



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117645977 A

(43) 申请公布日 2024. 03. 05

(21) 申请号 202311368967.0

(22) 申请日 2023.10.20

(71) 申请人 黄冈人福药业有限责任公司

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 汪声晨 何鑫 刘明欣 刘林
杜晓东 陈海林 赵静 汪洋
应娟

(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 15/70 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 33/06 (2006.01)

C07J 1/00 (2006.01)

C07J 41/00 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

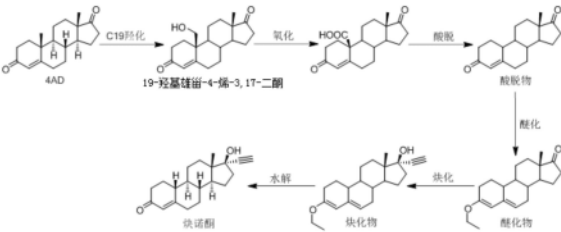
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

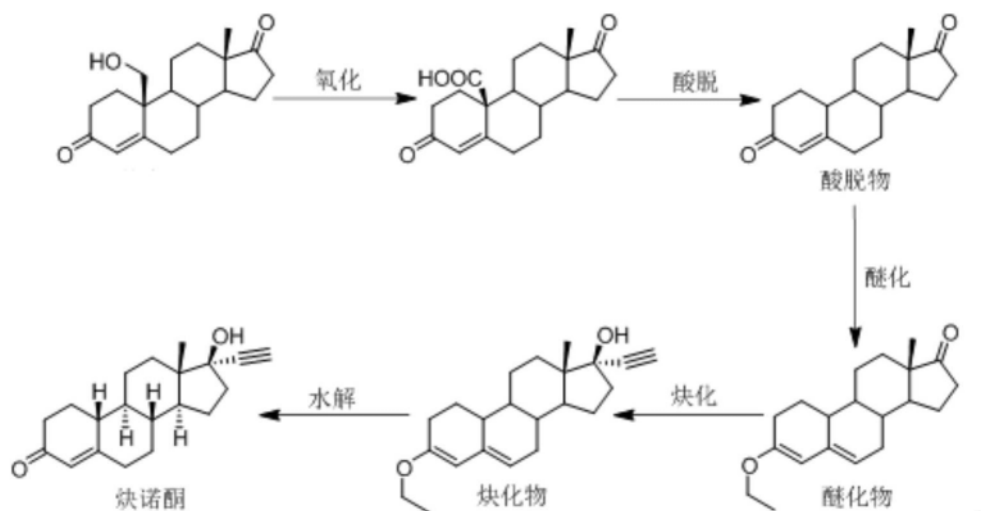
酶突变体、编码基因、载体及在甾体C19羟基化中的应用

(57) 摘要

本发明提出了酶突变体、编码基因、载体及在甾体C19羟基化中的应用, C19羟化酶野生型及其突变体能够高效催化甾体C19羟基化得到中间体, 提高反应投料浓度; 中间体进一步氧化脱羧得到19羟基甾体化合物, 可用于制备包括炔诺酮、米非司酮及替勃龙等甾体激素药物, 克服化学合成法线路复杂、成本高等缺陷, 可提高产物收率, 具有显著的工业应用前景。



1. 氨基酸序列如SEQ ID NO:2-10所示的酶突变体。
2. 编码权利要求1所述酶突变体的基因。
3. 表达载体,其特征在於,含有权利要求2所述的基因。
4. 菌株,其特征在於,包含有权利要求3所述的表达载体。
5. 羟基化酶在甾体C19羟基化中的应用,其特征在於,所述羟基化酶包括氨基酸序列如:SEQ ID NO:1所示的酶,和/或,SEQ ID NO:2-10所示的至少一种酶突变体。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在於,所述甾体为4-雄烯二酮;和/或,所述C19羟基化产物为19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。
7. 19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的制备方法,其特征在於,由4-雄烯二酮和羟基化酶在还原型辅酶和氧气氛下催化反应得到;所述还原型辅酶包括氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的酶,和/或,如SEQ ID NO:2-10所示的至少一种酶突变体。
8. 权利要求7所述制备方法得到的19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。
9. 权利要求8所述19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮在制备甾体激素药物中的应用,所述甾体激素药物包括炔诺酮、米非司酮及替勃龙。
10. 炔诺酮的制备方法,其特征在於,包括将权利要求8所述19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮氧化、脱羧得到19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮,再经醚化、炔化及水解得到炔诺酮的步骤;所述制备方法反应如下:



