

微生物来源抗肿瘤先导化合物的靶向筛选研究

田敏¹ 陈嘉² 张鹏² 俞岩青¹ 王昆蓉¹ 曹艳茹² 雷叶明¹ 钟艾玲¹ 朱辉²

(1 成都大学, 四川抗菌素工业研究所, 成都 610052; 2 成都雅途生物技术有限公司, 微生物药物生物合成技术国家地方联合工程研究中心, 成都 610041)

摘要: **目的** 寻找具有抗肿瘤活性的雷帕霉素结构类似物。 **方法** 以雷帕霉素细胞内结合蛋白 RBP 为靶标, 运用营养依赖重组微生物工程菌筛选方法, 从微生物的次级代谢产物中筛选活性化合物; 通过 16S rDNA 序列分析鉴定活性化合物产生菌; 深层发酵制备活性物培养液并分离、纯化目标物; 根据波谱检测及数据解析进行化合物结构鉴定并进行活性评价。 **结果** 筛选获得 1 株活性菌株 CY-365, 经鉴定为放线菌链霉菌属, 其代谢活性产物 CY-365 结构解析为 15(S)-O-乙基雷帕霉素, 与雷帕霉素具有相似的体外抗肿瘤活性。 **结论** 链霉菌 CY-365 经深层培养, 主要代谢产物为具有抗肿瘤活性的 15(S)-O-乙基雷帕霉素。

关键词: 靶向筛选; 雷帕霉素; 结构类似物

中图分类号: R979.5 **文献标志码:** A

Targeting screening for antitumor precursor compounds from microorganisms

Tian Min¹, Chen Jia², Zhang Peng², Yu Yan-qing¹, Wang Kun-rong¹, Cao Yan-ru², Lei Ye-ming¹,
Zhong Ai-ling¹ and Zhu Hui²

(1 Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052; 2 National Joint Engineering Research Centre of Microbial medicine Biosynthesis Technology, Yacht Bio-tech Co., Chengdu 610041)

Abstract Objective To search for structural analogues of rapamycin with anti-tumor activity. **Methods** Targeting the intracellular rapamycin binding protein (RBP), active compounds were screened from secondary metabolites of microorganisms by using recombinant microbial engineering strains with nutrition dependence; the active compound producing strain was taxonomically identified through sequence analysis of 16 rDNA; the active constituent was obtained by submerged fermentation, isolation, and purification; the chemical structure of the active compound was elucidated on the basis of comprehensive spectral data analysis and its anti-tumor activity was evaluated. **Results** One active strain CY-365 was obtained and identified as *Streptomyces* sp. The structure of active compound was elucidated to be 15(S)-O-ethyl-rapamycin and the anti-tumor activity of 15(S)-O-ethyl-rapamycin was similar to rapamycin *in vitro*. **Conclusion** After submerged fermentation, *Streptomyces* strain CY-365 mainly produced 15(S)-O-ethyl-rapamycin which has anti-tumor activity.

Key words Target screening; Rapamycin; Structural analogues

恶性肿瘤是危害人类生命健康和社会发展的重大疾病, 在我国, 随着工业化、城镇化和人口老龄化进程的加快, 加之不良生活习惯以及环境污染等问题的存在, 癌症发病率和死亡率日益增加^[1]。尽管不断有新的抗癌药物应用于临床, 但在临床治疗过程中, 抗肿瘤药物仍面临毒性大、治疗适用范围窄、易产生耐

药性等问题, 需要持续不断地研究、开发新型抗肿瘤药物。因此, 世界主要国家均将抗肿瘤药物列为国家重点研发计划品种, 预防、控制和治疗癌症已成为全球最重要的公共医疗问题之一。

研究表明由 Vezina 等^[2]1975 年发现的雷帕霉素对恶性肿瘤细胞具有抑制作用, 能有效抑制肾移植

收稿日期: 2018-12-13

基金项目: 四川省科技计划应用基础研究项目 (No. 2017JY0256); 四川省医药微生物共享服务平台建设 (No. 2018TJPT0004)

