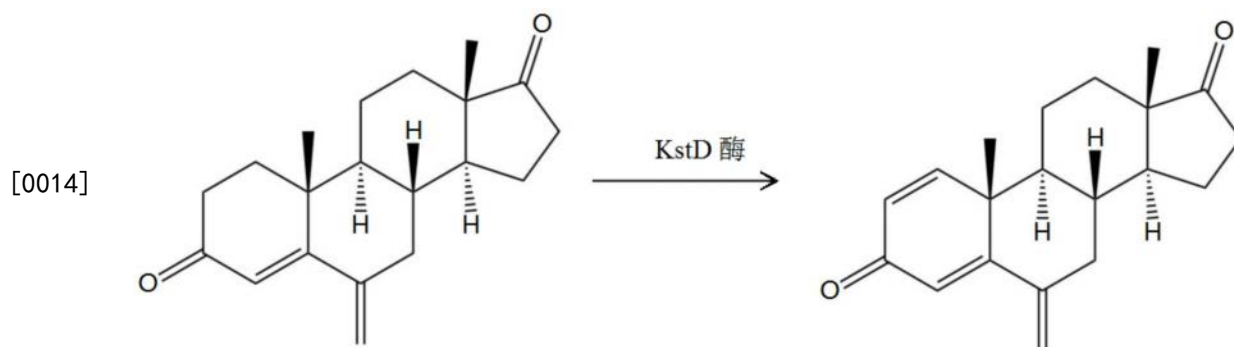
[0009] 本发明的第三个方面,提出一种表达载体,含有以上第二方面所述的基因。

[0010] 本发明的第四个方面,提出一种菌株,含有以上第三方面所述的表达载体。

[0011] 可选地,所述菌株为大肠杆菌。

[0012] 本发明的第五个方面,提出3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体的生产方法,包括基于第四个方面所述菌株生成的酶突变体库中筛选突变体的步骤。

[0013] 本发明的第六个方面,提出第一个方面所述3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体在6-亚甲基雄烯-4-烯-3,17-二酮脱氢制备依西美坦中的应用,该制备过程反应路线如下:



[0015] 具体地,所述制备过程为:向6-亚甲基雄烯-4-烯-3,17-二酮中加入电子受体、乳化剂及3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体,调整pH后,在含氧条件下恒温搅拌反应后经后处理得到依西美坦。

[0016] 可选地,所述电子受体为甲萘醌;反应条件采用氧气保护或者向溶液通气;反应体系pH为7.5,温度为35℃,使用PEG 200、PEG 300、PEG 400或PEG 600作为乳化剂。

[0017] 可选地,所述3-甾酮-1,2-脱氢酶突变体的用量与底物质量之比为400u/g。

[0018] 可选地,所述甲萘醌的用量为1wt%;

[0019] 可选地,所述乳化剂为PEG 300。

[0020] 上述制备过程中,反应底物浓度能够达到75~100g/L,在转化20h后转化率能够达到98%以上且产物单一无其他杂质产生。

[0021] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0022] 1.本发明提出基于野生型3-甾酮-1,2-脱氢酶改造后的突变体,相比野生型具有更好的催化活性,用于6-亚甲基雄烯二酮脱氢转化为依西美坦具有显著的经济价值。

[0023] 2.本发明利用3-甾酮-1,2-脱氢酶制备依西美坦时,优化了反应体系,可使反应底物浓度能够达到75~100g/L,在转化20h后转化率能够达到98%以上且产物单一无其他杂质产生,克服现有技术脱氢过程收率低,周期长、转化率低的缺陷,具有良好的生产效益。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0025] 图1为本发明实施例1中野生型KstD酶和KstD-M55突变体高密度发酵表达SDS-PAGE结果;其中:目的蛋白大小为58kDa;泳道1为蛋白标准品Marker;泳道2:野生型KstD酶;泳道3:KstD-M₅₅高密度发酵总蛋白;泳道4:KstD-M₅₅高密度发酵上清蛋白。

[0026] 图2为本发明实施例2中野生型KstD酶催化6-亚甲基雄烯二酮反应液TLC结果。其中:1:底物6-亚甲基雄烯二酮标品;2:产物依西美坦标品;3:反应液。