酶突变体、编码基因、载体及在甾体C19羟基化中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于甾体药物制备技术领域,具体涉及酶突变体、编码基因、载体及在甾体C19羟基化中的应用。

背景技术

[0002] 甾体羟基化衍生物作为多种重要的医药中间体或药物原料被广泛应用于抗癌抗炎等多种临床药物的生产。在甾体羟基化反应中,19位的羟基化可用于合成炔诺酮、米非司酮、替勃龙等多种高效甾体激素药物的中间体19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮,具有巨大的市场价值,但19位角甲基具有很大的空间位阻,是目前公认的最难被羟基化的位点。目前合成19羟基甾体化合物(19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮)只能利用路线十分复杂、产物收率低的化学法合成工艺。

[0003] 并且现有制备炔诺酮的工艺,多从19羟基去甲双酮或A环降解物为起始原料,经过氧化、酸脱等一系列化学合成得到重要前体酸脱物,进一步炔化形成最终炔诺酮成品,因传统化学合成法制备中间体化合物路线复杂且环境成本高,限制了在制备炔诺酮等甾体激素药物中的应用。

发明内容

[0004] 本发明提出一种酶突变体,可用于甾体19位的羟基化的酶及其突变体,克服现有化学合成法线路复杂、成本高等缺陷。

[0005] 基于此,本发明的技术方案如下:

[0006] 本发明的第一个方面在于,提出氨基酸序列如SEQ ID NO:2-10所示的酶突变体。

[0007] 本发明的第二个方面在于,提出编码第一方面所述酶突变体的基因。

[0008] 可选地,所述酶突变体基因如SEQ ID NO:12-20所示。

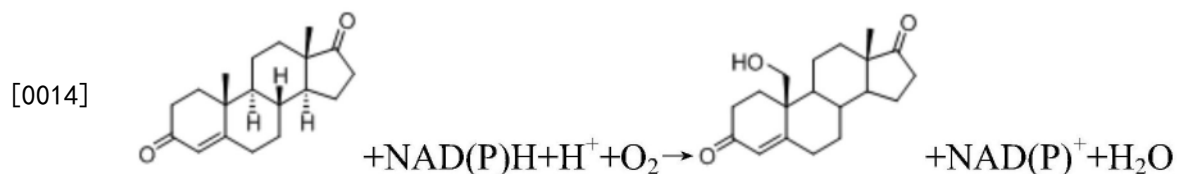
[0009] 本发明的第三个方面在于,提出一种表达载体,含有第二方面所述的基因。

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

[0011] 本发明的第五个方面在于,提出羟基化酶在甾体C19羟基化中的应用,所述羟基化酶包括氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的酶,和/或,如SEQ ID NO:2-10所示的至少一种酶突变体。

[0012] 可选地,所述甾体为4-雄烯二酮;和/或,所述C19羟基化产物为19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。

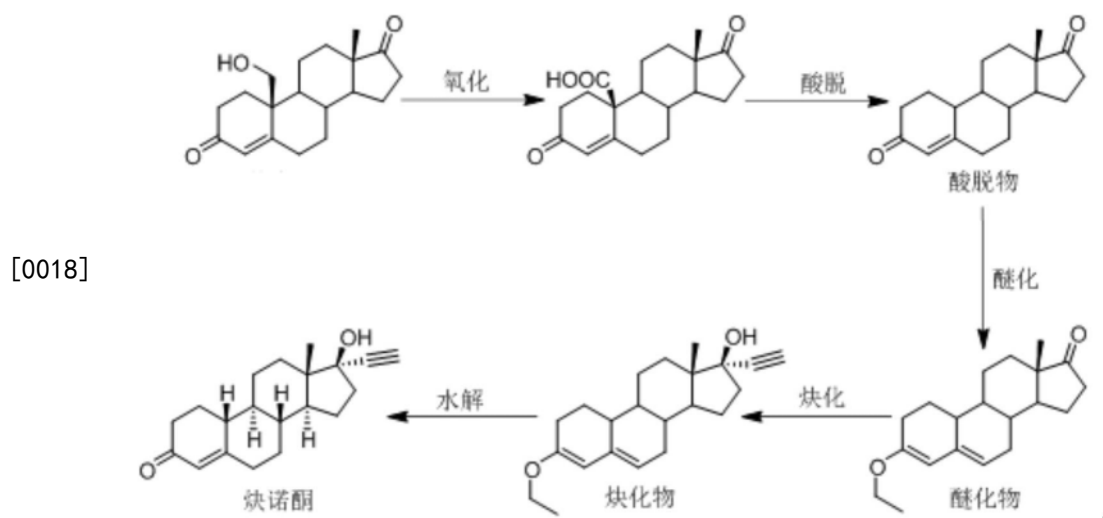
[0013] 本发明的第六个方面在于,提出19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的制备方法,由4-雄烯二酮和羟基化酶在还原型辅酶和氧气氛下催化反应得到;所述还原型辅酶包括氨基酸序列如:SEQ ID NO:1所示的酶,和/或,SEQ ID NO:2-10所示的至少一种酶突变体;优选地,反应过程为:



[0015] 本发明的第七个方面在于,提出第六方面所述制备方法得到的19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮。

[0016] 本发明的第八个方面在于,提出第七个方面所述19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮在制备甾体激素药物中的应用,所述甾体激素药物包括炔诺酮、米非司酮及替勃龙,所述甾体激素药物具有共同的母核结构。

[0017] 本发明的第九个方面在于,提出炔诺酮的制备方法,包括将第七个方面所述19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮氧化、脱羧得到19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮,再经醚化、炔化及水解得到炔诺酮的步骤;所述制备方法反应如下:



[0019] 相比现有技术,本发明的有益效果在于:

[0020] 本发明提出的C19羟化酶野生型及其突变体能够高效催化甾体C19羟基化得到羟基化后的中间体,提高反应投料浓度;中间体进一步氧化脱羧得到19羟基甾体化合物,可用于制备包括炔诺酮、米非司酮及替勃龙等甾体激素药物,克服化学合成法线路复杂、成本高缺陷,可提高产物收率,具有显著的工业应用前景。

附图说明

[0021] 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。

[0022] 图1为本发明炔诺酮的制备反应过程示意图。

具体实施方式

[0023] 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。

[0024] 实施例1

[0025] 1) 提供来源于*Rhizoctonia solani*的野生型C19羟化酶Ntd1,通过基因合成手段合成(南京金斯瑞公司合成),相关氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,基因序列如SEQ ID NO:11所示。

[0026] 2) 对野生型的C19羟化酶Ntd1进行同源建模,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9个活性提高的突变体Ntd2、Ntd3、Ntd4、Ntd5、Ntd6、Ntd7、Ntd8、Ntd9、Ntd10,对应的氨基酸序列如SEQ ID NO:2-10所示,对应的核苷酸序列如SEQ ID NO:12-20所示,在相同条件下,突变体能够显著提高催化活性及反应投料浓度。

[0027] 3) 将合成的含C19羟化酶基因ntd1的表达质粒pRSFDuet1-ntd1及其突变体质粒,通过化学转化的方法转入大肠杆菌Rosetta (DE3),涂布于含有卡那霉素抗性(50 μ g/mL浓度)的2xYT固体选择培养基(配方:16g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠,20g/L琼脂)平板上。

[0028] 4) 在2xYT固体选择培养基平板上挑取转化子Rosetta (DE3)-pRSFDuet1-ntd,于2xYT液体选择培养基(配方:6g/L蛋白胨,10g/L酵母粉,5g/L氯化钠)中制备种子液(37 $^{\circ}$ C, 200rpm, 16h),以2mL的接种量转接于含200mL 2xYT液体培养基的1L三角瓶中,37 $^{\circ}$ C, 200rpm振荡培养至OD₆₀₀=0.6~0.8,于0.5mM浓度IPTG, 18 $^{\circ}$ C条件下诱导24h,然后于12000rpm收集大肠杆菌细胞,并用0.1MPBS (pH7.0)缓冲液洗涤并重悬,然后进行超声波破碎,得到澄清透亮的全细胞裂解液,于12000rpm离心得到的上清液即为C19羟化酶酶液。

[0029] 实施例2C19羟化酶的催化活性

[0030] 将上述不同突变体单菌落以及野生型单菌落接种到1.5mL含有50 μ g/mL卡那霉素的LB液体培养基的细胞培养板中,37 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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 pH7.5的磷酸盐缓冲液中),添加溶菌酶溶液300 μ L于收集到的细胞中,吹吸混匀,置于20 $^{\circ}$ C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:

[0031] ①将收集到的酶液用PBS溶液稀释10倍;

[0032] ②设置酶标仪孵育温度35 $^{\circ}$ C,按照下述测定体系依次加入160 μ L 50mM pH7.5的Tris-HCl缓冲液、10 μ L 1.2mM DCPIP母液、20 μ L 100mM的4-AD溶液(DMSO配制),混合均匀后,再加入稀释后酶液(10 μ L)开启反应(总体积为200 μ L),具体如表1所示。