作者简介: 田敏, 女, 生于 1965 年, 研究员, 主要从事微生物药物的研究与开发, E-mail: tm65tm@aliyun.com

患者的皮肤卡波西肉瘤,其结构修饰衍生物依维莫司(everolimus)近年来先后被美国和欧洲批准用于治疗晚期肾细胞癌、伴有与结节状脑硬化(TSC)相关的室管膜下巨细胞星形细胞瘤(SEGA)、恶性胰腺神经内分泌肿瘤(PNET)、HR 阳性 HER2 阴性乳腺癌、肾血管平滑肌脂肪瘤,以及年幼儿童罕见脑肿瘤的治疗^[3]。其母核(雷帕霉素)结构引起各国药物研究者的重视,具有广泛、深度的开发前景。

本研究以具有抗肿瘤活性的化合物雷帕霉素胞内结合蛋白 RBP 为靶标,该 RBP 蛋白具有 PPIase 活性,可催化肽酰脯氨酰胺键的顺-反式异构转化,使肽链折叠。将 RBP 的编码基因克隆到啤酒酵母菌中,并将其构建为氨基酸营养依赖型重组微生物,应用所构建的基因重组工程菌作为模型筛选菌株,通过微生物的存活,快速、便捷的筛选特异性的雷帕霉素结构类似物。本文主要报道从微生物次级代谢产物中经筛选获得的活性化合物产生菌的初步鉴定、活性化合物的分离纯化及结构研究。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器与试剂

仪器:PCR 仪(Thermal Cycler);电泳仪(北京六一生物科技有限公司);生化培养箱(上海精宏实验设备有限公司,GNP-9160 型);洁净工作台(苏州净化,SW-CJ-2FD 型);发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂,TD-L40B);高效液相色谱仪(Agilent, 1200 Series);DAC 层析柱(北京创新通恒科技有限公司,50mm);真空干燥箱(上海精宏实验设备有限公司,DZF-6020 型);紫外扫描仪(岛津 UV-2450);红外仪(岛津 IRAfinity-1s);高分辨质谱(MicroTOF QII);核磁共振波谱仪(Bruker Advance 600 型)。

试剂:PCR 扩增酶及扩增引物(上海生工生物工程有限公司);硅胶(青岛美高集团有限公司,150~250 目);C₁₈ 硅胶(Kromasil, 10μm);乙酸乙酯、丙酮、正己烷、乙腈、甲酸和甲酸铵等分析纯试剂(成都市科龙化工试剂厂)。

1.2 实验菌株

筛选模型用重组微生物工程菌 RS 及 RS-N 由本试验室保藏;活性化合物产生菌 CY-365 分离自四川阿坝地区土壤,保藏于四川抗菌素工业研究所菌种保藏中心。

1.3 培养基

固体斜面培养基(g/L):葡萄糖 4,酵母粉 4,麦芽抽提物 10, CaCO₃ 2,琼脂 25, pH7.0。种子培

养基(g/L):甘油 10,可溶性淀粉 10,葡萄糖 5,黄豆粉 20, CaCO₃ 2, pH7.0。发酵培养基(g/L):甘油 10,可溶性淀粉 10,葡萄糖 5,黄豆粉 40, NaCl 2,赖氨酸 5, MgSO₄·7H₂O 2, CaCO₃ 2, pH7.0。重组微生物工程菌培养用培养基(g/L):葡萄糖 10,酵母粉 10,蛋白胨 15,琼脂 20, pH6.5。

2 试验方法

2.1 模型筛选

采用携带雷帕霉素胞内结合蛋白 RBP 外源靶位基因的 2 株营养依赖型重组酵母工程菌筛选系统,对微生物来源的化合物样品进行筛选,根据两株基因工程菌对所试样品的敏感性和耐受性情况(表 1),特异性地寻找雷帕霉素及其结构类似物。

表 1 筛选模型
Tab. 1 Screening model

基因工程菌株	生长情况			
基因重组酵母菌 RS	不生长	抑菌圈大	不生长	生长
基因重组酵母菌 RS-N	生长	抑菌圈小	不生长	生长
结果评判	阳性	阳性	抗真菌活性	阴性

