

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580012901.1

[51] Int. Cl.

C12P 17/18 (2006.01)

C07D 498/18 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 11 日

[11] 公开号 CN 1946852A

[22] 申请日 2005.4.25

[21] 申请号 200580012901.1

[30] 优先权

[32] 2004. 4. 27 [33] US [31] 60/565,714

[86] 国际申请 PCT/US2005/013971 2005.4.25

[87] 国际公布 WO2005/106007 英 2005.11.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.24

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·E·鲁彭 P·F·沙博诺

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 权陆军 刘 玥

权利要求书 2 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

利用雷帕霉素特异性甲基化酶标记雷帕霉素

[57] 摘要

阐述了一种利用 rapI、rapM 和/或 rapQ 酶的雷帕霉素特异性标记方法。还阐述了生成对本发明方法有用的粗酶提取物的方法。提供了特异性标记的雷帕霉素作为诊断工具的用途。

1. 一种特异性标记雷帕霉素的方法，其包括步骤：

在甲基化试剂存在下使去甲基雷帕霉素与雷帕霉素特异性甲基化酶反应。

2. 根据权利要求1的方法，其中所述甲基化试剂为S-腺苷-L-甲硫氨酸。

3. 根据权利要求1或权利要求2的方法，其中所述甲基化酶选自rapI甲基化酶、rapM甲基化酶和rapQ甲基化酶。

4. 根据权利要求1-3任何一项的方法，其中所述甲基化酶为粗酶提取物的形式。

5. 根据权利要求4的方法，其中所述粗酶提取物制备步骤包括：

(a) 从细胞培养物表达雷帕霉素特异性酶，所述细胞培养物由与调控序列可操作地连接的编码酶的核酸序列转导，所述酶选自rapI甲基化酶、rapM甲基化酶和rapQ甲基化酶；

(b) 浓缩细胞并在缓冲液中重悬浮所述细胞；

(c) 使混合物与溶菌酶和核酸酶温育；

(d) 破裂细胞；并且

(e) 离心且收集上清液。

6. 根据权利要求5的方法，其中步骤(c)中的温育进一步包括蛋白酶抑制剂。

7. 根据权利要求1-6任何一项的方法，其中所述反应混合物在约34℃温育约1小时。

8. 根据权利要求1-7任何一项的方法，其中甲醇在温育结束时加入反应物。

9. 权利要求1-8任何一项的方法，其中在HPLC分析之前通过离心去除沉淀的材料。

10. 权利要求9的方法，其中在C18柱中在45℃用包括二噁烷、乙酸和三乙胺的流动相进行HPLC分析。

11. 根据权利要求1-10任何一项的方法制备的特异性标记的雷帕霉素。

12. 包含根据权利要求1-10任何一项的方法制备的特异性标记的雷帕霉素和生理学相容的载体的组合物。

13. 一种制备特异性标记的雷帕霉素的试剂盒，其包括甲基化雷帕霉素，所述甲基化雷帕霉素根据权利要求 1 - 10 任何一项的方法制备，以及选自阴性对照、甲基化试剂、小瓶、管以及使用说明书的一种或多种组分。

14. 一种包含根据权利要求 11 的标记的雷帕霉素的试剂盒。

利用雷帕霉素特异性甲基化酶标记雷帕霉素

发明背景

雷帕霉素是一种由吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 产生的大环三烯抗生素,发现其不论是在体外还是在体内均具有抗真菌活性,特别是抗白色假丝酵母 (*Candida albicans*) [C. Vezina 等人, *J.Antibiot.* 28, 721 (1975); S.N. Sehgal 等人, *J.Antibiot.* 28, 727 (1975); H.A. Baker 等人, *J.Antibiot.* 31, 539 (1978); 美国专利号 3,929,992; 以及美国专利号 3,993,749]。雷帕霉素的免疫抑制作用已经得到阐述。另一种大环分子 FK-506 也已经显示为一种免疫抑制剂。这些化合物也已显示出对各种其他治疗适应症有用。雷帕霉素以 Rapamune® 的名称在商业上可以得到。