[0027] 图3为本发明实施例2中野生型KstD酶催化6-亚甲基雄烯二酮反应液液相结果。

[0028] 图4为本发明实施例4中KstD-M55酶酶活测定结果。

[0029] 图5为本发明实施例5中KstD-M55酶催化底物6-亚甲基雄烯二酮生成依西美坦成品液相结果。

[0030] 图6为本发明实施例7中反应体系放大至30L成品依西美坦液相结果。

具体实施方式

[0031] 下面将结合本发明实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 在一个实施例中,提供来源于*Mycolicibacterium neoaurum*的野生型3-甾酮-1,2-脱氢酶(KstD)基因,野生型的KstD酶氨基酸序列见SEQ ID NO:1,根据野生型KstD酶的氨基酸序列进行大肠杆菌表达宿主密码子优化,优化后的基因序列见SEQ ID NO:2。

[0033] 在另一个实施例中,对野生型的KstD酶进行同源模建,分析对接,分析酶催化机理,对该酶进行理性设计并对相关氨基酸进行突变,建立突变库,在对突变库筛选过程中发现了一个活性提高的突变体KstD-M₅₅,突变体氨基酸序列见SEQ ID NO:3,在相同条件下,突变体KstD-M₅₅对底物6-亚甲基雄烯二酮的催化活性是野生型的12.6倍。

[0034] 在一个实施例中,对KstD酶催化6-亚甲基雄烯二酮反应体系进行了优化,分别考察了不同的pH、反应温度、乳化剂类型、电子受体类型和添加量、反应条件对转化的影响,得出最优的反应体系为:反应体系最适pH为7.5,最适温度为35℃,乳化剂选用PEG 200,PEG 300,PEG 400,PEG 600,最优PEG 300,电子受体选用甲萘醌,用量为0.01wt%,反应条件采用氧气保护或者溶液通气,具体采用哪种措施根据反应体系确定,小体系采用圆底烧瓶,纯氧保护,体系放大后采用反应釜底部通气的方式。

[0035] 在上述实施例中,利用KstD-M55酶催化底物6-亚甲基雄烯二酮脱氢反应生成依西美坦,在进行反应体系优化后,反应底物浓度能够达到75~100g/L,在转化20h后转化率能够达到98%以上且产物单一无其他杂质产生。

[0036] 实施例1野生型KstD酶的克隆及表达

[0037] 根据野生型KstD酶的氨基酸,对其进行大肠杆菌表达系统的密码子优化,将优化后的KstD酶核苷酸序列进行全合成,将目的基因构入表达载体pET26b(+)中,将构建好的表达载体转化到表达菌株BL21(DE3)的感受态细胞中,挑取正确的单菌落接菌于5mL含有50μg/mL的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,第二天按照1%的转接量转接到50mL含有卡那霉素的LB液体培养基中,37℃振荡培养2.5-3h,取样测定菌液的OD₆₀₀约为0.6-0.8后,添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.1mM,20℃震荡培养18h后,5000r/min离心5min收集菌体,收集的菌体用20mL pH为7的PBS缓冲液重悬混匀,重悬液用超声破碎20min,12000r/min离心10min收集上清酶液,对收集的酶液进行SDS-PAGE蛋白电泳分析,结果如图1所示(泳道2,泳道1为蛋白标准品Marker)。

[0038] 实施例2野生型KstD酶活性验证

[0039] 收集上述上清酶液,投入到下述反应体系中:

[0040] 表1:KstD酶催化体系

	体系	添加量
[0041]	6-亚甲基雄烯二酮	200mg
	KstD 酶液	10mL
	甲萘醌	2mg
	吐温 80	1mL
	PBS	up to 20mL

[0042] 注:甲萘醌为反应过程中的电子受体;PBS溶液成分为:6.63g/L K_2HPO_4 , 1.42g/L KH_2PO_4 ;吐温80的为体系乳化剂。

[0043] 将上述成分置于100mL圆底烧瓶中,添加磁力搅拌子,将反应置于35℃水浴锅中,搅拌过夜反应。第二天取样进行TLC分析及液相送检,TLC结果见附图2,液相结果见附图3,野生型KstD酶转化率为97%。

[0044] 实施例3基于KstD酶结构的活性改造

[0045] 根据野生型KstD酶的氨基酸序列进行蛋白结构预测及分子对接,根据分子对接的结果进行理性设计,对包括,V233,T236,L306,V331,L474,Y387等氨基酸位点进行定向突变及饱和突变,引物序列见表2。

