



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105132387 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510454828. 9

(22) 申请日 2009. 12. 22

(30) 优先权数据

61/140, 053 2008. 12. 22 US

(62) 分案原申请数据

200980157048. 0 2009. 12. 22

(71) 申请人 绿光生物科学公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 小利兰斯坦福大学理事会

(72) 发明人 安德雷·J·扎鲁尔

詹姆斯·斯沃茨

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限

责任公司 11287

代理人 江葳

(51) Int. Cl.

C12N 9/00(2006. 01)

C12P 7/42(2006. 01)

C12R 1/19(2006. 01)

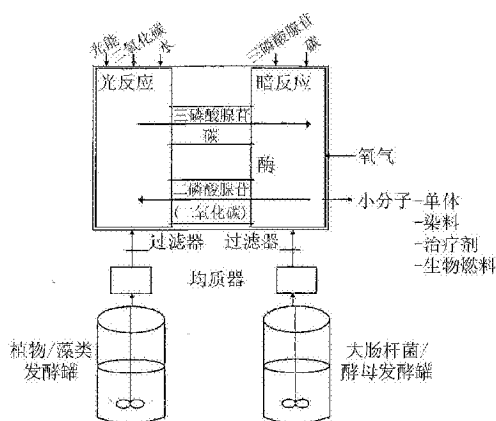
权利要求书2页 说明书17页 附图2页

(54) 发明名称

用于制造化合物的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供适用于制造化合物的组合物和方法。



1. 一种用于合成化合物的分离的无细胞的组合物,所述组合物包含:

(a) 包含可操作地连接至异种启动子的编码序列的经遗传修饰的大肠杆菌细胞的溶解产物或细胞提取物,其中所述编码序列编码至少一种用于合成所述化合物的酶;

(b) 葡萄糖;

(c) 所述化合物的前体;和

(d) 三磷酸腺苷(ATP)再生系统,其包含丙酮酸激酶并使用无机磷酸盐产生ATP;

其中,所述化合物是治疗性化合物或其前体、药物前体、烃、精细化学品、工业化学品、染料或燃料代用品,以及其中所述组合物包括辅因子、酶和合成所述化合物必需的其它试剂。

2. 根据权利要求1所述的分离的无细胞的组合物,其中所述酶和所述ATP再生系统是来自于相同来源。

3. 根据权利要求1所述的分离的无细胞的组合物,其中所述酶和所述ATP再生系统是来自于独立来源。

4. 根据权利要求1所述的分离的无细胞的组合物,其中所述化合物是莽草酸。

5. 根据权利要求4所述的分离的无细胞的组合物,其中所述分离的组合物包含选自由以下组成的群组的酶:3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶和其组合。

6. 根据权利要求3所述的分离的无细胞的组合物,其中所述独立来源选自由无细胞提取物、细胞溶解产物、体外反应物和其组合组成的群组。

7. 根据权利要求1所述的分离的无细胞的组合物,其进一步包含蛋白酶抑制剂、氨基酸、核糖体、编码催化形成化合物的酶的氨基酸序列的RNA、RNA聚合酶、编码催化形成化合物的酶的核苷酸序列的DNA,或其组合。

8. 根据权利要求1所述的分离的无细胞的组合物,其中所述化合物选自由以下组成的群组的治疗性化合物:抗生素、杀生物剂和抗癌化合物。

9. 一种用于合成化合物的无细胞的方法,所述方法包含:

提供(a)包含可操作地连接至异种启动子的编码序列的经遗传修饰的大肠杆菌细胞的溶解产物或细胞提取物,其中所述编码序列编码至少一种用于合成所述化合物的酶;(b)葡萄糖;(c)所述化合物的前体;(d)三磷酸腺苷(ATP)再生系统,其包含丙酮酸激酶并使用无机磷酸盐产生ATP;和(e)辅因子、酶和合成所述化合物必需的其它试剂;从而形成体外无细胞反应物;以及培育所述体外无细胞反应物以合成所述化合物;

其中,所述化合物是治疗性化合物或其前体、药物前体、烃、精细化学品、工业化学品、染料或燃料代用品。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述化合物为莽草酸。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述体外无细胞反应物包含选自由以下组成的群组的酶:3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶和其组合。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述体外无细胞反应物进一步包含提供选自由蛋白酶抑制剂、氨基酸、核糖体、编码催化形成化合物的酶的氨基酸序列的RNA、RNA聚合酶、编码催化形成化合物的酶的核苷酸序列的DNA和其组合组成的群组的组分。

13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述组分是在一个以上步骤中添加。
14. 根据权利要求 9 所述的方法,其进一步包含用于纯化所述合成的化合物的步骤。
15. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述化合物选自由以下组成的群组的治疗性化合物:抗生素、杀生物剂和抗癌化合物。
16. 一种用于合成莽草酸的方法,所述方法包含:  
提供 (a) 包含可操作地连接至异种启动子的编码序列的经遗传修饰的大肠杆菌细胞的溶解产物或细胞提取物,其中所述编码序列编码如下的酶:3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶、或其组合;  
(b) 葡萄糖;(c) 前体,其是磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、4-磷酸赤藓糖(E4P)、3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)、脱氢奎尼酸、脱氢莽草酸、或其组合;(d) 三磷酸腺苷(ATP)再生系统,其包含丙酮酸激酶并使用无机磷酸盐产生 ATP;和(e) 辅因子、酶和合成所述化合物必需的其它试剂;从而形成体外无细胞反应物;以及  
培育所述体外无细胞反应物,由此合成莽草酸。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述体外无细胞反应物进一步包含提供选自蛋白酶抑制剂、氨基酸、核糖体、编码催化形成化合物的酶的氨基酸序列的 RNA、RNA 聚合酶、编码催化形成化合物的酶的核苷酸序列的 DNA 和其组合组成的群组的组分。
18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述组分是在一个以上步骤中添加。
19. 根据权利要求 16 所述的方法,其进一步包含用于纯化莽草酸的步骤。

## 用于制造化合物的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2009年12月22日、申请号为200980157048.0、发明名称为“用于制造化合物的组合物和方法”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本申请涉及用于制造化合物的组合物和方法。

[0003] 相关申请案的交叉参考

[0004] 本申请案主张2008年12月22日申请的美国临时申请案第61/140,053号的权益，该案完整内容以引用的方式并入本文中。

### 背景技术

[0005] 尽管工业发酵取得了进步，而且生物技术也得到了发展，但当前的方法仍不允许大规模（工业或商业规模）批量制造某些化合物。举例来说，例如在制造生物燃料的过程中产生的大多数直链和芳香族烃是细胞生长的强抑制剂。因此，生物化学合成局限于天然产物（例如，维生素、酶、抗体）以及高价值、小体积的合成物。尽管如此，无法通过工业发酵制造的含碳中性合成产品和细胞毒性产品仍存在较大市场。因此，需要能够大规模制造难以合成的化合物，包括例如杀生物剂、抗生素和抗癌化合物等有治疗益处的化合物的替代性制造方法。

[0006] 疾病控制与预防中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 预计，每年有介于5%与20%之间的美国人将发生流感。根据CDC，约200,000人将因流感并发症而住院治疗，且多达36,000人会因患病而死亡。患流感风险最高的人是老年人、儿童以及具有慢性健康状况的人。通常感染鸟类（包括家禽）的禽流感引起了更多且更特殊的问题。由于这些病毒一般不感染人类，使得人们只有极少的针对这些病毒的免疫防护或没有免疫防护。在2003年末和2004年初期间亚洲的家禽爆发禽流感（即，A型流感(H5N1)病毒）后，世卫组织(World Health Organization)报导自2004年1月起有超过130例人感染病例，且迄今已有70人因感染禽流感而死亡。

[0007] 奥司他韦(Oseltamivir)是一种用于治疗 and 预防A型流感和B型流感的神经氨酸酶抑制剂，且普遍认为其最适用于治疗禽流感。磷酸奥司他韦，作为首个商业开发的口服活性神经氨酸酶抑制剂，是由吉利德科技公司(Gilead Sciences)所开发，并且目前由霍夫曼·罗氏公司(Hoffman-La Roche, Roche)以商品名TAMIFLU上市销售。作为流感病毒复制必需的神经氨酸酶的抑制剂，TAMIFLU对H5N1和H7N7病毒株有效。在2005年东南亚H5N1禽流感大爆发期间，TAMIFLU得到广泛使用。然而，预计目前TAMIFLU的供应仅覆盖世界2%的人口。TAMIFLU制造中的主要瓶颈是莽草酸的利用率，莽草酸是一种源自植物的天然存在的化合物。尽管已知用于合成莽草酸的化学反应，但目前合成莽草酸的方法涉及可能发生爆炸的叠氮化(azide chemistry)，而且很难在商业规模上大量合成莽草酸。

[0008] 全世界的中央政府和医学界都已经认识到，为应对可能发生的全球大规模流行病，迫切需要大规模制造和储存治疗剂，例如TAMIFLU。举例来说，尽管针对流感的疗法取得

了进步,但当前用于治疗流感的方法不足以应对全球或甚至国家范围的紧急事件。因此,迫切需要制造适用于治疗感染性疾病的化合物。

## 发明内容

[0009] 如下文所述,本发明提供用于制造相关化合物(例如有治疗作用的化合物或其前体)的组合物和系统。

[0010] 一方面,本发明提供一种分离的组合物,其含有催化形成化合物的酶和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)再生系统,其中所述酶和所述ATP再生系统是从相同来源或独立来源获得,且其中至少一种来源是无细胞提取物。