一种雷帕霉素酯,即 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸的雷帕霉素 42-酯[美国专利号 5,362,718 中阐述],也已知为 CCI-779,已经在各种肿瘤细胞系、体内动物肿瘤模型以及 I 期临床试验中显示出具有抗肿瘤活性。[Gibbons, J., *Proc. Am. Assoc. Can. Res.* 40:301 (1999); Georger, B., *Proc. Am. Assoc. Can. Res.* 40:603 (1999); Alexandre, J., *Proc. Am. Assoc. Can. Res.* 40:613 (1999); 和 Alexandre, J., *Clin. Cancer. Res.* 5 (November Supp.): Abstr. 7(1999)]。

已经阐述了利用标记前体化合物通过将这些化合物添加到发酵培养物中来标记雷帕霉素,所述标记前体化合物包括乙酸盐、丙酸盐或甲硫氨酸[N.L. Paive 和 A.L. Demain, *J Natl Products*, 54(1): 167-177 (Jan-Feb 1991)]、或莽草酸[P.A.S. Lowden, 等人, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40(4):777-779 (2001)]。在这些方法中,当细菌合成雷帕霉素时,某些标记的材料掺合到新产生的雷帕霉素中。标记的雷帕霉素从与其他分子的混合物中纯化,其中某些分子也可能携带标记。然而,这些方法提供的结果不一致,因为不是每个被分离的雷帕霉素分子都标记至相同程度,或在相同位置标记。

所需要的是产生均一标记的分子的特异性标记雷帕霉素的方法。

发明概述

本发明所述方法利用特异性甲基化酶以均一的方式单独标记雷帕霉素。存在于粗细胞提取物中的甲基化酶，在体外将标记的甲基基团添加到纯化的去甲基雷帕霉素中。在这个系统中，雷帕霉素是唯一被标记的分子。它可以用同位素标记例如放射性进行标记。使用标准方法分离标记的材料是非常简单的。基于其质量和/或放射性标记易于鉴定标记的雷帕霉素。

本发明的其他方面和优点由于下文的详述将是显而易见的。

发明详述

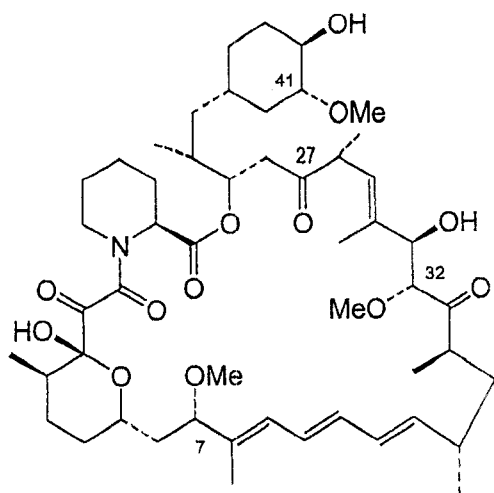
已经测序且分析了负责生物合成雷帕霉素的基因簇[Schwecke 等人, *PNAS USA* 92, 7839-43 (1995); Molnar 等人, *Gene* 169, 1-7(1996); Aparicio 等人, *Gene* 169, 9-16 (1996)]。核心多聚乙酰合成且环化后，对分子进行进一步修饰，所述合成及环化由 *rapA*、*rapB*、*rapC* 和 *rapP* 的蛋白产物介导。这些修饰中有氧化和甲基化。

rapI、*rapM* 和 *rapQ* 这三个基因已被鉴定为 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 依赖性甲基转移酶。RapI 使 C-41 羟基甲基化，而 RapM 和 RapQ 使 C-7 和 C-32 羟基基团甲基化[Chung 等人, *J. Antibiotics* 54, 250-256 (2001)]。

本发明方法利用这些雷帕霉素特异性甲基转移酶(甲基化酶)在体外有效标记去甲基雷帕霉素。

本发明方法中使用由基因 *rapI*、*rapM* 和 *rapQ* 编码的三种酶。本发明方法中可单独使用这些酶，或使用其混合物。

如本文所定义的，术语“雷帕霉素”定义了一类包含下列雷帕霉素核的免疫抑制化合物。



雷帕霉素

术语“去甲基雷帕霉素”是指一类包含所示的基本雷帕霉素核、但缺少一个或多个甲基基团的免疫抑制化合物。在一个实施方案中，雷帕霉素核在位置 7、32 或 41，或者在其组合位置缺少甲基基团。其他去甲基雷帕霉素的合成可以进行基因工程改造，从而在雷帕霉素核的其他位置缺少甲基基团。去甲基雷帕霉素的产生已经得到阐述。参见，例如，3-去甲基雷帕霉素[美国专利号 6,358,969]以及 17-去甲基雷帕霉素[美国专利号 6,670,168]。