[0046] 表2:KstD突变体突变引物及序列

	引物名称	SEQ ID NO:	引物序列
[0047]	V232N-up	4	TGGACCGACTCTCCGNNNGCAGAACTGACTTA
	V232N-dn	5	TAAGTCAGTTCTGCNNNCGGAGAGTCGGTCCA
	T236N-up	6	CCGGTGGCAGAACTGNNNTACGATGGTGAGCG
	T236N-dn	7	CGCTCACCATCGTANNNCAGTTCTGCCACCGG
	L306N-up	8	GTCTGGCACAGAATNNNGGTGCGGGTATCGGC
	L306N-dn	9	GCCGATACCCGCACCNNNATTCTGTGCCAGAC
	V331T-up	10	CGGGTGGTGACCCTGTA ACTATGCTGGCGGAA
	V331T-dn	11	TTCCGCCAGCATAGTTACAGGGTCACCACCCG
	Y387N-up	12	TGTTGACCGAGCGCNNNCGTA ACTCCTATCTG
	Y387N-dn	13	CAGATAGGAGTTACGNNNGCGCTGGTCGAACA

[0049] 利用突变引物对目的基因进行定点饱和突变,将KstD突变库基因构建到pET28a(+)表达载体中,将表达载体转化到表达菌株BL21(DE3)感受态细胞中,将转化液均匀的涂到含有50μg/mL卡那霉素的LB固体平板上,37℃恒温培养18h,生长出来的单菌落即为KstD酶突变体库。

[0050] 实施例4KstD酶突变库的筛选

[0051] 将上述不同突变体单菌落以及野生型KstD单菌落接种到1.5mL含有50μg/mL卡那

霉素的LB液体培养基的细胞培养板中,37℃震荡培养18h,按照1%的转接量将菌液转接到同样的细胞培养板中,37℃震荡培养2~3h,添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.1mM,降温至20℃震荡培养20h,第二天将细胞培养板于离心机中以5000r/min离心5min,弃上清收集细胞,提前配置好溶菌酶溶液(称取20mg溶菌酶溶解于20mL pH 7.5的磷酸盐缓冲液中),添加溶菌酶溶液300μL于收集到的细胞中,吹吸混匀,置于20℃震荡20min裂解细胞,裂解完后于8000r/min离心收集上清液,将收集到的上清酶液进行酶标仪酶活测定,测定方法如下:

[0052] ①将收集到的酶液用PBS溶液稀释10倍;

[0053] ②将稀释的酶液加入到以下体系中:

[0054] 表3:KstD酶活测定体系

	体系	添加量
	6-亚甲基雄烯二酮 (1mg/mL 溶解于 DMSO 中)	30μL
[0055]	KstD 酶液	10μL
	PMS (吩嗪硫酸甲酯, 1mM)	30μL
	DCPIP (二氯酚靛酚, 1mM)	30μL
	PBS (pH 7.5, 含 10%甘油)	100μL

[0056] 设置酶标仪孵育温度35℃,根据测定反应体系中600nm处吸光度的变化绘制趋势线,计算趋势线斜率为K,如图4所示。

[0057] ③DCPIP标曲的测定:配置1mM的DCPIP溶液,分别用PBS稀释成0.05mM,0.1mM,0.2mM,0.3mM,0.5mM,0.8mM测定600nm处的吸光度,根据吸光度绘制DCPIP标曲,标曲斜率为 K_1 ;

[0058] ④根据计算公式,比酶活= $\frac{\text{稀释倍数} \times \text{反应体积} \times K}{K_1 \times \text{酶液体积} \times \text{酶液蛋白浓度}}$ 计算酶液的比酶活,单位

U/mg,将不同突变体的比酶活与野生型的比酶活作比较,比酶活有提升的即为疑似正突变体,对疑似的正突变体进行进一步的验证,并将突变体送序列测定确定突变类型。

[0059] 通过上述筛选方法,对已构建的突变库进行筛选,筛选到活性提高的突变株,将突变株的测序结果与野生型对比发现,突变体类型为KstD-M₁₂(V232F),KstD-M₁₉(T236I),KstD-M₂₂(V331T),KstD-M₄₂(A232F+T236I),KstD-M₅₅(A233F+T236I+V331T);对不同突变体酶活进行酶活测定,结果如下:

[0060] 表4:不同KstD酶突变体酶活测定结果

	突变型	比酶活	相对活力
	WT (野生型)	6u/mg	100%
	KstD-M12	12u/mg	200%
[0061]	KstD-M19	25u/mg	416%
	KstD-M22	28u/mg	466%
	KstD-M42	46u/mg	766%
	KstD-M55	76u/mg	1266%

[0062] 通过对不同突变体的酶活测定结果分析,突变体KstD-M₅₅的催化活性是野生型的12.6倍。

[0063] 实施例5大肠杆菌高密度表达KstD-M₅₅酶

[0064] 将KstD-M55菌株接菌于含有50μg/mL的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,第二天按照1%的转接量转接到含有大肠杆菌高密度发酵培养基的5L发酵罐中,高密度发酵培养基成分为:1%甘油,1%酵母浸粉,0.5%蛋白胨,0.6% (NH₄)₂HPO₄,1% KH₂PO₄,0.17%柠檬酸,1%微量元素溶液(含有Fe²⁺,Mn²⁺,Zn²⁺,MoO₄⁻等微量元素),将上述培养基成分溶于去离子水后115℃灭菌20min。转接后开始发酵,控制培养温度为37℃,氨水调整培养基pH维持7.0左右,体系通气量4~6L/min,转速与溶氧联动,控制溶氧>30%,溶氧反弹后开始补料,补料培养基成分为50%甘油,2.5%蛋白胨,5%酵母浸粉,全程维持溶氧为30%左右,培养8~10h后测量OD₆₀₀,当OD在30左右后进行梯度降温,30~60min内将温度将为20℃,然后添加IPTG使终浓度为0.3mM开始诱导表达,诱导15h后测量OD₆₀₀到达60~80时停止发酵,离心收集菌体,将菌体用1.5L pH为7.5的PBS缓冲液重悬,将重悬液用高压均质机破碎,离心收集上清酶液,利用酶活测定方法测定上清酶液的酶活为75.5u/mg。上述过程KstD-M₅₅酶高密度发酵总蛋白,以及高密度发酵上清蛋白SDS-PAGE蛋白电泳分析,结果如图1所示(对应泳道3、4)。

[0065] 实施例6KstD-M55酶催化6-亚甲基雄烯二酮脱氢反应

[0066] 按照如下体系投入到酶催化反应中:称取30g 6-亚甲基雄烯二酮、0.3g甲萘醌、15mL PEG 300至500mL圆底烧瓶中,按照400u/g底物的投酶量向体系中加入共12000u,即157.8mg的酶,用PBS溶液将体系补齐到300mL,用2M NaOH溶液调整体系的pH为7.5左右,将体系置于35℃恒温磁力搅拌水浴锅中,在氧气保护下搅拌反应20h,反应结束后向反应液中添加6g硅藻土助滤,搅拌1h后过滤收集固体物料,将收集到的物料粗品烘干至恒重,添加120mL甲醇溶液,搅拌升温至60℃,保温1h至物料完全溶解,并且使物料中残留的蛋白变性,然后过滤收集滤液,除掉变性的蛋白和其他杂质,将收集到的滤液减压浓缩至1V至大量固体析出,降温至室温,搅拌下添加300mL水水析,过滤收集依西美坦物料,60℃烘干,将成品液相送检,结果如图5所示,产物纯度为99.7%,收率为85%。

[0067] 实施例7KstD-M₅₅酶催化6-亚甲基雄烯二酮体系放大实验

[0068] 按照如下体系投入到酶催化反应中:称取3kg 6-亚甲基雄烯二酮、30g甲萘醌、300mL PEG 300至50L反应釜中,按照400u/g底物的投酶量向体系中加入共1200000u,即15.78g的酶,用PBS溶液将体系补齐到30L,用6M NaOH溶液调整体系的pH为7.5左右,反应釜内采用底部通气的策略,通气量为0.5m³/h,添加3mL消泡剂,控制反应温度为35℃,搅拌转