[0033] 表1:C19羟化酶活测定体系

	体系	添加量 (μL)
[0034]	50mM PBS 缓冲液 (pH 7.5)	160
	1.2mM DCPIP 母液	10
	100mM 4-AD 溶液	20
	稀释后酶液	10
	总体积	200

[0035] 根据测定反应体系中600nm处DCPIP吸光度的变化绘制趋势线,计算趋势线斜率为K。

[0036] 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K1;

[0037] ④根据计算公式, $\text{比酶活} = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{反应体积} \times K}{K1 \times \text{酶液体积} \times \text{酶液蛋白浓度}}$ 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,对不同突变体酶活进行酶活测定,结果如表2所示。

[0038] 表2:不同C19羟化酶突变体酶活测定结果

	野生型/突变型	比酶活 (U/mg)	相对活力
[0039]	Ntd1 (野生型)	6	100%
	Ntd2	7.5	125%
	Ntd3	10.6	177%
	Ntd4	6.3	105%
	Ntd5	6.8	113%
	Ntd6	6.5	108%
	Ntd7	10.5	175%
	Ntd8	7.3	122%
	Ntd9	13.6	226%
	Ntd10	10.9	182%

[0040] 通过对不同突变体的酶活测定结果分析,C19羟化酶最佳突变体Ntd9的催化活性是野生型Ntd1的2.26倍。

[0041] 以下以炔诺酮的制备为例,验证以上C19羟化酶及其突变体的羟基化效果。

[0042] 制备例

[0043] 炔诺酮的制备反应过程如图1所示。

[0044] 1.19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮的制备 (以羟化酶突变体Ntd9为例)

[0045] 250mL反应瓶中加入15g 4-AD、1.5g C19羟化酶 (由序列9在大肠杆菌Rosetta

(DE3) 中表达获得)、0.3g NADPH, 用0.1M的PBS (pH7.0) 补充体积至150mL, 随后用2M NaOH和2M HCl调节pH至7.5。在纯O₂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150mL乙酸乙酯, 60℃回流1h, 过滤除去变性蛋白质。随后将体系浓缩至45mL, 加入150mL水, 析出白色晶体物料, 产物过滤后干燥, 得到13.5g产物19-羟基雄甾-4-烯-3, 17-二酮, HPLC测定纯度为99%。

[0046] 2. 19-羟基雄甾-4-烯-3, 17-二酮经氧化、酸脱、醚化、炔化及水解得到炔诺酮

[0047] 1) 将10g 19-羟基雄甾-4-烯-3, 17-二酮加入反应瓶中, 再加入20mL乙腈, 搅拌, 再加入0.85g 5%次氯酸钠溶液, 再加入4mL水, 加入0.01g 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-N-氧化物(TEMPO), 再加入15mL的0.67M的磷酸盐缓冲液pH=6.7, 保温至30~35℃, 反应完全后, 降温至0℃, 再加入30mL的0℃的饱和碳酸氢钠溶液, pH调至8左右, 再加入1.83g的亚硫酸钠固体, 搅拌30分钟, 再加入20mL的乙酸乙酯, 搅拌15分钟, 分离出有机层, 将水层降温至0℃, 缓慢滴加1N的盐酸至pH=2, 再加入50mL的乙酸乙酯萃取两次, 合并有机相, 将有机相用20mL饱和食盐水洗涤两次, 将有机相加入适量的无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩至无溶剂, 得到11g 19-羧基-4-雄甾烯-3, 17-二酮湿品;

[0048] 2) 在反应瓶中, 投入化合物19-羧基-4-雄甾烯-3, 17-二酮湿品、乙醇20mL, 搅拌溶解, 再加入盐酸1mL, 回流20分钟。加水300mL, 冷却至0℃, 过滤, 用水洗至中性, 干燥, 得到化合物19-去甲-4-雄甾烯-3, 17-二酮8g;

[0049] 3) 将5g 19-去甲基-4-雄烯二酮加入50mL乙醇中, 加入5mL原甲酸三乙酯, 1g对甲苯磺酸, 控制温度60℃搅拌反应, 反应结束后, 加入10mL三乙胺, 降温至-10℃, 过滤, 得到6.4g醚化物湿品;