术语“去甲基雷帕霉素”和“-O-去甲基雷帕霉素”在文献及本说明书中自始至终互换使用，除非另有说明。

根据本发明使用的雷帕霉素包括经化学或生物学修饰为雷帕霉素核衍生物、且还保留免疫抑制特性的化合物。相应地，术语“雷帕霉素”包括雷帕霉素的酯、醚、肟、胺及羟胺，以及其核上的官能团被修饰的雷帕霉素，例如通过还原或氧化进行修饰。术语“雷帕霉素”还包括药物学上可接受的雷帕霉素盐，其由于包含酸性或碱性部分，能够形成此类盐。

如本文所使用的，药物学上可接受的盐包括，但不限于，盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、氢氟酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、顺丁烯二酸盐、乙酸盐、乳酸盐、烟酸盐、琥珀酸盐、草酸盐、磷酸盐、丙二酸盐、水杨酸盐、苯乙酸盐、硬脂酸盐、嘧啶盐、铵盐、吡嗪盐、二乙胺盐、烟酰胺盐、甲酸盐、尿素盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐、锌盐、锂盐、肉桂酸盐、甲氨基盐、甲磺酸盐、苦味酸盐、酒石酸盐、三乙氨基盐、

二甲氨基盐以及三(羟甲基)氨基甲烷盐。其他药物学上可接受的盐是本领域技术人员已知的。

在一个实施方案中,雷帕霉素酯和醚是由雷帕霉素核的 42-和/或 31-位置的羟基基团形成的,在 27-位置的羟基基团的酯和醚 (27-酮化学还原后),而肟、腙及羟胺是由雷帕霉素核的 42-位置的酮(42-羟基基团氧化后)以及 27-酮形成的。

在另一个实施方案中,下列专利中阐述了雷帕霉素 42-和/或 31-酯和醚:雷帕霉素的烷基酯(美国专利号 4,316,885); 氨烷基酯(美国专利号 4,650,803); 氟化酯(美国专利号 5,100,883); 酰胺酯(美国专利号 5,118,667); 氨基甲酸酯 (美国专利号 5,118,678); 甲硅烷基醚(美国专利号 5,120,842); 氨基酯(美国专利号 5,130,307); 缩醛(美国专利号 5,51,413); 氨基二酯(美国专利号 5,162,333); 磺酸酯和硫酸酯 (美国专利号 5,177,203); 酯(美国专利号 5,221,670); 烷氧基酯(美国专利号 5,233,036); O-芳基、-烷基、-链烯基及-炔基醚(美国专利号 5,258,389); 碳酸酯(美国专利号 5,260,300); 芳基羰基和烷氧羰基氨基甲酸酯(美国专利号 5,262,423); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,302,584); 羟基酯(美国专利号 5,362,718); 受阻酯 (美国专利号 5,385,908); 杂环酯(美国专利号 5,385,909); 偕二取代酯(美国专利号 5,385,910); 氨基链烷酸酯(美国专利号 5,389,639); 磷酰氨基甲酸酯(美国专利号 5,391,730); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,411,967); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,434,260); 脒基氨基甲酸酯(美国专利号 5,463,048); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,480,988); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,480,989); 氨基甲酸酯(美国专利号 5,489,680); 受阻 N-氧化物酯 (美国专利号 5,491,231); 生物素酯(美国专利号 5,504,091); O-烷基醚(美国专利号 5,665,772); 以及 PEG 酯(美国专利号 5,780,462)。上文列出的专利阐述了这些酯和醚的制备。

在再一实施方案中,美国专利号 5,256,790 阐述了雷帕霉素 27-酯和醚。上文列出的专利阐述了这些酯和醚的制备。

在又一实施方案中,美国专利号 5,373,014、5,378,836、5,023,264 以及 5,563,145 阐述了雷帕霉素肟、腙及羟胺。上文列出的专利阐述了这些肟、腙和羟胺的制备。美国专利号 5,023,263 阐述了 42-氧雷帕霉素的制备。