[0011] 另一方面,本发明提供一种用于合成化合物的体外无细胞系统,所述系统含有碳源、磷酸盐源、水、催化形成化合物的酶、能源、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate,ADP)和三磷酸腺苷(ATP)再生系统。

[0012] 另一方面,本发明提供一种用于合成化合物的方法,所述方法涉及提供包括碳源、磷酸盐源、水、催化形成化合物的酶、能源、二磷酸腺苷(ADP)和三磷酸腺苷(ATP)再生系统的组分,以形成体外无细胞反应物;以及培育所述体外无细胞反应物以合成所述化合物。

[0013] 又一方面,本发明提供一种用于合成莽草酸的方法,所述方法涉及提供包括莽草酸前体、ATP源和催化形成莽草酸的酶的组分,以形成体外无细胞反应物;以及培育所述体外无细胞反应物,由此合成莽草酸。

[0014] 另一方面,本发明提供一种分离的组合物,其包含选自由3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate,DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶或其组合组成的群组的酶,以及三磷酸腺苷ATP再生系统,其中所述酶和所述ATP再生系统是从相同来源或独立来源获得,其中至少一种来源是无细胞提取物。

[0015] 另一方面,本发明提供一种用于合成化合物的体外无细胞系统,其含有碳源、磷酸盐源、水、能源、二磷酸腺苷(ADP)、光合三磷酸腺苷(ATP)再生系统,以及包括3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶或其组合的酶。

[0016] 另一方面,本发明提供一种用于合成化合物的方法,所述方法涉及提供包括碳源、磷酸盐源、水、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)再生系统以及选自由3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸(DAHP)合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶或其组合组成的群组的酶的组分,以形成体外无细胞反应物;以及培育所述体外无细胞反应物,以合成所述化合物。

[0017] 在任一上述方面的各种实施例中,酶和ATP再生系统是从独立来源获得。所述来源可独立选自无细胞提取物、体外反应物或其组合。在任一上述方面的各种实施例中,体外无细胞系统进一步包括体外合成的化合物(例如,在各种实施例中,莽草酸是体外合成的)。在任一上述方面的各种实施例中,ATP再生系统是光合ATP再生系统。在任一上述方面的各种实施例中,ATP再生系统是从植物、藻类或蓝藻细菌分离。在任一上述方面的各种实施例中,ATP再生系统含有类囊体膜。在任一上述方面的各种实施例中,ATP再生系统含有叶绿体。

[0018] 在任一上述方面的各种实施例中,ATP 再生系统含有 ATP 合成酶、细胞色素  $b_6-f$  复合物、质体蓝素和光系统 1 (photosystem 1, PS1) 复合物。在特定实施例中,PS1 复合物包含多肽 PsaA 至 PsaS,以及分子叶绿素 700、叶绿醌、 $Fe_4S_4$ 和类胡萝卜素;且细胞色素  $b_6-f$  复合物包含细胞色素  $b_6$ 、细胞色素  $f$ 、铁-硫蛋白、细胞色素  $b_6-f$  亚基 IV,以及分子血红素  $b_L$ 、血红素  $b_H$ 、血红素  $c$  和  $Fe_2S_2$ 。

[0019] 在任一上述方面的各种实施例中,ATP 再生系统含有光系统 2 (PS2) 复合物和质体醌。在任一上述方面的各种实施例中,ATP 再生系统包含 ATP 合成酶、光系统 2 (PS2) 复合物、质体醌和细胞色素  $b_6-f$  复合物。在特定实施例中,PS2 复合物包含多肽 Cp43、Cp47、PsbO、PsbP、PsbQ、PsbE、PsbF、锰稳定蛋白,以及分子叶绿素 680、脱镁叶绿素 (pheophytin)、醌、 $\beta$  胡萝卜素和血红素 b559。

[0020] 在任一上述方面的各种实施例中,酶是从溶解产物获得或通过体外翻译合成的多肽。在任一上述方面的各种实施例中,化合物是治疗性化合物、治疗性化合物的前体或染料。在特定实施例中,治疗性化合物是用于治疗流感。在特定实施例中,化合物是莽草酸或莽草酸前体。在任一上述方面的各种实施例中,分离的组合物含有酶 3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸 (DAHP) 合成酶、脱氢奎尼酸合成酶、脱氢奎尼酸脱水酶、脱氢莽草酸脱氢酶或其组合。

[0021] 在各种实施例中,体外无细胞系统进一步含有蛋白酶抑制剂、氨基酸、核糖体、编码催化形成化合物的酶的氨基酸序列的 RNA、RNA 聚合酶、编码催化形成化合物的酶的核苷酸序列的 DNA,或其组合。

[0022] 在各种实施例中,碳源是化合物的前体。在各种实施例中,各组分是在一个以上步骤中添加。在各种实施例中,所述方法进一步包含纯化合成的化合物的步骤。

[0023] 在各种实施例中,莽草酸的前体是磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP)、4-磷酸赤藓糖 (erythrose 4-phosphate, E4P)、3-脱氧-D-阿拉伯-庚酮糖酸 (DAHP)、脱氢奎尼酸、脱氢莽草酸,或其组合。

[0024] 在各种实施例中,体外无细胞反应进一步涉及提供包括蛋白酶抑制剂、氨基酸、核糖体、编码催化形成化合物的酶的氨基酸序列的 RNA、RNA 聚合酶、编码催化形成化合物的酶的核苷酸序列的 DNA 或其组合的组分。

[0025] 在各种实施例中,ATP 再生系统或体外无细胞系统含有丙酮酸激酶 (pyruvate kinase, PK)。在各种实施例中,ATP 再生系统或体外无细胞系统进一步含有磷酸葡萄糖异构酶、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase, PKK-1)、二磷酸果糖醛缩酶 (fructose bisphosphate aldolase)、磷酸丙糖异构酶 (triosephosphate isomerase, TPI)、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GADPH)、磷酸甘油酸激酶 (phosphoglycerate kinase, PGK)、磷酸甘油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase, PGM) 和烯醇酶。在各种实施例中,ATP 再生系统或体外无细胞系统进一步含有己糖激酶 (hexokinase, HK)。在各种实施例中,能源包括葡萄糖、6-磷酸葡萄糖、磷酸烯醇丙酮酸或其组合。

[0026] 本发明的其它特征和益处将从以下实施方式和权利要求书显而易见。

## 附图说明

[0027] 图 1 是描绘用于制造化合物的系统的示意图,在所述系统中,ATP 再生系统与合成相关化合物的酶途径的组分相结合。

[0028] 图 2 是描绘光合途径以及产生三磷酸腺苷 (ATP) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的示意图。

[0029] 图 3 是描绘莽草酸生物合成途径的示意图。

[0030] 图 4 是描绘用于制造莽草酸的系统的示意图,其中涉及由光合 ATP 再生系统产生的 ATP。

## 具体实施方式

[0031] 本发明提供适用于制造难以大规模(例如工业或商业规模)合成的化合物的组合物和方法。这些化合物的制造可能因成本过高而受到限制,或者与制造方法不相容,例如在基于细胞的制造方法中出现的细胞毒性。本发明发现,在无细胞系统中,三磷酸腺苷(ATP)再生系统可与需要 ATP 的酶或酶途径相结合,以合成相关化合物。在特定实施例中,ATP 再生系统是循环的无细胞光合磷酸化系统,例如光合 ATP 再生系统。以光能形式提供的能量,例如太阳能,可提供给无细胞光合磷酸化系统产生 ATP。这一系统对于制造复杂的治疗性化合物或这些化合物的前体(例如莽草酸)特别有益。

[0032] 定义

[0033] 除非另作定义,否则本文中使用的所有科技术语都具有本发明所属领域技术人员通常所了解的含义。以下参考文献将为所属领域技术人员提供本发明所用许多术语的一般定义:辛格顿(Singleton)等人,微生物学与分子生物学词典(Dictionary of Microbiology and Molecular Biology)(第 2 版,1994);剑桥科技词典(The Cambridge Dictionary of Science and Technology)(沃克(Walker)编,1988);遗传学词汇(The Glossary of Genetics),第 5 版,雷格(R. Rieger)等人(编),施普林格维拉格出版社(Springer Verlag)(1991);以及哈利(Hale)和马哈姆(Marham),哈普柯林斯生物学词典(The Harper Collins Dictionary of Biology)(1991)。除非另作规定,否则本文中使用的以下术语的含义如下所述。

[0034] 本文中使用的“三磷酸腺苷再生系统”或“ATP 再生系统”是指用于制造三磷酸腺苷的系统。在一个实施例中,三磷酸腺苷(ATP)是由二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸盐产生。在特定实施例中,ATP 再生系统包含 ATP 合成酶、细胞色素  $b_6-f$  复合物、质体蓝素和光系统 1(PS1)复合物。在另一特定实施例中,ATP 再生系统包含 ATP 合成酶、光系统 2(PS2)复合物、质体醌和细胞色素  $b_6-f$  复合物。此项技术中已知光合 ATP 再生系统的组分,包括多肽和其辅因子(例如参见,艾伯特(Alberts)等人,细胞分子生物学(Molecular Biology of the Cell),2002;伯格(Berg)等人,生物化学(Biochemistry),2002;罗迪希(Lodish)等人,分子细胞生物学(Molecular Cell Biology),1999)。

[0035] 本文中使用的“叶绿体”是指在植物细胞和真核藻类中可见的进行光合作用的细胞器。叶绿体吸收光,并使用光结合水和二氧化碳产生碳水化合物(例如,在绿色植物中用于产生能量和物质)。叶绿体存在于藻类和绿色植物(例如绿色植物界(Viridiplantae、Viridiphyta 或 Chlorobionta))中。叶绿体将光能转化成 ATP 形式的潜在化学能,并通过光合作用将 NADP 还原成 NADPH。