2.2 菌株分子鉴定

取 CY-365 菌体适量,加入 5% Chelex 100 100μL, 100℃水浴 10min, 12000r/min 离心 3min, 留取上清液进行 16S rDNA 扩增^[4],上游引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3),下游引物 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 扩增采用 50μL 反应体系包括 DNA 模板 2μL,上游引物 27F(10μm)5μL,下游引物 1492R(10μm)5μL, Buffer(10×)5μL, Taq 酶 0.5μL, dNTP(2.5mmol/L)1.5μL, ddH₂O 31μL;PCR 反应条件为 94℃预变性 5min;94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 1min, 共 30 个循环。扩增产物经 GoldView 染色,琼脂糖凝胶电泳、回收,送成都擎科生物公司测序。测序结果提交 NCBI 的 BLAST 进行多序列相似性比对分析,利用 MEGA7.0 计算序列间的相似性并绘制系统进化树^[5]。

2.3 菌株 CY-365 的培养

无菌条件下刮取适量 CY-365 菌株的孢子,涂布接种于斜面培养基上,于 28℃生化培养箱中培养 10d 后,将生长成熟的斜面培养物,挖块接种于 500mL 种子培养瓶中,培养基装量 150mL,于 28℃, 220r/min 条件下培养 3d,培养物按 10%接种量接种于 10L 发酵罐,28℃, 500r/min, 空气 1:1(vvm)条件下培养 6d,收集发酵液。

2.4 活性产物的分离提取

CY-365 深层发酵培养物 10L, 经离心进行固液分离, 弃上清液, 菌丝体用 3 倍体积乙酸乙酯抽提^[6], 抽提液减压浓缩后上样于正相硅胶柱层析, 分别用 15%、20% 和 25% 丙酮/正己烷梯度洗脱, TLC、HPLC 检测跟踪洗脱进程, 分步收集, 合并目标组分纯度大于 70% 的洗脱液, 40~50℃、 $P \leq -0.08\text{MPa}$ 减压浓缩至干, 用乙腈溶解后经降温结晶, 过滤, 真空干燥得粗品 2.8g。

将粗品加入 200mL 乙腈溶解完全, 加水至 500mL, 经 DAC 反相 C_{18} 层析, 55% 乙腈洗脱, HPLC 检测, 合并纯度大于 95% 的洗脱液, 减压浓缩, 浓缩液加乙酸乙酯萃取, 分离萃取液浓缩至干, 加乙腈溶解, 降温结晶, 过滤, 真空干燥制得 CY-365 纯品 918mg。

2.5 理化性质和结构鉴定

将经分离纯化得到的化合物 CY-365 进行理化分析以及 IR、UV、MS、NMR 波谱检测, 并对各波谱信息进行波谱解析。

2.6 HPLC 分析条件

色谱柱: Kromasil C_{18} (250mm×4.6mm, 5 μm); 流动相 A: 水 (1000mL 含 0.63g 甲酸铵, 1mL 甲酸); 流动相 B: 乙腈; A:B=70:30; 流速: 1.0mL/min; 紫外检测波长: 277nm; 柱温: 50℃。

3 结果

采用携带雷帕霉素细胞内结合蛋白 RBP 外源靶位基因的重组酵母工程菌筛选系统, 经对 4000 余个微生物来源样品进行筛选, 获得一个阳性菌株 CY-365。

3.1 菌种分类鉴定

菌株 CY-365 的 16S rRNA 基因序列经过扩增并测序, 16S rDNA 序列经过 NCBI 的 BLAST 比对,

利用软件 MAGE7.0 绘制系统发育树 (图 1)。菌株 CY-365 与 *Streptomyces* sp. MM9(KU714924.1) 的同源性达 99%。

3.2 活性化合物结构鉴定

化合物 CY-365 为白色不定性粉末, 可溶于丙酮、乙腈、乙醇, 在乙醚中微溶, 在水中几乎不溶。化合物紫外吸收在 277.4nm 处有高强 K 吸收带, 表明分子中有 3 个共轭体系存在。化合物红外光谱在波数 3417.86 cm^{-1} 有中等强度吸收, 说明分子中含有羟基 (OH); 在波数 2968.45、2931.80 和 2873.94 cm^{-1} 有吸收, 说明分子中含有饱和烃 (CH_3 、 CH_2); 在波数 1718.58 cm^{-1} 有最强吸收, 说明分子中含有羰基 ($\text{C}=\text{O}$); 在波数 1645.28 和 1633.71 cm^{-1} 有吸收, 说明分子中含有双键 ($\text{C}=\text{C}$); 在波数 1450.47 和 1377.17 cm^{-1} 有吸收, 说明分子中有 CH_3 和 CH_2 。