在另一实施方案中，雷帕霉素包括雷帕霉素[美国专利号 3,929,992]、3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸的雷帕霉素 42-酯[美国专利号 5,362,718]以及 42-O-(2-羟基)乙基雷帕霉素[美国专利号 5,665,772]。美国专利号 5,362,718 和 6,277,983 阐述了雷帕霉素羟基酯，包括 CCI-779 的制备及应用。

虽然本文提供的实例阐述了 7-O-去甲基雷帕霉素 [美国专利号 6,399,626] 和 32-O-去甲基雷帕霉素的甲基化，但这些化合物不是本发明的限制。

1. rapI、rapM 和 rapQ 酶

在一个实施方案中，本文定义的雷帕霉素甲基化酶以来自吸水链霉菌的粗酶提取物形式使用。在进一步的实施方案中，粗酶提取物从吸水链霉菌细胞[从美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia)，保藏号 ATCC29253，或从其他来源获得]中制备。在一个实施方案中，使用如 Kim 等所述方法摇瓶发酵培养这些细胞(Kim, W-S 等人, 2000, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2908-2910)。在另一实施方案中，为了制备无细胞提取物，通过离心收集细胞，并在约 20 mL 适当的缓冲液中重悬浮约 1 克的细胞材料。在再一实施方案中，缓冲液是 pH 约为 6 的 50mM 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)。在又一实施方案中，缓冲液是 pH 为 7.5 的 50mM 磷酸钾。随后破裂细胞并通过离心去除细胞碎片。在一个实施方案中，上清液在冷冻，例如在-70℃冷冻之前调整至~10%甘油。在其他实施方案中，从细胞培养物中制备粗酶提取物的替代方法对本领域技术人员是显而易见的。

在再一实施方案中，通过经典蛋白分离法，例如硫酸铵沉淀、柱层析等，进一步纯化这些酶。

在又一实施方案中，通过重组技术利用经典的体外转录和翻译方法合成这些酶。

在 PubMed NCBI 在线数据库中，吸水链霉菌的登录号 X86780 下可获得 *rapI*、*rapM* 和 *rapQ* 酶基因的核酸序列。*rapQ* 甲基化酶基因的核酸序列位于 CDS 的 nt 90798-91433 处；蛋白质 ID# CAA60463.1 提供其氨基酸序列。*rapM* 甲基化酶基因的核酸序列位于 CDS 的 nt 92992-93945 的互补物处；蛋白质 ID# CAA60466.1 提供其氨基酸序

列。rapI 甲基化酶基因的核酸序列位于 CDS 的 nt 97622-98404 处；蛋白质 ID# CAA604701 提供其氨基酸序列。也参见 T. Schwecke 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (17), 7839-7843 (1995); I. Molnar 等人, *Gene* 169 (1), 1-7 (1996), 以及 J. F. Aparicio 等人, *Gene* 169 (1), 9-16 (1996)。前述核酸和氨基酸序列特此引入作为参考。

在另一实施方案中, 将本文所述编码雷帕霉素甲基化酶的基因克隆至一个适当的载体中, 所述载体与控制其表达的调控序列可操作地连接。如本文所使用的, “可操作地连接”的序列包括与目的基因邻接的表达控制序列和反式或相隔一段距离发生作用以控制目的基因的表达控制序列两者。表达控制序列包括适当的转录起始(启动子)和终止; 增强翻译效率的序列(例如, Shine-Dalgarno 位点或核糖体结合位点); 以及需要时, 增强编码的产物分泌的序列。大量的表达控制序列, 包括天然的、组成型和/或诱导型启动子, 是本领域已知的且可以被利用。

在一个实施方案中, 调控序列包括一个可调节或可诱导的启动子。许多此类可调节或可诱导的启动子系统已经被阐述且可以从各种来源获得。诱导型启动子使得能够调节基因表达并可通过外源提供的化合物或环境因素例如温度进行调节。诱导型启动子和诱导型系统可从各种商业来源获得, 包括, 例如且不限于, Invitrogen、Clontech 和 Ariad。许多其他系统也已经被阐述且很容易被本领域的技术人员选择。例如, 诱导型启动子包括 T7 聚合酶启动子系统[国际专利公开号 WO 98/10088]。在一个实施方案中, 选择系统用于细菌系统。

