



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117448288 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 26

(21) 申请号 202311366940.8

C12P 33/06 (2006.01)

(22) 申请日 2023.10.20

C12R 1/19 (2006.01)

(71) 申请人 湖北葛店人福药业有限责任公司

地址 436032 湖北省鄂州市葛店经济技术
开发区聚贤路25号

(72) 发明人 何鑫 刘明欣 汪声晨 王婷

刘林 陈海林 赵静 蔡啸

吴雪微 肖翠

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 黄益澍

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页
序列表 (电子公布)

(54) 发明名称

3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备雌酚酮
中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备雌酚酮中的应用。所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本发明还公开了一种核酸、重组表达载体、转化体、制备所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法、雌酚酮的制备方法和所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、核酸、重组表达载体或转化体在制备雌酚酮中的应用。本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶在制备雌酚酮中,具有生产流程简单、投料浓度高、转化率高、收率高、产物纯度高、成本合理和环境友好的优点,有着潜在的利用价值。

1. 一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 一种分离的核酸,其特征在于,所述核酸编码如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶;

较佳地,所述核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 一种重组表达载体,其特征在于,所述重组表达载体包含如权利要求2所述的核酸;

较佳地,所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b或pET28a。

4. 一种转化体,其特征在于,所述转化体包含如权利要求2所述的核酸或如权利要求3所述的重组表达载体;

较佳地,所述转化体的底盘菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*),例如为大肠杆菌BL21 (DE3)。

5. 一种制备3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法,其特征在于,所述方法包括将如权利要求4所述的转化体在适合的培养基中生长并表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的步骤;

较佳地,所述方法包括:

(1) 将包含所述转化体的种子液接种于培养基中进行培养;

(2) 添加诱导剂,震荡培养;

(3) 对经步骤(2)所得的菌体进行破碎,收集上清液;

更佳地,所述方法包括以下一种或多种条件:

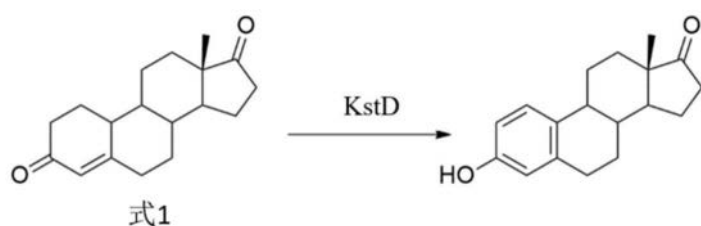
(1) 中,所述培养的温度为30-37℃,所述种子液的接种量为1-5%例如为1%,和/或所述培养基为LB培养基;

(2) 中,所述诱导剂为异丙基- β -D-硫代半乳糖苷,所述震荡培养的温度为20-25℃,和/或所述震荡培养的时间为16-22h;

(3) 中,所述破碎为超声破碎,和/或所述破碎的时间为15-30min。

6. 一种雌酚酮的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括将如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶或如权利要求5所述的方法制备的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶与底物接触进行反应的步骤;

所述底物为如式1所示的19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱);



7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为液态酶、固态酶、固定化酶、湿菌体或菌粉;

较佳地,所述液态酶为粗酶液,所述固态酶为酶粉。

8. 如权利要求6或7所述的制备方法,其特征在于,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为酶粉,反应体系中所述酶粉与所述底物的质量比为(0.01-1):1,较佳地为(0.05-0.5):1,更佳地为0.1:1;

和/或,所述底物的终浓度为10-150g/L,较佳地为100-150g/L;

和/或,所述酶粉的添加量为1-15g/L,较佳地为10-15g/L。

9.如权利要求6-8任一项所述的制备方法,其特征在于,所述反应的pH为7-8,较佳地为7.5-8;

所述反应的温度为25-35℃,较佳地为30-35℃;

和/或,反应时间为12-24h,较佳地为18h-24h;

和/或,所述制备方法包括加入电子受体,例如甲萘醌;