[0036] 本文中使用的“体外反应”是指在受控制的环境（例如，实验环境或活有机体外部的环境）中进行的反应。

[0037] 本文中使用的“无细胞”是指含有细胞组分的非生命系统，例如体外或离体系统。无细胞系统组分的来源包括细胞提取物和溶解产物。无细胞系统能够复原细胞反应，例如酶和代谢途径。

[0038] 本文中在提到本发明时使用的“相同来源”是指两种或两种以上来源的组分具有共同起源的组分的来源。本文中在提到本发明时使用的“独立来源”是指两种或两种以上来源的组分具有不同起源（例如外部来源）的组分的来源。在提到本发明时，提供的组分可以是非固有的（例如来自独立来源）或来自外部来源（例如对于系统或反应为外部的来源）。

[0039] 本文使用的“精细化学品”是指利用化学反应在商业上制造成用于特别专业的应用的纯单一化学物质。制造的精细化学品可归类为活性医药成分和其中间物、杀生物剂和用于技术应用的专用化学品。与通过标准化反应大量制造的散装化学品的制造相比较，精细化学品的制造一般较为昂贵（单位重量），并且产生较多的废料。精细化学品与只在实验室制造的研究用化学品不同，其可以工业量制造。

[0040] 本文中使用的术语“分离的”、“纯化的”或“生物纯”是指材料在不同程度上不含如在天然状态下可见的通常伴随其的组分。根据本发明的需求，在本文所述不同方法中，可应用各种纯度水平；如果未另外规定标准，那么可以使用此项技术中已知的惯用纯度标准。

[0041] 本文中使用的“光合磷酸化”是指一种光依赖性反应，这一反应可例如使用太阳能产生三磷酸腺苷 (ATP)。在光合磷酸化过程中，使用光能产生高能电子供体和较低能量的电子受体。随后，电子经由电子传递链从供体移到受体。氧化还原反应与用于产生 ATP 的系统相结合。

[0042] 本文中使用的“光合作用”是指将光能转化成化学能的代谢途径。在光合作用中，“光依赖性反应”或“光合反应”通过光合磷酸化产生三磷酸腺苷 (ATP) 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH)。在光依赖性反应中，使用光能激发电子，在电子传递链中产生一系列氧化还原反应，由此产生例如跨类囊体膜的跨膜电化学电位梯度。质子梯度形式的跨膜电化学电位梯度将向 ATP 合成酶多肽复合物供能。ATP 合成酶复合物由 ADP 和无机磷酸盐产生 ATP。光依赖性反应中所涉及的光合途径的组分包括 ATP 合成酶、细胞色素  $b_6-f$  复合物、质体蓝素、质体醌、光系统 1 (PS1) 复合物和光系统 2 (PS2) 复合物。在“光依赖性反应”或“暗反应”中，化学反应将二氧化碳和其它化合物转化成葡萄糖，例如卡尔文 - 本松循环 (Calvin-Benson cycle)。光合途径可例如见于植物、藻类、细菌（例如蓝藻细菌）中。

[0043] 本文中使用的“光系统”是指光合作用中所涉及的多肽与辅因子的复合物。光系统传递光能并通过电子传递链传递电子。“光系统 1”或“PS1”是指多肽与辅因子的复合物，包括多肽 PsaA、PsaB、PsaC、Ps-PsaS，以及分子叶绿素 700、叶绿醌、 $Fe_4S_4$  和类胡萝卜素；且细胞色素  $b_6-f$  复合物包含细胞色素  $b_6$ 、细胞色素 f、铁 - 硫蛋白、细胞色素  $b_6-f$  亚基 IV，以及分子血红素  $b_L$ 、血红素  $b_H$ 、血红素 c 和  $Fe_2S_2$ 。“光系统 2”或“PS2”是指多肽与辅因子的复合物，包括多肽 Cp43、Cp47、Psb0、PsbP、PsbQ、PsbE、PsbF、锰稳定蛋白，以及分子叶绿素 680、脱镁叶绿素、醌、 $\beta$  胡萝卜素和血红素 b559。

[0044] 本文中使用的“类囊体”是指叶绿体和蓝藻细菌内涉及光合作用的膜结合区室。



[0045] 本文中使用的“类囊体膜”是指类囊体中的膜,其含有光合途径的组分(包括 PS1 和 PS2 复合物,以及电子传递途径所含的多肽)或与这些组分物理相互作用。

[0046] 适用于本发明方法中的核酸分子包括编码本发明多肽或其片段的任何核酸分子。这些核酸分子无需与内源核酸分子序列 100%一致,但通常会呈现相当大的一致性。与内源序列具有“相当大一致性”的聚核苷酸通常能够与双链核酸分子的至少一条链杂交。“杂交”是指在各种严格度条件下,互补聚核苷酸序列(例如本文所述的基因)或其部分之间配对形成双链分子。(例如参见,瓦赫(Wahl, G. M.)和伯格(S. L. Berger)(1987)酶学方法(Methods Enzymol.) 152 :399 ;金默尔(Kimmel, A. R.)(1987)酶学方法,152 :507)。

[0047] 举例来说,严格的盐浓度通常小于约 750mM NaCl 和 75mM 柠檬酸三钠,优选小于约 500mM NaCl 和 50mM 柠檬酸三钠,更优选小于约 250mM NaCl 和 25mM 柠檬酸三钠。低严格度杂交可在不存在例如甲酰胺等有机溶剂的情况下实现,而高严格度杂交可以在至少约 35%甲酰胺且更优选至少约 50%甲酰胺存在下实现。严格温度条件通常包括至少约 30°C,更优选至少约 37°C,最优选至少约 42°C 的温度。所属领域技术人员众所周知不同的附加参数,例如杂交时间、清洁剂(例如十二烷基硫酸钠(SDS))浓度和包含或不包含载体 DNA。必要时,通过组合各种所述条件来达到各种严格度水平。在优选实施例中,杂交是在 30°C C 下于 750mM NaCl、75mM 柠檬酸三钠和 1% SDS 中发生。在更优选的实施例中,杂交是在 37°C C 下于 500mM NaCl、50mM 柠檬酸三钠、1% SDS、35%甲酰胺和 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精 DNA(salmon sperm DNA, ssDNA)中发生。在最优选的实施例中,杂交是在 42°C C 下于 250mM NaCl、25mM 柠檬酸三钠、1% SDS、50%甲酰胺和 200  $\mu$ g/ml ssDNA 中发生。所属领域技术人员将易于了解针对这些条件的有用变化。

[0048] 对于大多数应用,杂交后洗涤步骤的严格度也不同。洗涤的严格度条件可以由盐浓度和温度确定。如上文所述,可通过降低盐浓度或通过增加温度来提高洗涤严格度。举例来说,洗涤步骤的严格盐浓度优选小于约 30mM NaCl 和 3mM 柠檬酸三钠,最优选小于约 15mM NaCl 和 1.5mM 柠檬酸三钠。洗涤步骤的严格温度条件通常包括至少约 25°C,更优选至少约 42°C,甚至更优选至少约 68°C 的温度。在优选实施例中,洗涤步骤是在 25°C 下于 30mM NaCl、3mM 柠檬酸三钠和 0.1% SDS 中发生。在更优选实施例中,洗涤步骤是在 42°C 下于 15mM NaCl、1.5mM 柠檬酸三钠和 0.1% SDS 中发生。在更优选的实施例中,洗涤步骤是在 68°C 下于 15mM NaCl、1.5mM 柠檬酸三钠和 0.1% SDS 中发生。所属领域技术人员将易于了解针对这些条件的其它变化。杂交技术已为所属领域技术人员众所周知,且描述于例如以下文献中:本顿(Benton)和戴维斯(Davis)(科学(Science) 196 :180, 1977);格鲁斯汀(Grunstein)和霍格尼斯(Hogness)(美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci., USA) 72 :3961, 1975);奥苏贝尔(Ausubel)等人(现代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology),威立在线电子书(Wiley Interscience),纽约(New York), 2001);伯格(Berger)和金默尔(Kimmel)(分子克隆技术指南(Guide to Molecular Cloning Techniques), 1987, 学术出版社(Academic Press), 纽约(New York));和撒布鲁克(Sambrook)等人,分子克隆:实验手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 纽约(New York)。

[0049] “实质上一致”是指多肽或核酸分子呈现与参考氨基酸序列(例如,本文所述的任一氨基酸序列)或核酸序列(例如,本文所述的任一核酸序列)至少 50%的一致性。优选

所述序列在氨基酸水平或核酸水平上与用于比较的序列至少 60%，更优选 80% 或 85% 且更优选 90%、95% 或甚至 99% 一致。本文所述多肽的氨基酸序列和编码本文所述多肽序列的核酸序列为此项技术中已知的，并且可见于公共序列数据库（例如 NCBI 基因库）。

[0050] 序列一致性通常是使用序列分析软件（例如，位于威斯康星州麦迪逊市 (Madison, Wis.)，大学街 1710 号 (1710 University Avenue) 的威斯康星大学生物技术中心 (University of Wisconsin Biotechnology Center)，遗传学计算机组 (Genetics Computer Group) 的序列分析软件包 (Sequence Analysis Software Package)，53705；BLAST、BESTFIT、GAP 或 PILEUP/PRETTYBOX 程序) 测量。此类软件通过对各种取代、缺失和/或其它修饰指定同源性程度来匹配一致或相似的序列。保守取代通常包括在以下群组内的取代：甘氨酸、丙氨酸；缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸；天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；赖氨酸、精氨酸；和苯丙氨酸、酪氨酸。在用于测定一致性程度的示范性方法中，可以使用 BLAST 程序，其中概率评分介于  $e^{-3}$  与  $e^{-100}$  之间表明密切相关的序列。