在另一实施方案中, 如下文所述, 一个或多个编码所述酶的基因被克隆至商业载体中, 即, pET24 诱导型质粒表达载体[Novagen], 所述载体在诱导型启动子下表达该酶。然而, 本领域的技术人员很容易选择另一种载体和/或另一个适当的、表达该酶的启动子。

所述载体可以是本领域已知的或上述的任何载体, 包括裸 DNA、质粒、噬菌体、转座子、粘粒、附加体、病毒等。通过本领域已知的或上述的任何方法, 包括转化、转导和电穿孔, 可以实现将载体导入宿主细胞。利用熟练技术人员已知的并且如说明书自始至终讨论的技术也可以实现将分子(如质粒或病毒)导入宿主细胞。在一个实施方案中, 使用标准转化技术, 例如, CaCl_2 介导的转化或电穿孔。

一旦克隆到适当的表达载体中,编码该酶的核酸序列就被导入适当的宿主细胞中进行表达。在一个实施方案中,适当的宿主细胞选自原核(即,细菌)细胞。在下文的实施例,宿主细胞为大肠杆菌(*Escherichia coli*)细胞。然而,本领域的技术人员可以很容易地选择另一种合适的宿主细胞用于表达所选择的酶。

在一个实施方案中,如下文所述,利用重组技术制备粗酶提取物。[一般参见, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY] 例如,在允许甲基化酶表达的条件下培养转导了雷帕霉素甲基化酶基因的细胞。在可诱导或可调节的蛋白质的情况下,这些条件包括提供诱导剂。培养后,细胞通过离心沉淀并在适当的缓冲液中重悬浮,适当的缓冲液包括还原剂以及磷酸盐缓冲液, pH 调整为中性 pH。在一个实施方案中,缓冲液包括 pH 为 7-7.5 的 50-100 mM 磷酸钾缓冲液,其中包含 1 mM-2 mM 的 β -巯基乙醇。在另一实施方案中,添加溶菌酶至终浓度为 100 μ g/ml。在再一实施方案中,以 0.5-2.0 μ L/mL 细胞添加适当的核酸酶[例如, BenzonaseTM 核酸酶]。在又一实施方案中,使细胞悬浮液在 30 $^{\circ}$ C 温育例如 15 分钟。在再一实施方案中,以终浓度为 0.5-1.5 mM 向细胞添加蛋白酶抑制剂(例如, 苯甲基磺酰氟(PMSF))。

在进一步的实施方案中,细胞通过适当方法破裂。在一个实施方案中,通过机械方法进行破裂,例如,在冰上通过超声处理。去除细胞碎片并将所得到的上清液在冷冻前调整至 5-15% 甘油(v/v)。所得到的粗酶提取物现在可用于本发明的雷帕霉素特异性甲基化反应。

在其他实施方案中,产生和分离所述酶的替代方法对于本领域的技术人员是显而易见的[Sambrook J 等人, 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition)*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]。

所述产生、纯化及分离方法不是本发明的限制。

II. 甲基化反应

利用如本文所述的雷帕霉素甲基化酶,或者作为粗提取物或者以另一种适当的形式,甲基化反应进行如下。将大约 45-65% v/v 甲

基化酶粗提取物加入反应物中，所述反应物包含约 8-130 μM 去甲基雷帕霉素溶液、约 0.2-0.4 mM 甲基化试剂、约 4-10 mM 镁(Mg, 例如 MgSO_4)以及浓度约为 50-100 mM 的适当的缓冲液，pH 调整为 6.5 - 7.5。在另一实施方案中，一种更纯化形式的甲基化酶所用体积更小，例如，约 10 - 约 45 % v/v 甲基化酶。

在一个实施方案中，甲基供体为 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM)。当被选择用于本发明时，SAM 一般存在的终浓度为约 0.2-0.4 mM。

在另一实施方案中，雷帕霉素溶液是在适当的溶剂中有约 0.5 mg/mL - 约 5 mg/mL、约 1 mg/mL - 3 mg/mL 或约 1 mg/mL 雷帕霉素。对于所选择的雷帕霉素适合的溶剂包括甲醇、乙醇和二甲基甲酰胺、四氢呋喃，或其混合物。