和/或,所述制备方法包括加入助溶剂,所述助溶剂选自DMSO、Triton-X100、吐温80和PEG-200中的一种或多种,优选为PEG-200或吐温80;

和/或,所述制备方法包括向反应体系中通氧的步骤,优选反应体系处于纯氧气氛;

和/或,所述反应结束后,还包括萃取的步骤。

10.一种如权利要求1所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如权利要求2所述的核酸、如权利要求3所述的重组表达载体、如权利要求4所述的转化体在制备雌酚酮中的应用。

3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备雌酚酮中的应用

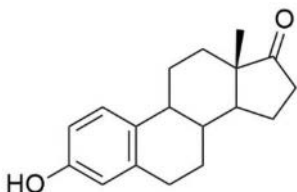
技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体涉及一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备雌酚酮中的应用。

背景技术

[0002] 雌酚酮,又称作雌酮,英文名称为Estrone。化学名称为3-羟基雌甾-1,3,5(10)-三烯-17-酮,分子式为 $C_{18}H_{22}O_2$,分子量270.37,CAS号53-16-7。结构式如下:

[0003]



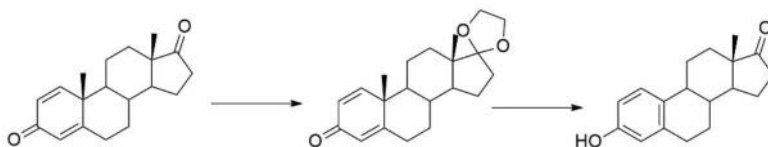
[0004] 雌酚酮是一种甾体激素化合物,为天然内源性雌激素,能够维持雌性个体的第二生理特征及正常的内分泌系统。通常存在于妊娠动物的卵巢或其卵泡液、人的胎盘和母马的尿中。

[0005] 雌酚酮可用于合成一系列雌性激素,如雌二醇、雌三醇等,这些雌激素可以用于治疗女性性功能疾病、骨质疏松和更年期综合征。

[0006] 目前合成雌酚酮的途径有以下几种:

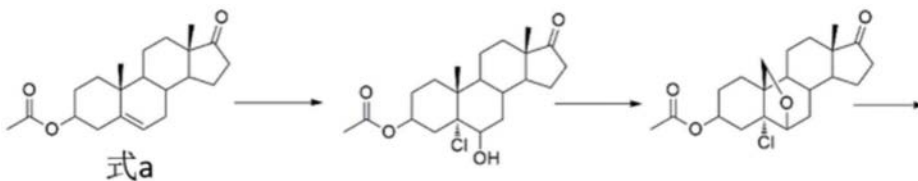
[0007] 1.以1,4-雄烯二酮(ADD)为起始产物,如专利CN201510316931.7所述。

[0008]