[0051] 无细胞系统中三磷酸腺苷 (ATP) 的产生。

[0052] 在各种实施例中，本发明提供用于在无细胞反应系统中产生三磷酸腺苷 (ATP) 的组合物和方法。在生物系统中，ATP 是由二磷酸腺苷和无机磷酸盐 (Pi) 产生。具体地说，本发明提供从包括植物、藻类和细菌（例如蓝藻细菌）在内的进行光合反应的生物有机体获得的光合 ATP 再生系统。本发明有利地提供自调节的连续 ATP 再生系统。此外，还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 也是通过光反应产生。本发明的一个目标是将无细胞技术扩展到植物系统。

[0053] 细胞提取物的制备

[0054] 在本发明一个实施例中，提供含有光合途径组分的光合有机体的细胞提取物。通常，光合途径的组分是存在于类囊体膜或光合细菌膜（例如蓝藻细菌的膜）中。类囊体膜可以从任何植物、藻类或光合细菌获得。通常，在提取类囊体膜之前，使光合有机体在有利于其生长的条件下生长。根据此项技术中已知的用于使细胞生长的方法，可使大量光合有机体细胞在发酵罐或生物反应器中生长。用于提取类囊体膜的方法和条件优选留下缔合膜的完整光系统组分。植物细胞通过铁氧还蛋白光活化和 NADP<sup>+</sup> 还原来催化 ATP 产生的循环和非循环光合机构 (photosynthetic machinery) 离体在无细胞系统中得以保留 (Dani 等人, 生物化学与生物物理学学报 (Biochim. Biophys. Acta) (2005) 1669 :43-52 ; 奥诺 (Ono) 等人, 生物化学与生物物理学学报, (1978) 502 :477-485)。类囊体膜也可以整体叶绿体形式分离。

[0055] 为了获得用于 ATP 再生的细胞提取物，将含有类囊体膜的蓝藻细菌（例如蓝细菌 (Anacystis nidulans)）溶解。一般可通过用例如法压壶 (French press) 在含有溶解蛋白质组分的盐的缓冲液中破裂细胞来获得这一细胞提取物。匀浆可经进一步处理以使膜结合细胞器和细胞膜与细胞壁分离，例如，将溶解产物过滤和/或低速（例如，3K-5K rpm）离心，并使用滤液或上清液。也可由绿色植物（绿色植物界）制备提取物。此项技术中已知由细胞（包括植物细胞）获得溶解产物的方法和条件。为了从植物分离出含有光合 ATP 再生系统的提取物，在引起细胞溶解的条件下收集含有叶绿体的植物组织，并均质化。也可通过过滤步骤或低速离心步骤使植物提取物变澄清。制备出提取物后，可采用透析步骤来调整缓冲液的组成或条件，例如离子、pH 等。提取物可进一步使用液氮速冻并在 -80°C 下储存，

直到 ATP 合成需要时。用于再生 ATP 的细胞提取物可以是粗溶解产物或者部分或实质上纯化的含有类囊体膜的部分。此项技术中已知确定某一部分是否含有类囊体膜的方法,并且其可包括测定这一部分的密度或例如光合途径中的蛋白质、光合色素或光合辅因子等标记物的富集量。这些方法可涉及常规实验室程序,包括十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、蛋白免疫印迹 (Western blot) 分析、光谱分析和色谱法。用于 ATP 再生的提取物可呈新制或冷冻形式提供,并且可进一步调配成适用于多肽合成的反应混合物。出于无细胞蛋白质合成的目的,可借助此项技术中已知的任何方法获得这些提取物。

[0056] 也可对植物或微生物株进行额外遗传修饰以获得细胞提取物。此项技术中已知用于转染或转化蓝藻细菌的方法,例如丹尼尔 (Daniell) 等人,美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA) (1986) 83 :2546-2550。所属领域技术人员可例如通过引入重组 DNA 分子,来产生具有所需特性的转基因植物。通常,植物表达载体包括 (1) 受 5' 和 3' 调控序列转录控制的克隆的植物基因;和 (2) 显性可选择标记物。必要时,这些植物表达载体也可含有启动子调控区 (例如,提供诱导性或组成性、病原体或创伤诱发性、环境或发育调控性,或者细胞或组织特异性表达的区域)、转录起始起点、核糖体结合位点、RNA 加工信号、转录终止位点和 / 或聚腺苷酸化信号。

[0057] 数种标准方法可用于将载体引入植物宿主中,由此产生转基因植物。这些方法包括 (1) 农杆菌 (Agrobacterium) 介导的转化 (根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 或发根农杆菌 (*A. rhizogenes*)) (例如参见,里奇坦斯汀 (Lichtenstein) 和福勒 (Fuller):遗传工程 (Genetic Engineering), 第 6 卷,雷杰比 (PWJ Rigby) 编,伦敦学术出版社 (London, Academic Press), 1987;以及里奇坦斯汀 (Lichtenstein, C. P.) 和德普 (Draper, J):DNA 克隆 (DNA Cloning), 第 II 卷,格鲁夫 (D. M. Glover) 编,牛津 IRI 出版社 (Oxford, IRI Press), 1985); (2) 颗粒传递系统 (例如参见,戈登 - 凯姆 (Gordon-Kamm) 等人,植物细胞 (Plant Cell) 2 :603 (1990);或拜耳雷德公司技术手册 (BioRad Technical Bulletin) 1687,同上文); (3) 显微注射方案 (例如参见,格林 (Green) 等人,同上文); (4) 聚乙二醇 (PEG) 程序 (例如参见,达普 (Draper) 等人,植物与细胞生理学 (Plant Cell Physiol.) 23 :451, 1982;或例如,张 (Zhang) 和吴 (Wu),理论与应用遗传学 (Theor. Appl. Genet.) 76 :835, 1988); (5) 脂质体介导的 DNA 摄取 (例如参见,弗雷曼 (Freeman) 等人,植物与细胞生理学, 25 :1353, 1984); (6) 电穿孔方案 (例如参见,盖尔文 (Gelvin) 等人,同上文;德凯瑟 (Dekeyser) 等人,同上文;弗蒙 (Fromm) 等人,自然 (Nature) 319 :791, 1986;西恩 (Sheen) 植物细胞 (Plant Cell) 2 :1027, 1990;或江 (Jang) 和西恩 (Sheen) 植物细胞, 6 :1665, 1994); 和 (7) 涡旋法 (例如参见,金德 (Kindle), 同上文)。

[0058] ATP 的产生

[0059] 光能 (即,光子) 提供给 ATP 再生系统,以由 ADP 和无机磷酸盐产生 ATP。不希望受任何特定理论的束缚,在光合作用的光反应中,一个色素分子 (例如绿色植物中的叶绿素) 吸收一个光子,并损失一个电子。电子被传递到称为脱镁叶绿素的经修饰形式的叶绿素中,其将电子传递到醌分子,使电子流下电子传递链,导致 NADP 最终还原成 NADPH。电子传递链中的电子流产生跨叶绿体膜的质子梯度。非循环或循环电子传递都可用来产生质子梯度。非循环电子传递涉及光系统 1 和 2,其中光系统 1 从质体蓝素接受电子并还原 NADP。

当光子被色素吸收时,光系统 2 复合物在类囊体腔中产生质子,且水分子得以氧化。此外,在类囊体腔中,电子由光系统 2 复合物传递到质体醌,再传递到  $b_6f$  复合物,也会产生质子。循环电子传递涉及光系统 1 中电子激发以及电子向细胞色素  $b_6-f$  复合物的传递。ATP 合成酶利用质子梯度的耗散,并伴随 ATP 的合成。叶绿素分子通过称为光解作用的过程恢复由水分子引起的电子损失,释放出双氧 ( $O_2$ ) 分子。

[0060] 由细胞提取物产生 ATP 所使用的光的波长是基于作用光谱,其视存在的辅助色素的类型而定。举例来说,在绿色植物中,作用光谱类似于在紫蓝光和红光具有峰值的叶绿素和类胡萝卜素的吸收光谱。在红藻中,作用光谱与藻胆素的吸收光谱在蓝-绿光部分重叠,由此使这些藻类能在滤出绿色植物使用的较长波长的条件中生长。光谱的非吸收部分为光合有机体提供颜色(例如,绿色植物、红藻、紫色细菌)并且对个别有机体的光合作用具有最小功效。根据作用光谱吸收光谱,所属领域技术人员应易于在光合 ATP 再生系统中选择适宜的波长光。

[0061] ATP 再生系统的操作范围包括介于  $4^{\circ}\text{C}$  - $60^{\circ}\text{C}$  之间以及 pH 2-12 者。优选反应维持在 pH 5-10 和  $20^{\circ}\text{C}$  - $50^{\circ}\text{C}$  温度的范围内,更优选在 pH 6-9 和  $20^{\circ}\text{C}$  - $35^{\circ}\text{C}$  温度的范围内。这些条件可在这一允许反应条件发生改变的范围改变,例如循环。也可以使用供细胞生长的典型条件(例如,  $30-37^{\circ}\text{C}$ ,  $4 < \text{pH} < 9$ ,  $\text{CO}_2 < 1\%$ ),但系统不受维持细胞活力的条件束缚将是有益的。产生的 ATP 可经分离并储存,或用来向 ATP 依赖性反应(例如,无细胞细胞中的结合)提供能量。本发明的细胞提取物还可包含蛋白酶抑制剂。如果需要在提取物中进行多肽的体外合成,那么可以将氨基酸、核糖体、编码多肽的氨基酸序列的 RNA、RNA 聚合酶、编码多肽的核苷酸序列的 DNA 或这些因子的任何组合添加到细胞提取物中。预期 ATP 再生系统可按比例缩放和/或可受动力学限制的影响。测定这些用于操作系统的参数的实验是常规的且无需过度实验。