适当的缓冲液可以容易地选自生理学相容的缓冲液，包括，例如磷酸缓冲盐水、2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES) 缓冲液、三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris)缓冲液或磷酸钾缓冲液。

这些组分混合后，可以进行反应。反应温度可以在 20°C - 约 37°C 之间变动约 0.5 - 3 小时，或约 1 - 2 小时。在一个实施方案中，反应混合物在约 34°C 温育约 1 小时。

在培养结束时，添加 1 - 2 体积的淬灭反应物 (quenching reaction) 终止反应，例如，乙醇、甲醇或乙酸乙酯。

通过常规方法去除沉淀的材料。在一个实施方案中，通过离心去除沉淀的材料。在进一步的实施方案中，在 14,000 rpm 进行 10 分钟离心。然而，其他去除方法和/或离心条件是本领域已知的。

通过本领域技术人员已知的任何适当的方法可以实现纯化。适当的方法包括再结晶、硅胶柱层析、薄层层析(TLC)和高效液相层析(HPLC)。在一个实施方案中，使用 C18 柱(3.9 × 150mm) 在 45°C 用包括 60 % 二噁烷、0.05 % 乙酸和 0.03 % 三乙胺的流动相进行 HPLC 分析。在另一实施方案中，使用 C18 柱(4.6 × 250 mm)以在 75 分钟期间从 40 % A:60 % B 变为 15 % A: 85 % B 的流动相梯度进行 HPLC 分析，其中溶剂 A 为 10mM 乙酸铵水而溶剂 B 为甲醇。

III. 组合物及用途

需要标记的雷帕霉素以研究和/或监控雷帕霉素在体内的代谢命

运。在一个实施方案中，将标记的雷帕霉素用于鉴定与雷帕霉素结合的细胞/结构。可以用密度或者放射性标记来均一标记雷帕霉素。用所述方式标记的雷帕霉素将具有未标记的、天然的雷帕霉素的构象及特性，但由于一致地掺合的密度或放射性标记而易于检测。

在一个实施方案中，本发明提供了用于雷帕霉素的特异性标记的试剂盒，其包括本文所述的一种或多种酶。该试剂盒可进一步包含附加组分，例如，阳性对照（例如，甲基化雷帕霉素）、阴性对照、试剂（例如，缓冲液、溶菌酶、核酸酶）、小瓶、管以及执行本发明方法的使用说明书。

在特定情况下，需要在包含生理学相容载体的组合物中送递根据本发明制造的标记的雷帕霉素。所述组合物是有优势的，因为使用本领域技术人员已知的技术，例如，尤其是，质谱分析或闪烁计数，很容易追踪（即，监控）根据本发明制造的标记的雷帕霉素化合物。

下列实施例是用于雷帕霉素特异性甲基化的本发明方法的例证。阅读了本发明详细描述后很容易理解这些实施例不将本发明限于所阐述的反应条件和试剂。

实施例

A. 扩增甲基化酶基因

利用已公开的雷帕霉素基因簇序列设计的寡核苷酸引物从吸水链霉菌 ATCC29253 基因组 DNA 扩增所述基因(Schwecke, T.等人, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7839-7843)。随后利用 Novagen pET24 诱导型质粒表达载体在大肠杆菌菌株 BL21(DE3)细胞中表达 RapI、RapM 和 RapQ 蛋白。在这个载体中，通过 T7 RNA 聚合酶由 T7 启动子表达被克隆的基因，并通过添加 IPTG 激活表达。

B. 制备酶提取物

为了建立体外甲基化反应的最佳条件，从使用如 Kim 等所述方法摇瓶发酵培养的吸水链霉菌 [ATCC29253] 细胞制备粗酶提取物 (Kim, W-S. 等人, 2000, Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2908-2910)。通过离心收集细胞，用 pH6.0 的 0.2 M MES 缓冲液洗涤，并将细胞沉淀在提取之前进行冷冻。约 8 g - 10 g 解冻的细胞材料在 20mL pH6.0 的 50 mM MES 缓冲液中重悬浮。对于克隆的甲基化酶