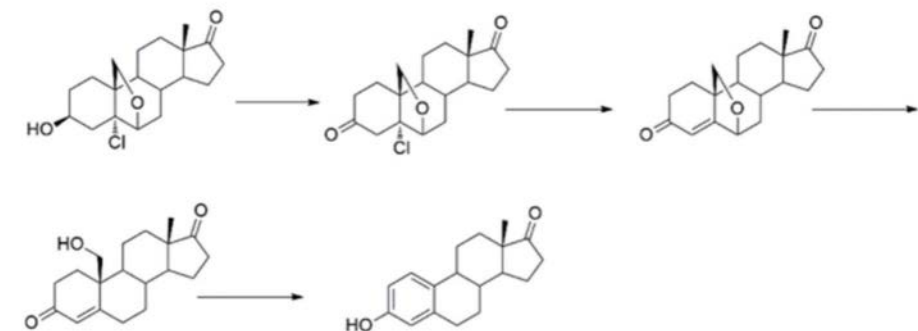


[0009] 反应过程需要用到二苯甲烷、联苯和金属锂等物质,溶剂毒性大,价格偏高。

[0010] 2.以如式a所示的双烯为起始底物,如CN110746477B所述。

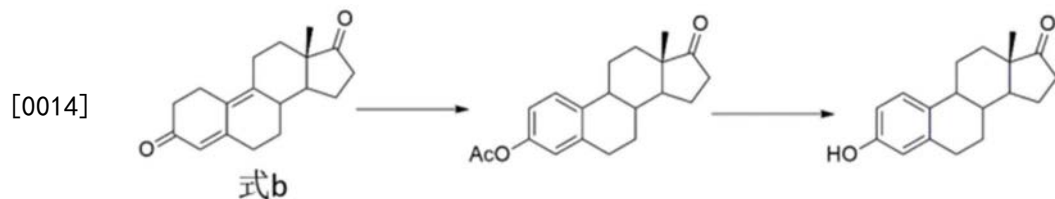


[0011]



[0012] 本方法合成路线长,收率低,又因为双烯价格偏高,导致其整体路线的成本偏高。

[0013] 3.以如式b所示的4,9-物为起始物,如专利CN114315942A所述。



[0015] 本方法需要用到较多的乙酰溴,导致其成本偏高、三废较多,对生产设备也不友好。

[0016] 目前亟需转化率高、产物纯度高、生产流程简易、成本合理、环境友好的雌酚酮制备方法。

发明内容

[0017] 为了解决现有技术中缺乏转化率高且成本合理、环境友好的雌酚酮生产方法的问题,本发明提供一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶及其在制备雌酚酮中的应用。本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶(3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase,KstD)在制备雌酚酮中具有生产流程简单、投料浓度高、转化率高、收率高、产物纯度高、成本合理和环境友好的优点。

[0018] 本发明通过以下技术方案解决上述技术问题:

[0019] 本发明第一方面提供一种3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0020] 本发明第二方面提供一种分离的核酸,所述核酸编码如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶。

[0021] 本发明一些具体的实施方案中,所述核酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0022] 本发明第三方面提供一种重组表达载体,所述重组表达载体包含如第二方面所述的核酸。

[0023] 本发明一些实施方案中,所述重组表达载体的骨架质粒为pET26b或pET28a。

[0024] 本发明第四方面提供一种转化体,所述转化体包含如第二方面所述的核酸或如第三方面所述的重组表达载体。

[0025] 本发明一些实施方案中,所述转化体的底盘菌为大肠杆菌(*Escherichia coli*),例如为大肠杆菌BL21(DE3)。

[0026] 本发明第五方面提供一种制备3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的方法,所述方法包括将如第四方面所述的转化体在适合的培养基中生长并表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的步骤。

[0027] 本发明一些较佳的实施方案中,所述方法包括:

[0028] (1) 将包含所述转化体的种子液接种于培养基中进行培养;

[0029] (2) 添加诱导剂,震荡培养;

[0030] (3) 对经步骤(2)所得的菌体进行破碎,收集上清液;

[0031] 本发明一些更佳的实施方案中,所述方法包括一下一种或多种条件:

[0032] (1) 中,所述培养的温度为30-37℃,例如为31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃或37℃,所述种子液的接种量为1-5%,例如为1%、2%、3%、4%或5%,和/或所述培养基为LB培

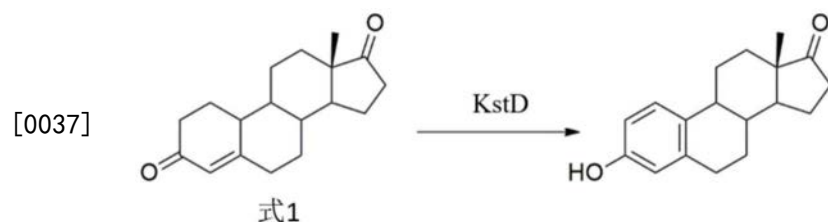
培养基;

[0033] (2) 中,所述震荡培养的温度为20℃-25℃,例如为20℃、21℃、22℃、23℃、24℃或25℃,和/或所述震荡培养的时间为16-22h,例如为16h、17h、18h、19h、20h、21h或22h;