化合物 CY-365 的 ESI-MS 显示分子离子峰 m/z 950.5622 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 高分辨数据表明化合物分子式为 $\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{NO}_{13}$ 。

化合物 CY-365 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR(DEPT) 及 HSQC 的相关性显示: 化合物含有 52 个碳的信号, 包括 10 个甲基 (CH_3), 14 个亚甲基 (CH_2), 20 个次甲基 (CH) 和 8 个季碳 (C); 其中化合物含有 5 个羰基碳 ($\text{C}=\text{O}$)、2 个甲氧基 (CH_3O)。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH_2 -2、 CH_2 -3、 CH_2 -4、 CH_2 -5、 CH_2 -6 存在依次相关信号, 根据 HMBC 相关信号, CH_2 -2、 CH_2 -3、 CH_2 -4、 CH_2 -5、 CH_2 -6 应依次连接成杂环, 同时次甲基碳 CH_2 -2 与羰基碳 C-1 连接。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH_2 -10、 CH_2 -11、 CH_2 -12、 CH_2 -13、 CH_2 -14、 CH_2 -15 存在依次相关信号, 甲基碳 CH_3 -10a 与次甲基碳 CH_2 -10 相连, 再根据 HMBC 相关信号, CH_2 -10、 CH_2 -11、 CH_2 -12、 CH_2 -13、 CH_2 -14、 CH_2 -15 依次连接, 季碳 C-9 与次甲基碳 CH_2 -10 相连, 次甲基 CH_2 -15 与亚甲氧基 CH_2O -

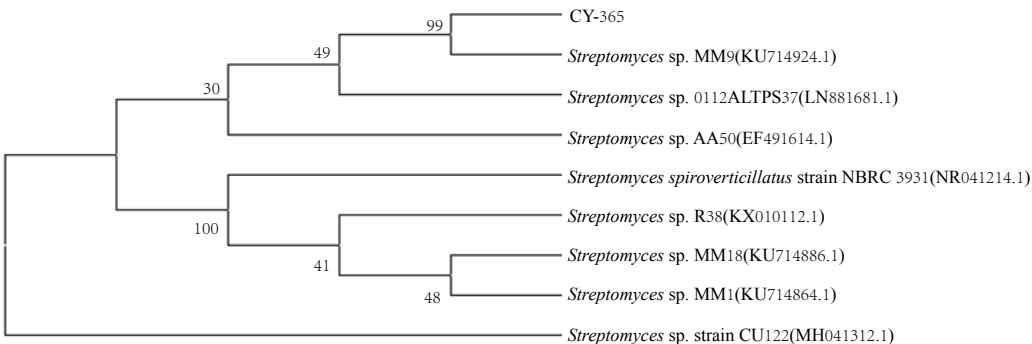


图 1 菌株 CY-365 与相关菌株系统发育树

Fig. 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree of CY-365 and relative strains

15a 相连。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH_2 -15a 和 CH_3 -15b 相关, 再根据 HMBC 相关信号可知, 次甲基 CH-15 与乙氧基相连。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH-17、CH-18、CH-19、CH-20、CH-21、 CH_2 -23 和 CH-24 存在依次相关信号, 甲基碳 CH_3 -22a 与 CH-22 连接, 甲基碳 CH_3 -24a 与 CH-24 连接, 再根据 HMBC 相关信号, CH-17、CH-18、CH-19、CH-20、CH-21、 CH_2 -23 和 CH-24 依次连接, 季碳 C-16 与 CH-15、CH-17 和 CH_3 -16a 连接, 羰基碳 C-25 与 CH-24 和 CH-26 连接。化合物 CY-365 的 CH-17、CH-18、CH-19、CH-20、CH-21 氢谱化学位移显示, CH-17、CH-18、CH-19、CH-20、CH-21 为依次相连的共轭烯烃。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH-26、CH-27 相关, 且氢谱化学位