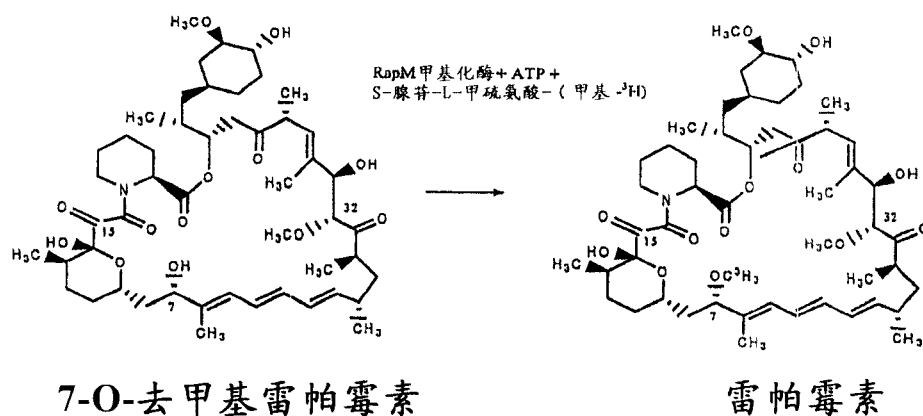
蛋白的粗提取物, 通过离心收集 25 mL 诱导的细胞培养物并冷冻沉淀。在含有 1 mM β -巯基乙醇的 10 mL pH 7.5 的 50 mM 磷酸钾缓冲液中重悬浮沉淀。其后, 添加溶菌酶至终浓度为 100 μ g/ml 并添加 BenzonaseTM 核酸酶(1 μ L/mL 细胞)。将细胞在冰上超声处理 1 - 2 分钟, 并通过 $\sim 30,000 \times g$ 4 $^{\circ}$ C 离心 15 分钟去除细胞碎片。将上清液在 -70 $^{\circ}$ C 冷冻之前调整至 $\sim 10\%$ 甘油。

C. 甲基化 7-去甲基雷帕霉素

将约 65 μ L 甲基化酶粗提取物加入反应物中, 所述反应物包含 3 μ L 1mg/mL 7-去甲基雷帕霉素(7-dmr)溶液、5 μ L 4mM SAM、4 μ L 0.1M $MgSO_4$ 以及 23 μ L 0.5M 磷酸盐缓冲液, pH 调整为 7.5。使用重组细胞提取物的甲基化反应如上所述进行, 只是除了使用 50 μ L 提取物和 38 μ L 缓冲液。包含 RapM 甲基化酶提取物和两种去甲基雷帕霉素底物 7-O-去甲基雷帕霉素(7-dmr 和 32-O-去甲基雷帕霉素的反应物的 HPLC 层析谱显示, 只有当 7-dmr 为底物时 RapM 甲基化酶生成雷帕霉素 (rapa)。该酶不修饰 32-dmr, 提示该克隆的酶在体外保留其底物特异性。此外, 无 SAM 添加的样品显示没有 7-dmr 转化为雷帕霉素。

D. 用含氘甲基 SAM 标记雷帕霉素

为了标记雷帕霉素, 利用了相同类型的体外反应。例如, RapM 甲基化反应混合物包含下列物质: 10 μ L pH 7.5 的 0.5M KPO_4 缓冲液、4 μ L 0.1M $MgSO_4$ 、33 μ L 100 μ M S-腺苷-L-甲硫氨酸-(甲基- 3H)、3 μ L 1mg/mL 7-去甲基雷帕霉素 (溶于乙醇中) 以及 50 μ L 粗提取物。下列方案显示了标记的雷帕霉素分子的一个实例, 所述分子通过 RapM 甲基化酶作用于 7-dmr 底物生成。



通过 HPLC 分析由雷帕霉素标准无法区别含氘的材料。质谱数据显示标记的材料与含氘的雷帕霉素一致。

本发明不限于本文所述具体实施方案的范围内。实际上，由于前文所述及附图，除本文所述修改之外的本发明的各种修改对于本领域的技术人员将是显而易见的。此类修改预期包括在附加权利要求的范围内。

应进一步理解值是近似的且提供用于进行说明。

本申请自始至终列出了专利、专利申请、出版物、方法等，其公开内容在此整体引入本文作为参考。就本说明书和另一个文件可能存在的冲突而言，以本公开内容的语言为准。