[0034] (3) 中,所述破碎为超声破碎,和/或所述破碎的时间为15-30min,例如为15min、20min、25min或30min。

[0035] 本发明第六方面提供一种雌酚酮的制备方法,所述制备方法包括将如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶或如第五方面所述的方法制备的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶与底物接触进行反应的步骤;

[0036] 所述底物为如式1所示的19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱);



[0038] 本发明一些实施方案中,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为液态酶、固态酶、固定化酶、湿菌体或菌粉。

[0039] 本发明相关实施方案中,固定化酶指的是将上述液体酶中的酶组分固定在固定化载体上而得。固定化载体为树脂,优选地为环氧树脂、氨基树脂或吸附树脂。湿菌体指的是表达了所述酶的菌体的发酵培养液经离心后所得到的沉淀物。菌粉指的是对上述湿菌体经干燥以脱掉溶剂水并且经粉碎后得到的粉状物。

[0040] 本发明一些实施方案中,所述液态酶为粗酶液,所述固态酶为酶粉。

[0041] 本发明相关实施方案中,所述粗酶液是采用溶剂(例如水或缓冲液)对湿菌体进行重悬和均质后得到的均质酶液。酶粉指的是将上述液态酶经干燥和粉碎后得到的粉末物,所述干燥例如冷冻干燥。

[0042] 本发明中,所述粗酶液的一个制备示例为将表达所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的菌体使用缓冲液按1:4(g/mL)进行重悬,超声破碎15-20min,12000-13000r/min离心10-15min后,取上清液即得。所述缓冲液为磷酸盐缓冲液,pH为7-7.5。

[0043] 本发明中,所述酶粉的一个制备示例为将上述粗酶液进行冻干处理即得。

[0044] 本发明一些实施方案中,所述3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶的使用形式为酶粉,反应体系中所述酶粉与所述底物的质量比为(0.01-1):1,较佳地为(0.05-0.5):1,更佳地为0.1:1。

[0045] 本发明一些实施方案中,所述底物的终浓度为10-150g/L,较佳地为100-150g/L,例如为100g/L、110g/L、120g/L、130g/L、140g/L或150g/L。

[0046] 本发明一些实施方案中,所述酶粉的添加量为1-15g/L,较佳地为10-15g/L,例如为1g/L、3g/L、5g/L、7g/L、9g/L、10g/L或15g/L。

[0047] 本发明一些实施方案中,所述反应的pH为7-8,较佳地为7.5-8,例如为7、7.5或8。

[0048] 本发明一些实施方案中,所述反应的温度为25-35℃,较佳地为30-35℃,例如为25℃、30℃或35℃。

[0049] 本发明一些实施方案中,反应时间为12-24h,较佳地为18h-24h,例如为12h、14h、16h、18h、20h、22h或24h。

- [0050] 本发明一些实施方案中,所述方法包括加入电子受体,例如甲萘醌。
- [0051] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括加入助溶剂,所述助溶剂选自DMSO、Triton-X100、吐温80和PEG-200中的一种或多种。
- [0052] 本发明一些优选实施方案中,所述助溶剂为PEG-200或吐温。
- [0053] 本发明一些实施方案中,所述制备方法包括向反应体系中通氧的步骤。
- [0054] 本发明一些优选实施方案中,反应体系处于纯氧气氛。
- [0055] 本发明一些实施方案中,所述反应结束后,还包括萃取的步骤。
- [0056] 本发明第七方面提供一种如第一方面所述的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶、如第二方面所述的核酸、如第三方面所述的重组表达载体、如第四方面所述的转化体在制备雌酚酮中的应用。
- [0057] 在符合本领域常识的基础上,上述各优选条件,可任意组合,即得本发明各较佳实例。
- [0058] 本发明所用试剂和原料均市售可得。
- [0059] 本发明的积极效果在于:本发明提供的3-甾酮- Δ^1 -脱氢酶在制备雌酚酮中,具有生产流程简单、投料浓度高(高至150g/L)、转化率高(高至99%)、收率高(高至91.7%)、产物纯度高(高至99%)、成本合理和环境友好的优点。