移显示为与氧相连, 再根据 HMBC 相关信号, 次甲基 CH-26 与甲氧基 CH_3O -26a 相连。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH-29、CH-30、 CH_3 -30a 依次相关, 再根据 HMBC 相关信号, CH-29、CH-30、 CH_3 -30a 依次相连, 季碳 C-28 与 CH-29 和 CH_3 -28a 相连, 羰基碳 C-31 与 CH-30 和 CH_2 -32 相连。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH_2 -32、CH-34、 CH_2 -35、CH-36 依次相关, 甲基碳 CH_3 -34a 与 CH-34 相连, 再根据 HMBC 相关信号, CH_2 -32、CH-34、 CH_2 -35、CH-36 依次相连。由 ^1H - ^1H COSY 可知, CH-36、 CH_2 -37、 CH_2 -38、CH-39、CH-40、 CH_2 -41、CH-36 依次相关, 再根据 HMBC 相关信号, CH-36、 CH_2 -37、 CH_2 -38、CH-39、CH-40、 CH_2 -41、CH-36 依次连接成六员环, 次甲基

表 2 化合物 CY-365 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR(DEPT)、HSQC、 ^1H - ^1H COSY、HMBC 数据 (溶剂为 CDCl_3)

Tab. 2 ^1H NMR, ^{13}C NMR(DEPT), HSQC, ^1H - ^1H COSY and HMBC data for compound CY-365 in CDCl_3

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (DEPT)(ppm)	^1H - ^1H COSY	HMBC
1		169.28(C)		H-2, 33
2	5.27~5.27(1H, d)	51.30(CH)	H-3	H-6, 33
3	2.30~2.34(2H, m) 1.58~1.76(13H, m)	27.01(CH_2)	H-4, 2	H-2
4	1.58~1.76(13H, m) 1.45~1.51(4H, m)	20.63(CH_2)	H-5, 3	H-2, 6
5	1.58~1.76(13H, m) 1.45~1.51(4H, m)	25.26(CH_2)	H-4, 6	H-6
6	3.56~3.58(1H, br d, $J=13.14\text{Hz}$) 3.30~3.42(10H, m)	44.21(CH_2)	H-5	H-2
7		166.75(C)		H-2
8		192.65(C)		
9		98.50(C)		H-10, 10a, 11
10	1.93~1.99(3H, m)	33.78(CH)	H-10a, 11	H-10a, 11
10a	0.94~0.95(3H, d, $J=6.6\text{Hz}$)	16.22(CH_3)	H-10	H-10
11	1.58~1.76(13H, m)	27.26(CH_2)	H-10, 12	H-10, 10a
12	1.30~1.40(3H, m)	31.25(CH_2)	H-11, 13	H-11, 14
13	3.84~3.89(1H, m)	67.19(CH)	H-12, 14	H-12, 14
14	1.82~1.87(1H, m) 1.45~1.51(4H, m)	39.12(CH_2)	H-13, 15	H-15
15	3.75~3.78(1H, dd, $J=7.92, 6.96\text{Hz}$)	82.38(CH)	H-14	H-13, 14, 15a, 16a, 17
15a	3.30~3.42(10H, m) 3.15~3.17(1H, m)	63.30(CH_2)	H-15b	H-15, 15b
15b	1.13~1.15(4H, m)	15.38(CH_3)	H-15a	
16		136.42(C)		H-14, 15a, 16a, 18
16a	1.58~1.76(13H, m)	10.35(CH_3)		H-15, 17
17	5.93~5.94(1H, d, $J=10.86\text{Hz}$)	128.96(CH)	H-18	H-16a, 19
18	6.34~6.39(1H, dd, $J=14.88, 10.92\text{Hz}$)	126.49(CH)	H-17, 19	H-17, 19, 20
19	6.26~6.31(1H, dd, $J=14.76, 10.32\text{Hz}$)	133.41(CH)	H-18, 20	H-17, 18, 20, 21
20	6.11~6.15(1H, dd, $J=15.06, 10.32\text{Hz}$)	130.25(CH)	H-19, 21	H-17, 18, 19
21	5.50~5.54(1H, dd, $J=15.06, 8.88\text{Hz}$)	139.99(CH)	H-20, 22	H-19, 22a
22	2.30~2.34(2H, m)	35.20(CH)	H-21, 22a, 23	H-20, 21, 22a, 23