[0050] 4) 将15g叔丁醇钾加入反应瓶中, 再加入25四氢呋喃, 氮气置换, 加入1mL丙酮, 开始通入乙炔气体, 升温至50℃, 保温1~2h, 降温至0℃; 缓慢滴加酸脱物的四氢呋喃溶液(5g醚化物加15mL THF), 滴加完毕后继续通乙炔气反应4~8h; 反应完全后, 加入10mL 18N盐酸, 调pH至4~5, 升温至30~40℃, 搅拌1h, 炔化物完全水解, 过滤, 浓缩至无溶剂蒸出, 过滤, 干燥, 得到5.1g炔诺酮粗品;

[0051] 5) 将5.1g炔诺酮粗品加入反应瓶中, 再加入50mL无水乙醇, 升温溶解, 浓缩蒸出40mL无水乙醇, 降温至5℃析晶4小时, 过滤, 干燥, 得到符合药典标准的炔诺酮4.5g, HPLC测定纯度为99.8%。

[0052] 制备例1-10在4-AD投料相同(15g)的前提下, 分别使用C19羟化酶Ntd1~Ntd10制备炔诺酮过程得到的19-羟基雄甾-4-烯-3, 17-二酮及最终产物炔诺酮, 结果如表3所示。

[0053] 表3:

[0054]

制备例	C19 羟化酶	19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮		炔诺酮	
		产量, g	纯度, %	产量, g	纯度, %
制备例 1	Ntd1	11.9	95	4.0	97.5
制备例 2	Ntd2	12.6	96	4.2	98.0
制备例 3	Ntd3	12.5	96	4.1	99.3
制备例 4	Ntd4	13.1	97	4.2	98.3
制备例 5	Ntd5	12.9	96	4.1	97.8
制备例 6	Ntd6	13.0	98	4.1	98.6
制备例 7	Ntd7	12.7	97	3.9	99.6
制备例 8	Ntd8	12.8	97	4.0	99.4
制备例 9	Ntd9	13.5	99	4.5	99.8
制备例 10	Ntd10	13.2	97	4.3	99.2

[0055] 由以上实施例1-10可见,使用C19羟化酶野生型Ntd1催化4-AD制备19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮具有可观的收率和纯度,突变体Ntd2-10由于活性更高,中间体及炔诺酮产物具有更高的产率和纯度。由原料易得的4-AD催化得到中间体19-羟基雄甾-4-烯-3,17-二酮,再经简单氧化脱羧后可得到19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮,可替换纯化学法制备19-去甲-4-雄甾烯-3,17-二酮,避免线路复杂、成本高的缺陷,推进甾体激素药物的工业化制备具备显著意义。

[0056] 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。

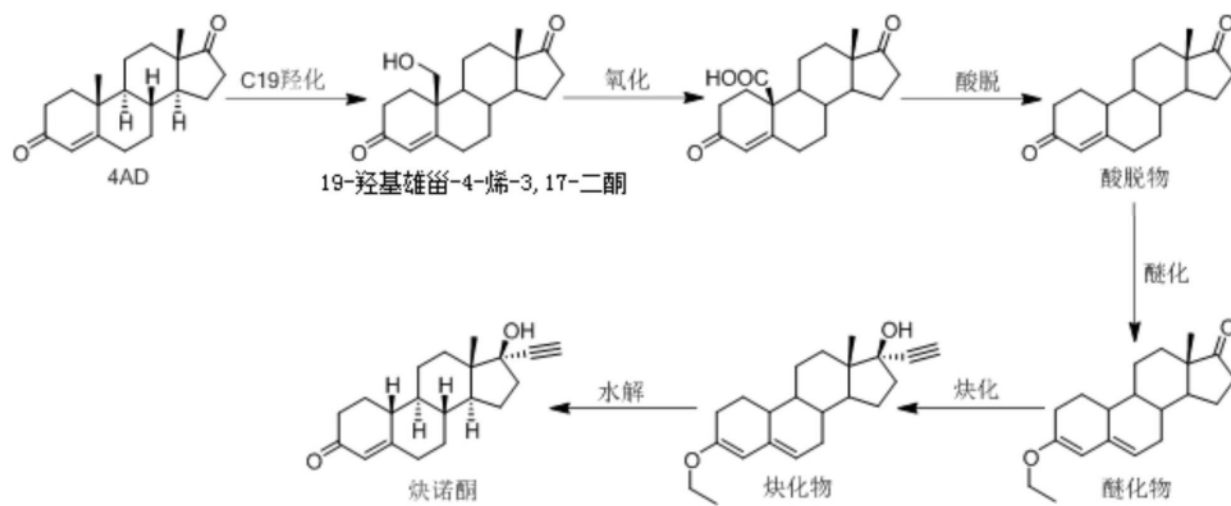


图1