具体实施方式

[0060] 下面通过实施例的方式进一步说明本发明,但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。

[0061] 1. 试剂

[0062]	试剂	品牌
	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷	国药
	19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱)	自制
	PEG-200	国药
	吐温80	国药
	甲萘醌	国药
	PBS	自制
	甲醇	国药

[0063] 2. 雌酚酮的HPLC检测方法:

- [0064] 色谱柱:Y-RA-2019-03YMC-pack ODS-AC18(250mm \times 4.6mm,5 μ m);
- [0065] 样品浓度:0.8mg/mL;样品溶剂:甲醇;
- [0066] 流动相:60%乙腈;
- [0067] 检测波长:280nm;流速:1mL/min;进样量:20 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C;洗脱方式:等度洗脱。
- [0068] 底物出峰时间:16.6min
- [0069] 产物出峰时间:20.5min
- [0070] 实施例1粗酶液和酶粉的制备
- [0071] 将如SEQ ID NO:2所示的目的基因构入表达载体pET26b中,将构建好的表达载体

转化到大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)的感受态细胞中,挑取正确的单菌落接菌于5mL含有50 $\mu\text{g/mL}$ 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500mL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,取收集的湿菌体5g,用20mL pH为7的PBS缓冲液按1:4(g/mL)进行重悬混匀,得到重悬液用超声破碎20min,12000r/min离心10min收集上清酶液,即为粗酶液。将上清酶液冻干至酶粉。酶粉保存至-20℃冰箱备用。

[0072] 表1序列信息

[0073]

名称	氨基酸序列	核酸序列
3- 甾酮 - Δ^1 -脱氢酶	MTPQHISVDLLVVGSGTGLAA ALAANELGLSVLVVEKTSLVGGS LARSGGAFWMPGNSILTAAGSS DTQDYGRTYLDAVVDGDPIER AHAFVEHGPATIEMLCRTTPMKF QWAKGYSDYHPEAPGGS AVGRT CECRPFDTAVLGDALARLRPGV MESDFPMPVTGADYRWLHLMV RVPRKSWPRILLRAAQIGGLA MRRRYAAGGQALAAGLFAGVL DARIPVWTDAPVVDLLTEEGRV TGAIVARDGVKTQESARRGVVL AAGGFDNLMSWRHKFQSERLG EHLSLGGIGNTGDGIRLGQDLGA DTALMDQAWWFPAFAPLPGEPE TVMLAERSLPGCLLVIQTGQRFI NEATDYMTFGQILLRREQAGDP VEAMWMVFDQRYRNSYLMMA ELFPRMPIPQSWYDAGIAHRSDD LDGLAARIGASPQTLLATISRFND LARSGVDDDFGRGASAYDRYYG	atgaccacccccagcacatcagcgtggacctgctg gtggtgggcagcggcaccggcctggccgccgcc tggccgccaacgagctgggcctgagcgtgctggtg gtggagaagaccagcctggtggcgccgagcctgg ccaggagcggcgccgcttctggtgcccggcaac agcatcctgaccgccggcgagcagcgacaccc aggactacggcaggacctacctggacgccgtggtg gacggcgacgccccatcgagaggccccacgcct tcgtggagcacggccccgccaccatcgagatgctgt gcaggaccaccccatgaagtccagtgggccaag ggctacagcgactaccacccgaggccccggcg gcagcgccgtgggcaggacctgcgagtgcaggcc cttegacaccgccgtgctggcgacgccctggcca ggctgaggccccggcgtgatggagagcgactcccc atgcccgtgaccggcgccgactacaggtggctgca cctgatggtgaggggtgccaggaagagctggcca ggatcctgctgaggggccgcccaggcgatcgccgg cctggccatgaggaggaggtacgccgccggcggc caggccctggcgccggcctgttcgccggcgctgct ggacgccaggatccccgtgtggaccgacgcccc gtggtggacctgctgaccgaggaggcgagggtga