[0062] 碳固存 (Carbon sequestration)

[0063] 在本发明另一实施例中,二氧化碳可固定于 ATP 再生系统中的有机化合物中。碳固定是在自养生物(产生其自身的食物的有机体)中发现的通常由光合作用驱动的过程,经由这一过程,二氧化碳被变为有机物质,例如 3-磷酸甘油醛。植物中的碳固定一般涉及暗反应/光依赖性反应,例如卡尔文循环。暗反应/光依赖性反中的酶也可存在于 ATP 再生系统中所用的提取物中。因此,ATP 再生系统的一个益处在于,其可产生有机物质,而这些有机物质可经分离或用作其它反应的原料。

[0064] 3-磷酸甘油醛 (G3P) 也可在无细胞系统中通过碳固定反应(例如卡尔文循环途径)产生。卡尔文循环中的酶组分包括 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)、磷酸甘油酸激酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶。G3P 的产生需要 1,5-二磷酸核酮糖、ATP 和 NADPH,其用作碳固定中的电子供体。3-磷酸甘油醛是所有有机体的数种关键代谢途径(包括例如葡萄糖的己糖的组装)中的中间物。无细胞系统的一个益处是,无需昂贵的己糖能源。此外,当己糖是制造相关化合物的起始反应物时,产生己糖也是无细胞系统的一个益处。

[0065] 通过结合 ATP 再生系统制造化合物。

[0066] 在一个实施例中,本发明提供光合系统与相关化合物的无细胞合成的整合。本发明提供在无细胞反应系统中,使用由 ATP 再生系统所提供的 ATP 酶促成化合物的组合物

和方法。适用于合成化合物的酶或酶途径包括细胞生物化学或代谢反应中所涉及的酶或酶途径。无细胞系统的一个益处在于,可外加用于合成化合物的酶(即,来自独立来源,包括体外翻译反应、细胞溶解产物)。酶来源包括微生物和真核来源,和/或天然存在的和重组来源,和/或粗制或纯化来源。重组来源可提供有用的遗传变化,包括向酶提供所需的改变的活性或功能。

[0067] 本发明解决了与现有无细胞反应有关的几个问题,包括在现场非闭环系统中需要外来能量方案产生 ATP;ATP 合成酶限制(例如,游离磷酸盐平衡关闭合成);以及需要直接引入碳源(例如己糖)。尽管基于细胞的生物技术方法已经被证实是有用的,但这些方法受到细胞活力条件的限制,例如细胞生长需要狭窄的操作范围(30-37°C, 4 < pH < 9, CO<sub>2</sub> < 1%)。在无细胞系统中,可以使用较宽的浓度、温度、pH 值范围。当使用全细胞或完整细胞时,能量不会都被引向合成,并且能量被用于基本的细胞功能中,包括细胞生长和维持(例如,细胞骨架维持)和细胞复制(例如 DNA 复制)。本发明优于由细胞膜封闭的细胞的优势在于,其能够引入外源因子进行合成(例如酶、辅因子、引导非天然分子合成的 DNA 构建体);且体外合成速率不限于细胞膜/细胞壁渗透性。与基于细胞的方法相比较,本发明无细胞系统的另一优势在于,无需昂贵的己糖能源来支持细胞生长 ATP 产生。此外,无细胞系统的一个特征是能够经由碳固定反应(例如卡尔文循环反应)产生提供能量和/或酶前体的碳源。

[0068] 可在本发明中合成的相关化合物包括治疗性化合物和/或其前体、精细化学品、单体、工业化学品、燃料代用品。与基于细胞的方法相比,本发明的无细胞系统可产生高细胞毒性化合物(即,对细胞系统有毒),包括杀生物剂、抗癌化合物和抗生素。此外,无细胞还提供制造碳中和合成产品(carbon-neutral synthetic product)的益处,包括燃料代用品(例如丁醇、丁二醇)、消费品(例如塑料)以及烃基精细化学品和药物前体。高浓度的烃可以抑制细胞生长,并且无法由基于细胞的方法大量产生(表 1)。

[0069] 表 1. 细菌、真菌系统中的产生严格抑制细胞生长。

[0070]

分子	能量密度 (MJ/L)	抑制浓度
乙醇	19.6	在大肠杆菌中 5% / 在酵母中 15%
1- 丁醇	29.2	在大肠杆菌中 1.3%
1- 戊醇	30.3	在大肠杆菌中 0.25%
1- 癸醇	31.9	在大肠杆菌中 0.000236%
汽油	32	N/A

[0071] 本发明的无细胞系统能够例如使用细菌溶解产物中的酶,合成碳水化合物链以及合成 C<sub>3</sub>-C<sub>n</sub> 烃。为合成长链烃,可使用丙酮酸盐作为起始材料。合成长链烃的能源是由丙酮酸盐脱羧成为乙酰辅酶 A 所提供。高级醇可通过糖原异生随后厌氧发酵以及其它反应(例如,氨基转移酶反应、还原为乳酸)合成。此外,在燃料制造方面,对无细胞系统的动力学和

热力学分析也显示出优于基于油的工艺（约 100 美元 / 桶）的显著经济益处。

[0072] 用于合成化合物的酶源

[0073] 含有酶的细胞提取物

[0074] 在本发明一个实施例中，提供表达编码至少一种蛋白质的遗传序列的细菌株的细胞提取物。大肠杆菌的使用特别值得关注，其中辅助蛋白质是宿主细胞的外源蛋白，并且可包括从任何适合的蛋白质制造宿主（例如希瓦氏菌（*Shewanella*）、衣藻（*Chlamydomonas*）、梭菌（*Clostridia*）等）获得的一种、两种或所有用于制造莽草酸的多肽。也可对微生物株进行其它遗传修饰，例如缺失 *tonA* 和 *endA* 基因以防噬菌体感染并使系统内的 DNA 稳定、缺失氨基酸降解过程所涉及的蛋白质等。

[0075] 还可根据常规重组合成方法分离和纯化多肽。反应混合物可以使用 HPLC、排阻色谱法、凝胶电泳、亲和色谱法或其它纯化技术纯化。这些多肽可添加到 ATP 再生系统中。

[0076] 一种或一种以上用于制造相关化合物的多肽的编码序列存在于或被引入源有机体中，并且其可存在于可复制载体上或使用所属领域技术人员众所周知的方法插入源有机体基因组中。众所周知多种细菌的此类载体序列。表达载体可进一步包含提供可选择标记物、诱导转录等的序列。

[0077] 编码序列可操作地连接到在源有机体中起作用的启动子序列。启动子是位于结构基因起始密码子的上游（5' 端）（一般在约 100 到 1000bp 内）用于控制特定核酸序列的转录和翻译的不翻译序列。启动子可以是组成性或诱导性启动子，其中诱导性启动子响应培养条件的某些改变（例如，存在或不存在养分或温度改变）起始受其控制的 DNA 的较高水平的转录。同时，众所周知大量由多种潜在宿主细胞所识别的启动子。通过例如用 PCR 扩增序列等方法去除源 DNA 中的启动子，并将分离的序列插入载体中，由此将这些启动子可操作地连接到编码蛋白质的 DNA。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于表达，但优选异源启动子，例如 T7，因为其一般容许较多的转录和较高的产率。适用于原核宿主的启动子包括  $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统；碱性磷酸酶；色氨酸（*trp*）启动子系统；阿拉伯糖启动子系统；和杂交启动子，例如 *tac* 启动子。然而，其它已知的细菌和噬菌体启动子也是适合的。这些启动子的核酸序列已经公开，因此所属领域技术人员能够将其可操作地与编码蛋白质的 DNA 接合。

[0078] 适于此目的的原核生物包括真细菌，例如革兰氏阴性或革兰氏阳性有机体，例如肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*），如埃希氏菌属（*Escherichia*）（例如大肠杆菌）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、欧文氏菌属（*Erwinia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、变形杆菌属（*Proteus*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）（例如鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*））、沙雷氏菌属（*Serratia*）（例如粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescans*））和志贺氏菌属（*Shigella*）；以及芽孢杆菌属（*Bacilli*）（例如，枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）和地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*））、假单胞菌属（*Pseudomonas*）（例如，绿脓杆菌（*P. aeruginosa*））和链霉菌属（*Streptomyces*）。

[0079] 如实例中所述，用上述表达或克隆载体转染且优选转化宿主细胞，并在经过改良（适当时）的常规营养培养基中培养，以诱导启动子、选择转化株和制备提取物。

[0080] 无细胞蛋白质合成

[0081] 本文中使用的“无细胞蛋白质合成”是指在包含生物提取物和 / 或指定试剂的反

应混合物中进行的多肽无细胞合成。反应混合物将至少包含 ATP 再生系统（包括 ADP 和无机磷酸盐）、ATP 和 / 或能源；用于产生例如 DNA、mRNA 等大分子的模板；氨基酸，以及所述辅因子、酶，和进行合成必需的其它试剂，例如核糖体、tRNA、聚合酶、转录因子等。在本发明一个实施例中，能源是稳定状态能源。除光合 ATP 再生系统、例如乙酸激酶、肌酸激酶等催化由高能磷酸键再生 ATP 的酶外，也可包括无细胞提取物。这些酶可存在于用于翻译的提取物中，或者可添加到反应混合物中。所述合成反应系统是此项技术中众所周知的，并且在文献中有所描述。如此项技术中已知，无细胞合成反应可按批量、连续流动或半连续流动方式进行。

