

· 综述 ·

喷司他丁的合成及其生物合成机制研究进展

宋泽祺^{1,2}, 刘虎虎^{1,2}, 段希宇^{1,2}, 杨辉^{1,2}, 王翀^{1,2}, 卢向阳^{1,2}, 田云^{1,2}

1 湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128

2 农业生物化学与生物转化湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410128

宋泽祺, 刘虎虎, 段希宇, 等. 喷司他丁的合成及其生物合成机制研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(12): 4158-4168.

Song ZQ, Liu HH, Duan XY, et al. Advances in the biosynthesis of pentostatin. Chin J Biotech, 2021, 37(12): 4158-4168.

摘要: 喷司他丁是一种核苷类抗生素, 对腺苷脱氨酶有极强的抑制效果, 在临床治疗恶性肿瘤方面具有广泛应用。但其生产成本高、市售价格昂贵, 难以满足需求。近 10 年来, 关于生物合成喷司他丁的研究主要集中在菌种选育、优化培养基组分与发酵工艺等方面。目前, 尽管喷司他丁的生物合成机制得到了阐明, 但生物合成喷司他丁方面的综述尚无。对此, 文中综述了喷司他丁的生物合成进展, 为其进一步研究提供参考。首先, 简介了喷司他丁的合成方法及其生产现状; 其次, 总结了喷司他丁在不同微生物中的生物合成机制; 最后, 探讨了生物合成喷司他丁所面临的问题, 并提出调控微生物合成喷司他丁的策略, 以期对喷司他丁的规模化生产提供指导。

关键词: 喷司他丁, 核苷类抗生素, 生物合成, 微生物发酵, 系统代谢工程

Advances in the biosynthesis of pentostatin

Zeqi Song^{1,2}, Huhu Liu^{1,2}, Xiyu Duan^{1,2}, Hui Yang^{1,2}, Chong Wang^{1,2}, Xiangyang Lu^{1,2}, and Yun Tian^{1,2}

1 College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Key Laboratory for Agricultural Biochemistry and Biotransformation of Hunan Provincial University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Pentostatin is a nucleoside antibiotics with a strong inhibitory effect on adenosine deaminase, and is widely used in the clinical treatment of malignant tumors. However, the high cost hampers its application. In the past 10 years, the biosynthesis of pentostatin were focused on strain breeding, optimization of medium composition and fermentation process. To date, there are no reviews summarizing the elucidated biosynthetic mechanism of pentostatin. This review starts by introducing the various chemical route for production of pentostatin, followed by summarizing the mechanisms of pentostatin

Received: January 11, 2021; **Accepted:** May 19, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21808052), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019TQ0088), the Double First Class Construction Project of Hunan Agricultural University, China (No. SYL201802002), Training Program for Excellent Young Innovators of Changsha, China (No. kq2009019).

Corresponding authors: Huhu Liu. E-mail: liuhuhu@hunau.edu.cn

Yun Tian. E-mail: tianyun@hunau.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21808052), 中国博士后科学基金 (No. 2019TQ0088), 湖南农业大学“双一流”建设项目 (No. SYL201802002), 长沙市杰出创新青年培养计划 (No. kq2009019) 资助。

网络出版时间: 2021-06-18

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210618.1516.004.html>

biosynthesis in different microorganisms. Finally, challenges for biosynthesis of pentostatin were discussed, and strategies for regulating and improving the microbial synthesis of pentostatin were proposed.