[0074]	<p>DPTVTPNPNLRPLEKGPYYAVQV VLSDLGTCGGLRADTRGRVLRE DGPPIEGLYAIGNTAANAFGKSY PGAGATIGQGFFVFGYIAARHAA GRLP (SEQ ID NO: 1)</p>	<p>ccggcgccatcgtggccaggacggcgtgaagac ccaggagagcgccaggagggcggtgctggcc gccggcggttcgacaacctgatgagctggaggca caagttccagagcgagaggctgggcgagcacctga gcctggcgggcatcggaacaccggcgacggcat caggctgggccaaggacctgggcgccgacaccgcc ctgatggaccaggcctgggtggttccccgccttcgcc ccctgcccggcgggcgagcccaccgtgatgctggc cgagaggagcctggcggtgctgctggtgatcc agaccggccagagggtcatcaacgaggccaccgac tacatgaccttcggccagatcctgctgaggaggag caggccggcgaccccgaggagccatgtgatggt gttcgaccagagggtacaggaacagctacctgatggc cgccgagctgttcccaggatgcccatccccaga gctggtacgacggcgcatcgccacaggagcga cgacctggacggcctggccgagcatcgccgcc agccccagaccctgctggccaccatcagcaggttc aacgacctggccaggagcggtggacgacgactt cggcagggcgccagcgctacgacaggtactac ggcgacccccaccgtgacccccaaacccaacctgag gcccctggagaaggccctactacgccgtgcagg tggtgctgagcgacctgggcacctgcggcgccctg agggccgacaccagggcgagggtgctgaggag gacggccccccatcgaggcgctgacgccatcgg caacaccgcccgaacgccttcggcaagagctacc ccggcgccggcgccaccatcgccaggcggttcgtg ttcggtacatcgccgagcagccgcccggcag gctgccc (SEQ ID NO: 2)</p>
--------	---	---

[0075] 实施例2

[0076] 50mL单口瓶中加入3g 19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱)、0.3g KstD酶粉、0.06g甲萘醌、0.09g PEG-200,用0.1M的PBS补充体积至30mL,随后用NaOH和HCl调节pH至7.5。在纯氧氛围下,30℃水浴锅反应18h,取反应液点板合格后直接过滤,将滤饼溶解至30mL甲醇,60℃回流1h,过滤除去变性蛋白质。随后将体系浓缩至9mL,加入30mL水,析出白色晶体物料,产物过滤后干燥,得到2.7g产物,转化率为99%,收率为90%,HPLC纯度为99%。

[0077] 实施例3

[0078] 500mL单口瓶中加入30g 19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱)、3g KstD酶粉、0.3g甲萘醌、0.6g PEG-200,用0.1M的PBS补充体积至300mL,随后用NaOH和HCl调节pH至7.5。在纯氧氛围下,30℃水浴锅反应18h,取反应液点板合格后直接过滤,将滤饼溶解至300mL甲醇,60℃回流1h,过滤除去变性蛋白质。随后将体系浓缩至90mL,加入300mL水,析出白色晶体物料,产物过滤后干燥,得到27.5g产物,转化率为99%,收率为91.7%,HPLC纯度为99%。

[0079] 实施例4

[0080] 500mL单口瓶中加入45g 19-去甲-4-雄烯二酮(酸脱)、4.5g KstD酶粉、0.45g甲萘醌、0.9g吐温80,用0.1M的PBS补充体积至300mL,随后用NaOH和HCl调节pH至8。在纯氧氛围下,35℃水浴锅反应24h,取反应液点板合格后直接过滤,将滤饼溶解至300mL甲醇,60℃回流1h,过滤除去变性蛋白质。随后将体系浓缩至90mL,加入300mL水,析出白色晶体物料,产物过滤后干燥,得到41.2g产物,转化率为99%,收率为91.6%,HPLC纯度为99%。