[0082] 本文中使用的“反应混合物”是指能够催化由核酸模板合成多肽的反应混合物。反应混合物包含上文所述的细胞提取物，例如细菌或植物提取物，并且合成是在厌氧条件下进行。反应混合物中提取物的体积百分比将变化，其中提取物通常占总体积的至少约 10%，更多时候占至少约 20%；且在一些情况中，当提供的提取物占总体积至少约 50% 或至少约 60% 且通常不超过约 75% 时，可提供附加益处。

[0083] 也可添加其它盐，尤其是生物学相关的盐，例如锰。钾添加量一般介于 50mM 到 250mM 之间，且铵介于 0mM 到 100mM 之间。反应的 pH 值一般在 pH 6 到 pH 9 之间。反应温度一般介于约 20°C 与 40°C 之间。这些范围可扩展。已经发现，较低的反应温度可有益于蛋白质的合成，在这种情况下，合成是在至少约 20°C，通常至少约 23°C 的温度下进行；并且温度可以为约 25°C；但也不排除常规的合成温度。

[0084] 合成可进行不同时间长度，这部分视反应是批量馈料还是连续馈料进行而定。对于批量反应，反应可持续积累蛋白质达至少约 1 小时，通常至少约 3 小时，更多时候至少约 6 小时，且至少约 12 小时、至少约 18 小时、至少约 24 小时或更长的反应时间将有益，尤其是合成是在低于约 25°C 温度下进行的情形。

[0085] 如果打算将 mRNA 的翻译与由 DNA 模板体外合成 mRNA 的过程结合来产生蛋白质，那么无细胞系统将含有翻译 mRNA 所需的所有因子，例如核糖体、氨基酸、tRNA、氨酰基合成酶、延长因子和起始因子。此项技术中已知的无细胞系统包括大肠杆菌提取物等，其可用适合的核酸酶处理以消除活性内源 mRNA。

[0086] 除例如无细胞提取物、遗传模板和氨基酸等上述组分外，还可将蛋白质合成特别需要的物质添加到反应中。这些物质包括盐、聚合化合物、环状 AMP、蛋白质或核酸降解酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂或调控剂、氧化 / 还原调节剂、非变性的表面活性剂、缓冲剂组分、精胺、亚精胺等。

[0087] 这些盐优选包括乙酸、谷氨酸或硫酸的钾盐、镁盐、铵盐和锰盐，并且其中有一些可具有其它氨基酸作为平衡阴离子。聚合化合物可以是聚乙二醇、葡聚糖、二乙基氨基乙基葡聚糖、季铵化氨基乙基和氨基乙基葡聚糖等。氧化 / 还原调节剂可以是二硫苏糖醇、抗坏血酸、还原型谷胱甘肽和 / 或其氧化物。也可使用浓度为 0 到 0.5M 的非变性的表面活性剂，例如曲通 X-100 (Triton X-100)。精胺和亚精胺和 / 或腐胺可用于改善蛋白质合成能力，且 cAMP 可用作基因表达调控剂。

[0088] 翻译反应中产生的蛋白质的量可用各种方式测量。一种方法取决于测量所翻译的特定蛋白质的活性的分析法的可用性。用于测量蛋白质活性的分析法的实例为实例中所述的甲基紫精分析法。这些分析法将测量由翻译反应产生的功能活性蛋白质的量。活性分析

法不测量因不当蛋白质折叠或缺乏蛋白质活性必需的其它翻译后修饰而无活性的全长蛋白质。

[0089] 一种测量在组合的体外转录和翻译反应中产生的化合物的量的方法是使用已知量的放射性标记的氨基酸（例如  $^{35}\text{S}$ - 甲硫氨酸或  $^{14}\text{C}$ - 亮氨酸）进行反应，随后测量并入新翻译的蛋白质中的放射性标记的氨基酸的量。并入分析法将测量在体外翻译反应中产生的所有蛋白质（包括截短的蛋白质产物）中放射性标记的氨基酸的量。放射性标记的蛋白质可在蛋白质凝胶上进一步分离，并借助放射自显影（autoradiography）证实产物是适当尺寸并且未产生次要蛋白质产物。

[0090] 莽草酸的合成

[0091] 此项技术中已知莽草酸的生物合成法，例如，如图 3 中所示。可由细菌或产生莽草酸生物合成中所涉及的酶的其他细胞来制备细胞提取物。在莽草酸合成途径中，磷酸烯醇丙酮酸与 4- 磷酸赤藓糖在由 DAHP 合成酶催化的反应中反应形成 3- 脱氧 -D- 阿拉伯庚酮糖酸 -7- 磷酸 (DAHP)。随后，DAHP 在由 DHQ 合成酶催化的反应中转化成 3- 脱氢奎尼酸 (DHQ)。尽管这一反应需要 NAD 作为辅因子，但酶机制使其再生，以致 NAD 的净使用量为 0。DHQ 在脱氢奎尼酸酶作用下脱水形成 3- 脱氢莽草酸，其被使用 NADPH 作为辅因子的莽草酸脱氢酶还原成莽草酸。此外，莽草酸还可由所述途径中存在的任何中间物和起引导作用的酶产生。另外，所属领域技术人员将易于调整酶的水平 and 活性以便于在所述途径中产生化合物或减少所述途径中其它中间物的产生。

[0092] 优选反应维持在 pH 5-10 和 20 °C -50 °C 温度的范围内，更优选在 pH 6-9 和 20 °C -35 °C 温度的范围内。尽管描述了光合 ATP 再生系统，但也可使用任何 ATP 再生系统，例如 PCT 专利公开案第 W02000055353A1 号中所述的 ATP 再生系统。

[0093] 测量在无细胞系统（体外 ATP 再生与化合物合成反应的组合）中产生的化合物的量的方法是使用已知量的放射性标记的前体（例如，含有  $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$  者）进行反应，并根据放射性标记的并入来测量化合物的产量。

[0094] 当反应介质中特定组分的浓度发生变化时，另一组分的浓度相应发生变化。举例来说，可根据其它组分浓度的变化，同时控制例如核苷酸和能源化合物等数种组分的浓度。反应器中各组分的浓度水平也可能随时间而变化。

[0095] 反应器设计

[0096] 在一个实施例中，本发明提供在光反应器中藻类 / 植物源性类囊体膜的组装。在另一实施例中，本发明提供反应器的组装，在这一反应器中，光合反应与用于合成相关化合物的反应相结合。这些反应可以是大规模的、小规模，或者可以多工操作以进行多个同时合成反应。预期 ATP 再生反应和用于制造相关分子的反应可按比例缩放，并且可能受动力学限制的影响。举例来说，美国专利第 7341852B2 号中描述了用于按比例缩放体外方法的方法。然而，用于确定工艺放大和工艺优化的实验是常规的且无需过度实验。大规模发酵罐可用于生长获取提取物的细胞。反应器的操作条件可临时改变以适应特定步骤（例如 ATP 再生、无细胞蛋白质）。可引入其它试剂以延长活性剂合成的时间。合成的产物通常积累在反应器中，随后在系统操作完成后，根据常用的蛋白质纯化方法进行分离和纯化。在一些情况下，可以测定酶活性且不经纯化即使用。

[0097] 除非另作指示，否则本发明的实施使用分子生物学（包括重组技术）、微生物



学、细胞生物学、生物化学与免疫学的常规技术,这些技术都在所属领域技术人员的技能范围内。这些技术完整说明于以下文献中,例如“分子克隆:实验手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”,第2版(撒布鲁克(Sambrook),1989);“寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis)”(盖特(Gait),1984);“动物细胞培养(Animal Cell Culture)”(弗里希尼(Freshney),1987);“酶学方法(Methods in Enzymology)”“实验免疫学手册(Handbook of Experimental Immunology)”(威尔(Weir),1996);“用于哺乳动物细胞的基因转移载体(Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells)”(米勒(Miller)和卡洛斯(Calos),1987);“现代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)”(奥苏贝尔(Ausubel),1987);“PCR:聚合酶链反应(PCR:The Polymerase Chain Reaction)”,(穆利斯(Mullis),1994);“现代免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)”(克里根(Coligan),1991)。这些技术适用于产生本发明的聚核苷酸和多肽,因此被认为可进行和实施本发明。

[0098] 除非另作定义,否则本文中使用的所有科技术语都具有与本发明所属领域一般技术人员通常所了解相同的含义。尽管可使用与本文中所述相似或相同的任何方法、装置和材料来实施或测试本发明,但现仅描述优选方法、装置和材料。

[0099] 其它实施例

[0100] 从前述描述将易于了解,可对本文所述的发明进行变更和修改以使其适应各种用途和条件。这些实施例也在以上权利要求书的范围内。

[0101] 在本文的变量的任何定义中叙述的要素清单包括呈所列要素中任何单一要素或其组合(或子组合)形式的所述变量的定义。本文中叙述的实施例包括所述实施例的任何单一实施例或与任何其它实施例或其部分的组合。