续表 2

Position	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (DEPT)(ppm)	^1H - ^1H COSY	HMBC
22a	1.03~1.04(3H, d, $J=6.66\text{Hz}$)	21.55(CH_3)	H-22	H-21
23	1.45~1.51(4H, m) 1.18~1.22(2H, m)	40.20(CH_2)	H-22, 24	H-21, 22a, 24
24	2.56~2.74(3H, m)	41.45(CH)	H-23, 24a	H-23, 24a
24a	0.98~0.99(4H, m)	13.76(CH_3)	H-24	H-23
25		215.47(C)		H-24, 24a, 26, 27
26	3.70~3.72(1H, d, $J=6.72\text{Hz}$)	84.81(CH)	H-27	H-27
26a	3.30~3.42(10H, m)	59.39(CH_3)		H-26
27	4.16~4.17(1H, d, $J=5.94\text{Hz}$)	77.23(CH)	H-26	H-26, 28a, 29
28		136.06(C)		H-26, 27, 28a, 30
28a	1.58~1.76(13H, m)	13.08(CH_3)		H-27, 29
29	5.39~5.41(1H, d, $J=9.96\text{Hz}$)	126.73(CH)	H-30	H-27, 28a, 30
30	3.30~3.42(10H, m)	46.55(CH)	H-29, 30a	H-29, 30a
30a	1.08~1.10(3H, d, $J=6.72\text{Hz}$)	15.94(CH_3)	H-30	H-29, 30
31		208.17(C)		H-29, 30, 30a, 32, 33
32	2.56~2.74(3H, m)	40.65(CH_2)	H-33	H-33
33	5.14~5.17(1H, m)	75.63(CH)	H-32, 34	H-2, 32, 34, 34a
34	1.93~1.99(3H, m)	33.20(CH)	H-33, 34a, 35	H-32, 33, 34a
34a	0.90~0.91(3H, d, $J=6.78\text{Hz}$)	15.88(CH_3)	H-34	H-33, 35
35	1.18~1.22(2H, m) 1.13~1.15(4H, m)	38.37(CH_2)	H-34, 36	H-33, 34a
36	1.30~1.40(3H, m)	33.14(CH)	H-35, 37, 41	H-35, 37, 41
37	1.58~1.76(13H, m) 0.98~0.99(4H, m)	31.66(CH_2)	H-36, 38	
38	1.93~1.99(3H, m) 1.58~1.76(13H, m)	31.25(CH_2)	H-37, 39	
39	3.30~3.42(10H, m)	73.92(CH)	H-38, 40	H-40, 41
40	2.91~2.95(1H, m)	84.41(CH)	H-39, 41	H-39, 40a, 41
40a	3.30~3.42(10H, m)	56.58(CH_3)		H-40
41	2.09~2.11(1H, m) 0.61~0.70(1H, m)	34.20(CH_2)	H-36, 40	

CH-40 与甲氧基 CH_3O -40a 相连。化合物 CY-365 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR(DEPT)、HSQC、 ^1H - ^1H COSY、HMBC 数据见表 2。

综合 UV、IR、ESI-MS 和核磁分析, 化合物 CY-365 含有羰基和共轭烯烃等基团, 含有 52 个碳 (10 个甲基、14 个亚甲基、20 个次甲基、8 个季碳), 含有 81 个氢 (3 个羟基活泼氢), 分子式为 $\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{NO}_{13}$, 鉴定为 15-O- 乙基雷帕霉素。有文献报道^[7], 通过雷帕霉素合成 15-O- 乙基雷帕霉素, 其存在顺式和反式两种结构, 对比参考文献中两种构型的核磁数据, 化合物 CY-365 为 15(S)-O- 乙基雷帕霉素, 其化学结构如图 2 所示。