化20h后取样进行TLC和液相分析。反应结束后向体系中添加300g硅藻土,搅拌1h后过滤收集固体物料,将收集到的物料粗品烘干至恒重,将物料投入反应釜中添加12L甲醇溶液,搅拌升温至60℃,保温1h至物料完全溶解,并且使物料中残留的蛋白变性,然后过滤收集滤液,除掉变性的蛋白和其他杂质,将收集到的滤液减压浓缩至1V至大量固体析出,降温至室温,搅拌下添加30L水水析,过滤收集依西美坦物料,60℃烘干,将成品液相送检,结果如图6所示,成品纯度为99.7%,收率为87.5%。

[0069] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

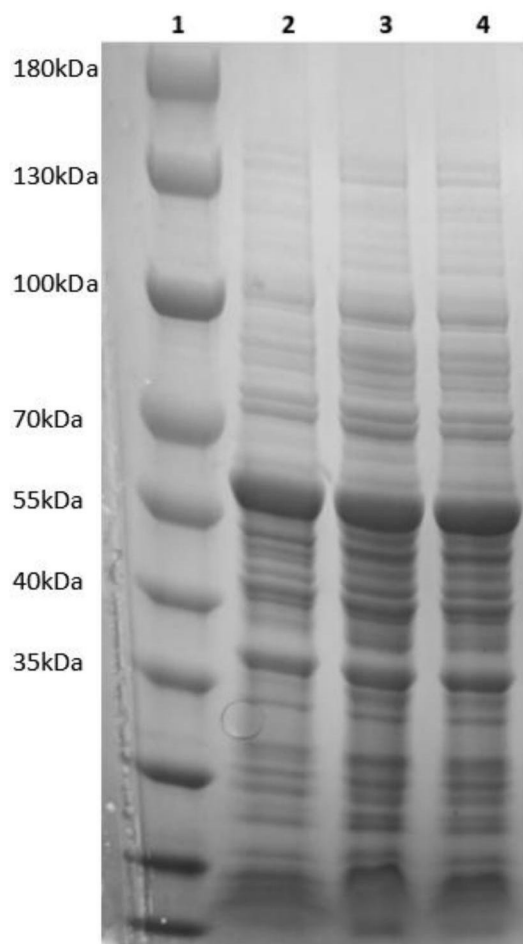


图1

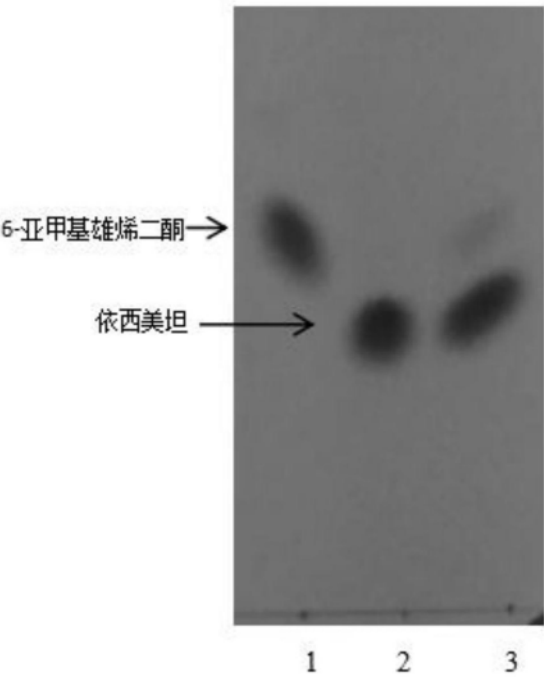