[0102] 应了解,本发明不限于所述特定方法、方案、细胞系、动物物种或种类、构建体和试剂,因此当然可发生变化。还应了解,本文中使用的术语只是出于描述特定实施例的目的,而不是打算限制本发明的范围,本发明的范围应仅受所附权利要求书限制。

[0103] 本文说明书中提到的所有专利和出版物都以引用的方式并入本文中,引用的程度就如同将各个别专利和出版物特定且个别地以引用的方式并入本文中一般。以下专利和专利申请案可揭示相关标的物,且各案以全文引用的方式并入本文中:US7312049、US7341852、US6168931、US20070154983、US20060281148、US20050054044、US20040209321、US20030113778、US20020058303、W02008088884、W02008066583、W02008002661、W02008002673、W02008002663、W02007053655、W02005098048。在出现矛盾的情况下,以本说明书(包括定义)为主。此外,材料、方法和实例只是说明性的,且不打算作限制。上文和通篇论述的出版物只是提供本申请案申请日期之前的揭示内容。本文中无任何内容可解释为承认本发明人无权根据先前发明而提前所述揭示内容。

[0104] 提出的以下实例将向所属领域技术人员提供关于如何进行和使用本发明的完整揭示和描述,且其不打算限制本发明的范围。已经付出大量努力来确保所用数字(例如量、温度、浓度等)的准确性,但仍应容许一定实验误差和偏差。除非另作指示,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度以摄氏度为单位,且压力等于或接近大气压。

[0105] 实例

[0106] 本发明将参照以下实例进行描述,这些实例是出于说明的目的提供,且不打算以

任何方式限制本发明。实例中利用了此项技术中众所周知的标准技术或下文特别描述的技术。

[0107] 实例 1. 通过结合光合 ATP 再生系统产生莽草酸。

[0108] 本发明提供用于在无细胞系统中产生三磷酸腺苷 (ATP) 以及借助无细胞系统中的酶或酶途径产生化合物的组合物和方法。一般无细胞系统的实例提供于图 1 中。ATP 是由 ATP 再生系统产生, 这一系统可催化由二磷酸腺苷 (ADP) 和无机磷酸盐形成 ATP。ATP 再生系统包括植物和其它光合有机体的光合 ATP 再生系统。需要 ATP 的酶或酶途径可与 ATP 再生系统组合, 以产生相关化合物, 例如莽草酸。本研究将评估分离的类囊体部分在体外产生 ATP 的能力。本研究将评估无细胞系统中 ATP 的产生速率和产量以及莽草酸的产量。本发明的一个目标是将无细胞技术扩展到光合系统。

[0109] 光合 ATP 再生系统是从蓝藻细菌 (例如蓝细菌) 分离得到。优选在提取细胞溶解产物之前, 使蓝藻细菌在有利于生长的条件下生长。可使用细胞溶解产物进行提取, 或者可以使用一个步骤来清除溶解产物中未溶解的细胞和细胞骨架碎片, 例如过滤步骤。蓝藻细菌的细胞溶解产物中含有类囊体膜。在后续使用之前, 可借助所属领域技术人员已知的方法进一步纯化类囊体膜。

[0110] 在无细胞系统中, ATP 和 NADPH 是通过光反应产生 (图 2)。ADP 和无机磷酸盐存在于无细胞系统中。ADP 和无机磷酸盐可例如由纯化的来源或另一生物源外加到无细胞系统中。NADP 也存在于无细胞系统中, 且额外的 NADP 可外加到无细胞系统中。将这一系统曝露于波长介于约 530nm 到 720nm 之间的光。优选使用太阳能, 但也可使用波长能被光合色素吸收的任何光源。光合色素吸收的光用来还原水分子, 由此产生电子, 电子将通过类囊体膜中存在的电子传递链传递。电子传递链中的组分包括多肽、蛋白质复合物, 和辅因子 (例如, 细胞色素  $b_6-f$  复合物、质体蓝素和光系统 1 复合物、光系统 2 (PS2) 复合物, 以及质体醌), 其在一组生物化学反应中充当电子供体和电子受体以跨膜传递质子。电子传递途径将产生呈质子梯度形式的跨膜电化学电位梯度。质子梯度为 ATP 合成酶提供能量, 而 ATP 合成酶将催化由 ADP 和磷酸盐形成 ATP。利用此项技术中已知的方法, 例如 HPLC 或生物化学分析法, 将由此产生的 ATP 的量与由体外培养的植物细胞产生的 ATP 的量相比较。由此可证实, 在无细胞系统中 ATP 的产生接近于体内速率。

[0111] 3-磷酸甘油醛 (G3P) 也可在无细胞系统中通过碳固定反应 (例如卡尔文循环途径) 产生。卡尔文循环中的酶组分包括 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶 (RuBisCO)、磷酸甘油酸激酶和 3-磷酸甘油醛脱氢酶。G3P 的产生需要 1,5-二磷酸核酮糖、ATP 和 NADPH, 其用作碳固定中的电子供体。3-磷酸甘油醛是所有有机体的数种关键代谢途径 (包括例如葡萄糖的己糖的组装) 中的中间物。无细胞系统的一个益处是, 无需昂贵的己糖能源。

[0112] 光合无细胞系统可结合莽草酸途径, 由此为 ATP 依赖性反应提供能源 (图 3)。此项技术中已知莽草酸的生物合成法, 例如, 如图 4 中所示。细胞提取物是由含有莽草酸生物合成中所涉及的酶的细菌产生。磷酸烯醇丙酮酸与 4-磷酸赤藓糖在由 DAHP 合成酶催化的反应中反应形成 3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP)。无细胞系统的另一益处是, 通过碳固定反应产生碳化合物, 且后续反应 (例如糖酵解) 可得到合成莽草酸的化合物, 例如磷酸烯醇丙酮酸 (PEP)。随后, DAHP 在由 DHQ 合成酶催化的反应中转化成 3-脱氢奎尼酸 (DHQ)。尽管这一反应需要 NAD 作为辅因子, 但酶机制使其再生, 以致 NAD 的净使用量为 0。

DHQ 在脱氢奎尼酸酶作用下脱水形成 3- 脱氢莽草酸, 其被使用 NADPH 作为辅因子的莽草酸脱氢酶还原成莽草酸。

[0113] 这些酶通常被提供于从含有供生物合成莽草酸的酶的细菌获得的无细胞溶解产物中。细菌是在有利于细菌生长的条件 (例如对数期 (log phase)) 和 / 或有利于产生莽草酸生物合成所涉及的酶的条件下生长。可以使用含有供生物合成莽草酸的酶或这些酶的修饰变异体的重组细菌。此外, 还可以利用由体外翻译或转录 / 翻译反应产生的酶来提供莽草酸。所属领域技术人员将显而易见, 视提供的前体而定, 不需要提供所有的酶来产生莽草酸, 并且可调整无细胞系统中的酶量以有利于结束其它中间物和产物的产生。因此, 将在无细胞系统中证实用于合成莽草酸的反应方案。

[0114] 可通过使用已知量的放射性标记的前体 (例如, 含有  $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$  者) 进行反应, 并根据放射性标记的并入来测量化合物的产量, 以此显示测量在无细胞系统中产生的莽草酸的量的方法。确定诸如莽草酸等化合物的存在的方法是业内已知的, 且其涉及常规实验室程序, 包括光谱分析法和色谱法 (例如高压液相色谱法 (HPLC))。

[0115] 可分离并储存产生的莽草酸。莽草酸可用来制造治疗性抗病毒化合物, 例如 TAMIFLU。如果使用莽草酸制造治疗剂, 那么至少将其纯化到精细化学品等级。莽草酸的纯化方法是业内已知的, 且可涉及用于纯化化合物的常规实验室程序, 例如沉淀、化学萃取、尺寸排阻色谱法、离子交换色谱法、HPLC 等。

[0116] 本说明书中提到的所有专利和出版物都指示本发明所属领域技术人员的技术水平。本发明中引用的所有参考文献以引用的方式并入本文中, 引用程度就如同将各参考文献个别地以全文引用的方式并入本文中一般。

[0117] 所属领域技术人员易于理解, 本发明特别适合于实现目标, 并获得所提到的结果和益处, 以及其中固有者。本文中描述为当前的代表性优选实施例的方法和组合物是示范性的, 且打算作为对本发明范围的限制。所属领域技术人员将会想到这些实施例的改变和其它应用, 其也涵盖在本发明的精神范围内, 且由权利要求书的范围所界定。

[0118] 本文中说明性描述的本发明宜在不存在本文未特别揭示的任一要素或多个要素、任一限制或多个限制的情况下实施。因此, 例如, 在本文各实例中, 术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中任一者可用其它两个术语替代。已经使用的术语和表述是用作术语的描述而非限制, 且打算使用这些术语和表述来排除所显示和描述的特征或其部分的任何等效物, 但应认识到, 在所主张的本发明的范围内可能作出各种修改。因此, 应了解, 尽管已经通过优选实施例和任选特征特别揭示了本发明, 但所属领域技术人员可借助本文所揭示概念的修改和变更, 且这些修改和变更被视为在本说明和所附权利要求书所界定的本发明的范围内。

[0119] 此外, 在依据马库西群组 (Markush groups) 或其它替代性群组描述本发明的特征或方面的情况下, 所属领域技术人员将认识到, 本发明也因此可依据马库西群组或其它群组的任一个别成员或成员亚组进行描述。

[0120] 除非本文另作指示或在上下文中明确地作相反说明, 否则在描述本发明的上下文中 (尤其在以上权利要求书的上下文中), 术语“一”和“所述”以及类似表述的使用应解释为涵盖单个和多个参考物。除非另作规定, 否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语 (即, 意思指“包括, 但不限于”)。除非本文中另作指示, 否则本文中对