4 讨论

微生物由于其具有代谢产物结构多样性的特点,

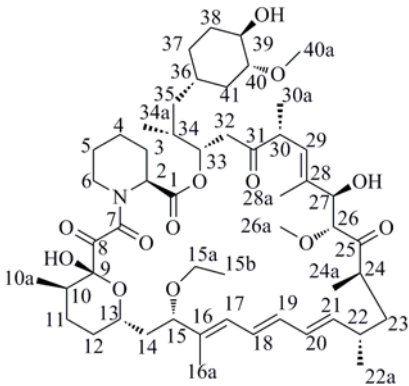


图 2 化合物 CY-365 的结构式
Fig. 2 The structure of compound CY-365

一直是新药研究的重要源泉。本研究通过以雷帕霉素细胞内结合蛋白 RBP 为靶位的特异筛选模型, 从

微生物次级代谢产物中筛选并分离得到化合物 CY-365, 其产生菌经菌种鉴定为放线菌链霉菌属, 化合物 CY-365 经结构解析研究表明为雷帕霉素的结构类似物乙氧基雷帕霉素, 体外试验显示与雷帕霉素对胞内结合蛋白 RBP 具有相同的结合活力。资料显示, 美国家用化学品公司通过发酵培养吸水链霉菌 NRRL5491 曾获得雷帕霉素类似物脯氨酸雷帕霉素^[8]; 福建微生物研究所报道采用巨大芽孢杆菌转化雷帕霉素, 获得 26,40-O- 双去甲基雷帕霉^[9], 从雷帕霉素产生菌吸水链霉菌发酵液中分离微量组分, 获得 15-O- 去甲雷帕霉素、15-O- 乙基雷帕霉素、脯氨酸雷帕霉素、27- 异帕雷帕霉素、26-O- 去甲雷帕霉素^[10]。上海医药工业研究院在构建放线菌 NP2-109 生物合成雷帕霉素时, 采用定点突变的方式获得 34, 35- 双键 -26-O- 去甲雷帕霉素^[11]。本研究发现的乙氧基雷帕霉素经立体构型分析确定为 15(S)-O- 乙基雷帕霉素, 由链霉菌直接代谢产生, 且为链霉菌 CY365 的

主要代谢产物, 为乙氧基雷帕霉素的制备奠定了物质基础。对乙氧基雷帕霉素进一步结构修饰及构效关系的深入研究, 极有可能为抗癌药物的源头创新提供新的母核物质。

参考文献

- [1] 曾红梅, 陈万青. 中国癌症流行病学与防治研究现状 [J]. 化学进展, 2013, 25(9): 1415-1420.
- [2] Stallone G, Schena A, Infante B, *et al.* Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(13): 1317-1323.
- [3] 黄平, 丁惠萍, 任华益. mTOR 抑制剂依维莫司在肿瘤治疗中的临床应用 [J]. 肿瘤药学, 2013, 3(6): 422-425.
- [4] Hwangbo K, Son S H, Lee J S, *et al.* Rapid and simple method for DNA extraction from plant and algal species suitable for PCR amplification using a chelating resin Chelex 100[J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2010, 4(1): 49-52.
- [5] 徐进, 赵声兰, 陈朝银. 产凝集素乳杆菌的筛选及 PCR-16SrDNA 鉴定 [J]. 食品与药品, 2008, 10(5): 9-11.
- [6] Rani P B, Kumar B S, Rao A B. Recovery and purification of rapamycin from the culture broth of Mtcc 5681[J]. *Pakist J Biolog Sci*, 2013, 16(5): 219-225.
- [7] Luengo J I, Yamashita D S, Dunnington D, *et al.* Structure-activity studies of rapamycin analogs: evidence that the C-7 methoxy group is part of the effector domain and positioned at the FKBP12- FRAP interface[J]. *Chem Biol*, 1995, 2(7): 471-481.
- [8] Russo R J, Howell S R, Sehgal S N. Proline derivative or rapamycin, production and application thereof[P]. EP 589703 A1, 1994-03-30.
- [9] 黄捷, 杨国新, 金东伟, 等. 巨大芽孢杆菌生物转化西罗莫司 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(10): 751-778.
- [10] 陈夏琴, 杨国新, 余辉, 等. 西罗莫司类似物 7-O- 去甲基雷帕霉素的分离和结构鉴定 [J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(4): 267-270.
- [11] Huang H, Gao P, Zhao Q, *et al.* Construction of a mutant of *Actinoplanes* sp. N902-109 that produces a new rapamycin