图2

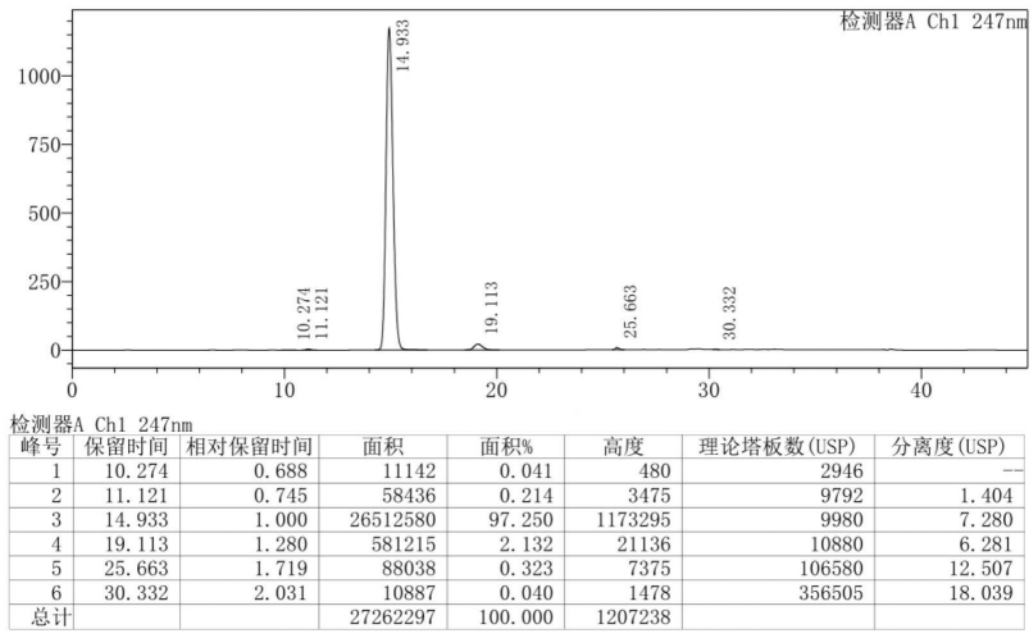


图3

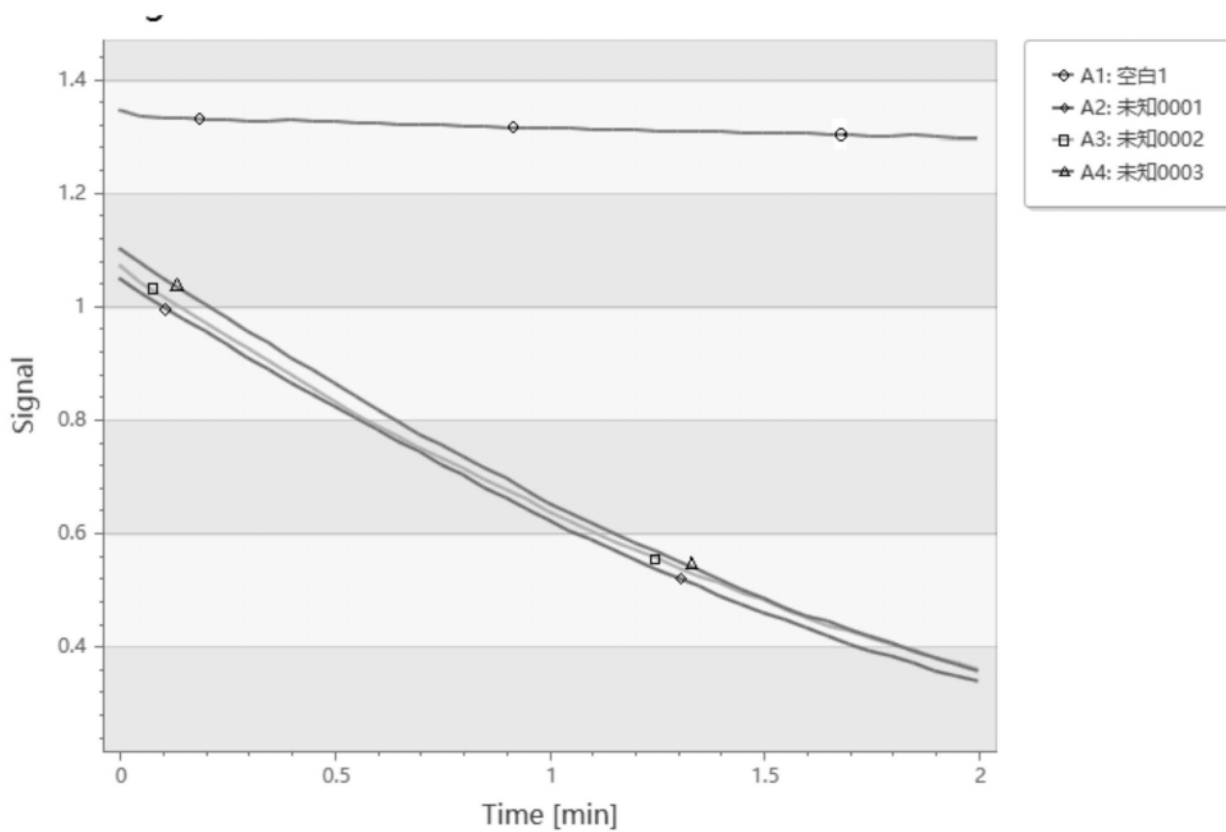


图4

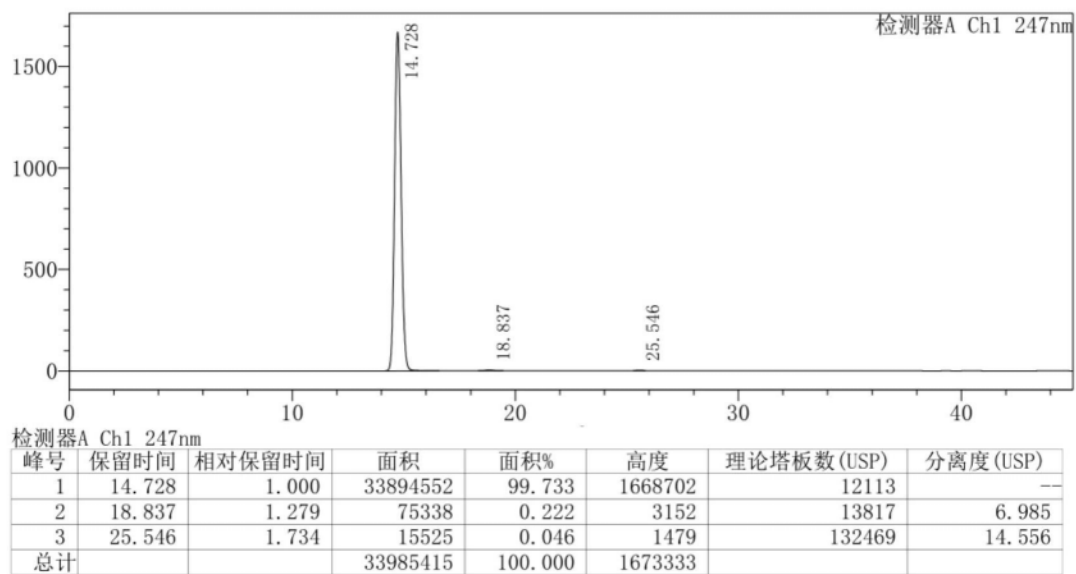


图5

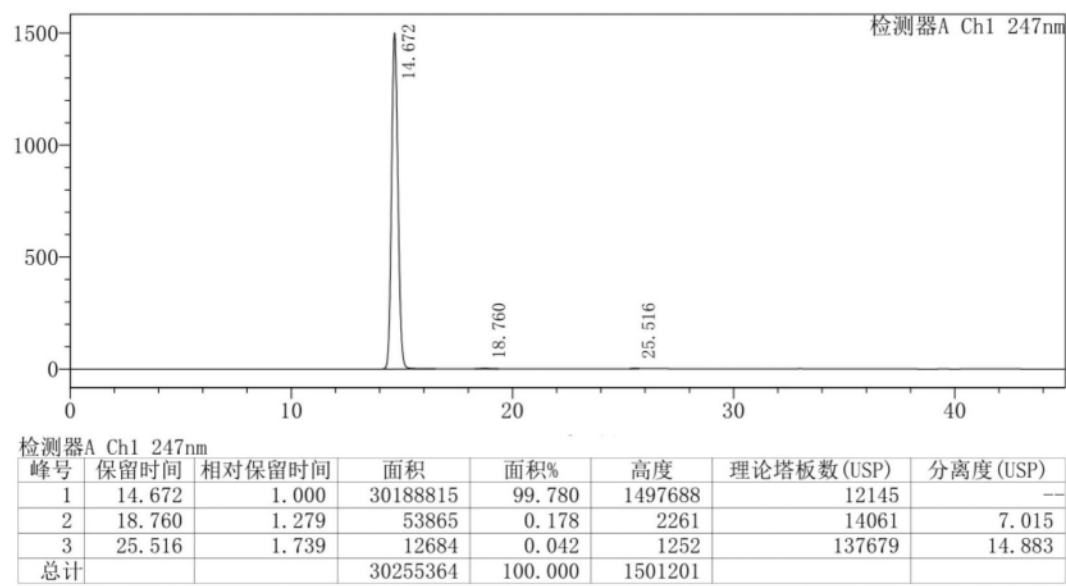


图6