值的范围的叙述仅打算用作个别地提到在所述范围内的各独立值的速记方法,并且各独立值都将并入本说明书中,就如同在本文中对其个别地进行叙述一般。除非本文中另作指示或上下文另外明确作相反说明,否则本文所述的所有方法可按任何适合的次序进行。除非另作声明,否则本文所提供的任何实例和所有实例或示范性术语(例如,“例如”)的使用都只是打算更好地说明本发明,并且不形成对本发明范围的限制。不应将本说明书中的语言解释为指示任何非所主张的要素是实施本发明所必需的。

[0121] 本文描述了本发明的优选实施例,包括发明人己知的用于进行本发明的最佳模式。所属领域技术人员在阅读了前述描述后,将易于了解针对这些优选实施例的变更。本发明人期待所属领域技术人员在适当时使用这些变更,且本发明人希望可以与本文特别描述不同的方式实施本发明。因此,本发明包括适用法律所允许的针对所附权利要求书中所述的标的物的所有修改和等效物。此外,除非本文另作指示或上下文另外明确地作相反指示,否则本发明涵盖上述要素的所有可能的变更的任何组合。

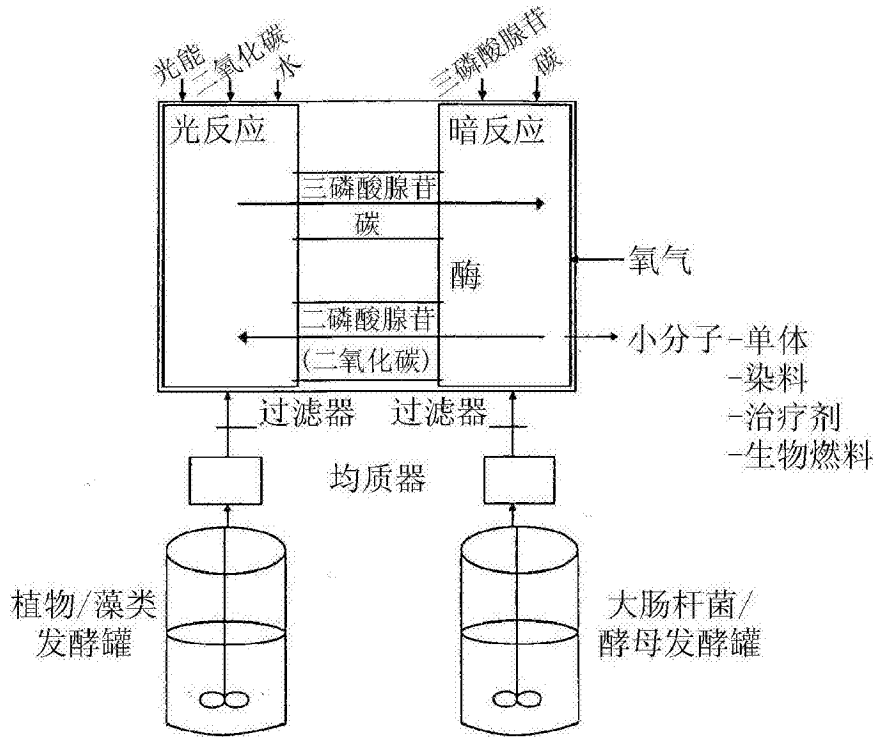


图 1

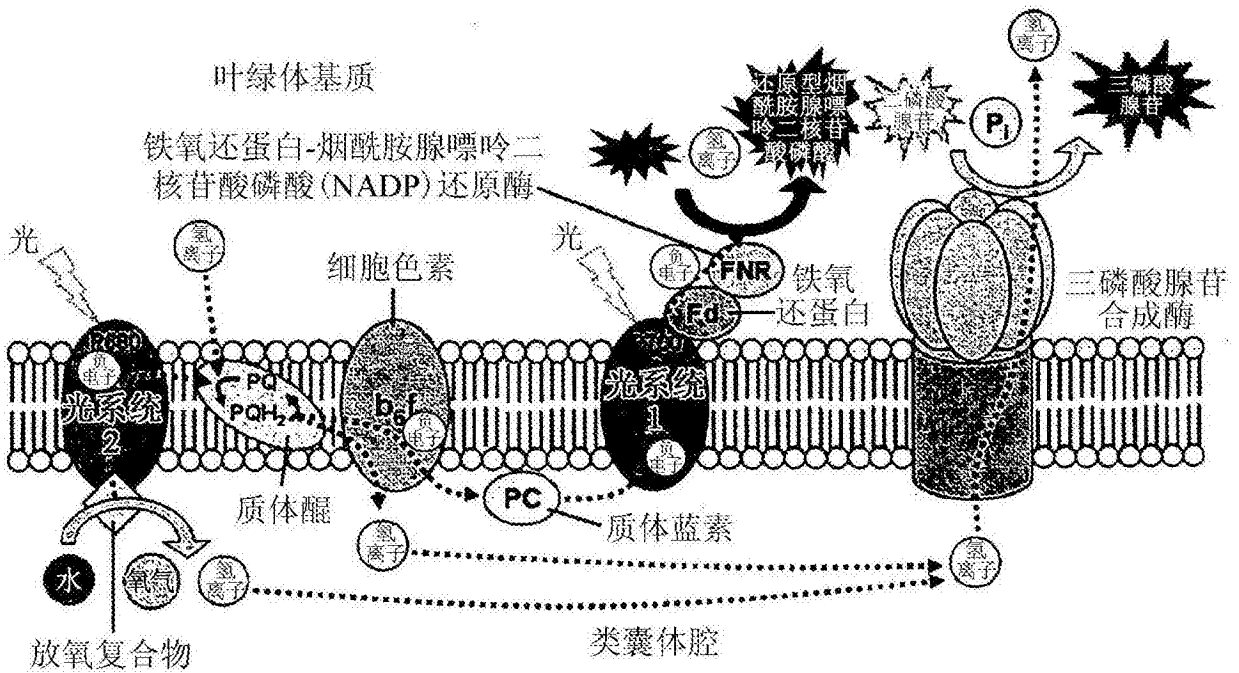


图 2

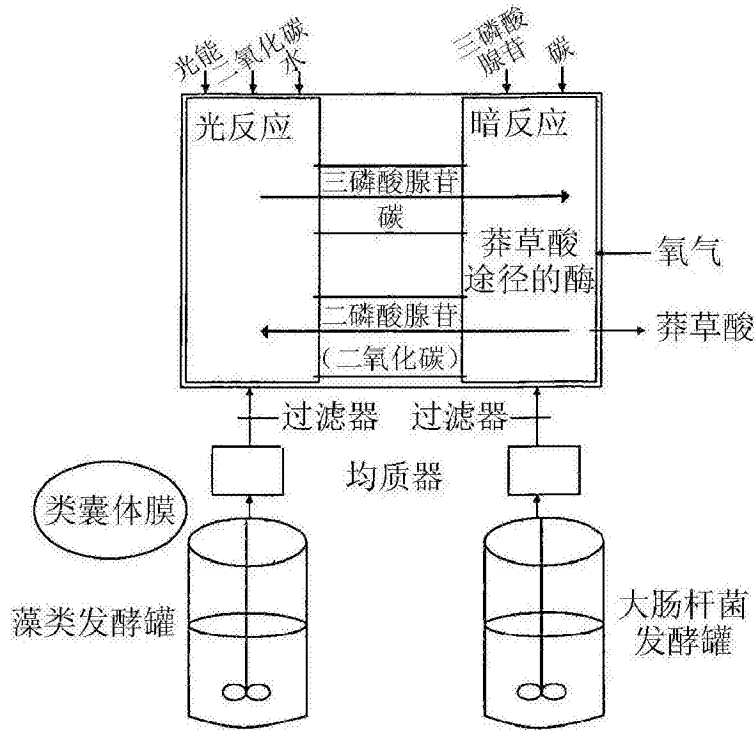


图 3

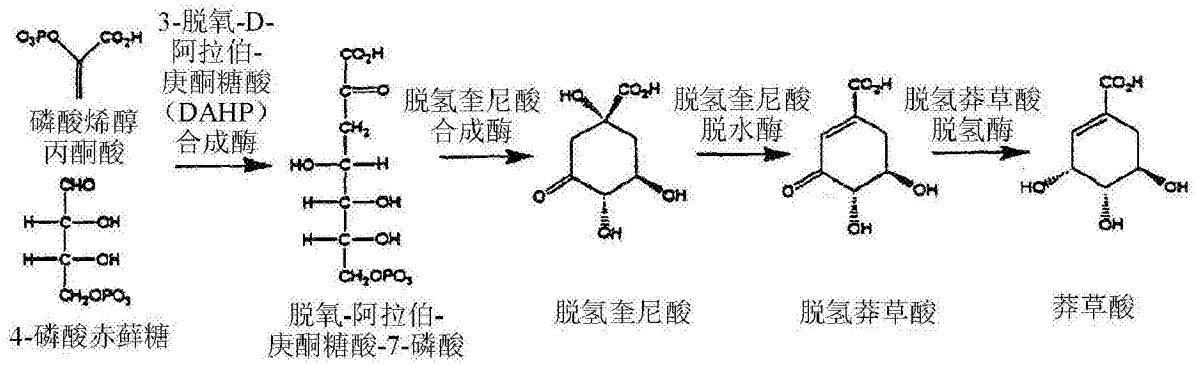


图 4