Keywords: pentostatin, nucleoside antibiotics, biosynthesis, microbial fermentation, systems metabolic engineering

天然产物是来源于自然界的化学物质,其多种多样的生物活性在药物发现及开发方面具有关键作用。研究表明,50%以上的小分子药物来自天然产物及其衍生物^[1]。抗生素作为天然产物中的重要组成部分,是微生物生长代谢过程中所产生的具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物。现在,通过生物合成、化学合成或半合成的具有抗菌活性的化合物被统称为抗生素^[2]。自1928年首个抗生素——青霉素被发现以来,人类社会步入抗生素发现的黄金时期,超过23 000种具有不同活性的抗生素相继被发现^[3]。其中核苷类抗生素是由核苷或核苷酸经过一系列修饰后所形成的次生代谢物,具有多样的生物活性,如抗菌、抗肿瘤、抗病毒、除草杀虫、免疫刺激和免疫抑制等^[4-5]。

喷司他丁作为一种高效的腺苷脱氨酶(Adenosine deaminase)抑制剂,其特殊的生物活性受到了研究者的广泛关注。1978年Warner-Lambert公司首次实现了喷司他丁的化学合成,在此之后其合成路线不断得到改进^[6]。与化学合成相比,微生物发酵合成喷司他丁具有经济、绿色等优势。近10年来,喷司他丁的生物合成机制得到了阐明,而关于生物合成喷司他丁的研究主要集中在菌种选育、培养基组分与发酵工艺优化等方面,生物合成喷司他丁方面的相关综述尚未见报道。因此,本文对喷司他丁结构与活性、当前合成方法及其生物合成机制进行综述,并探讨了提高喷司他丁合成效率的相关策略,为实现喷司他丁的高效生物制造提供指导。

1 喷司他丁的发现、结构与药理活性

喷司他丁是1974年由Warner-Lambert公司从抗生链霉菌 *Streptomyces antibioticus* 的发酵液中

分离出来的一种天然核苷类抗生素^[7]。喷司他丁作为一种强腺苷脱氨酶抑制剂,其抑制常数 K_i 为 2.5×10^{-12} mol/L^[8-9]。1995年,Warner-Lambert公司进一步优化喷司他丁的分离纯化过程,建立了高效的喷司他丁提取方法,提取纯度达到99.7%^[10]。1998年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)正式批准了注射剂型喷司他丁(商品名 Nipent)作为临床药物上市,主要用于慢性淋巴细胞白血病、毛细胞白血病等疾病的治疗^[11-12]。

如图1所示,从化学结构上看,喷司他丁是腺苷的结构类似物,其独特的二氮杂卓环,尤其是杂环中手性醇的R构型,使喷司他丁具有独特的生物活性,对腺苷脱氨酶有极强的抑制效果^[13-14]。

喷司他丁作为一种抗代谢类抗肿瘤药物,通过抑制患者细胞内腺苷脱氨酶的活性,使体内脱氧腺苷三磷酸(Deoxyadenosine triphosphate, dATP)的水平增高,dATP通过抑制核糖核苷酸还原酶,导致用于DNA合成的其他3种脱氧核苷三磷酸的缺乏,使DNA合成过程受阻,进而抑制淋巴细胞繁殖^[15]。此外,喷司他丁与其他

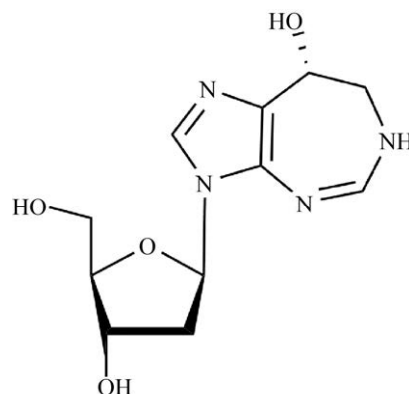


图1 喷司他丁结构式^[13]

Fig. 1 Chemical structure of pentostatin^[13].

药物的联合用药已成为临床中常用的治疗恶性肿瘤的手段^[16]。例如：喷司他丁与维奈克拉 (Venetoclax) 联合治疗急性淋巴细胞白血病^[17]；喷司他丁、环磷酰胺和利妥昔单抗 (Rituximab) 的联合用药对治疗淋巴瘤有明显的效果^[18]。

2 喷司他丁的化学合成

1978年, Warner-Lambert公司首次报道了喷司他丁的化学全合成路线^[6]。在此之后, 研究人员围绕喷司他丁的化学合成, 主要针对合成路线中七元杂环结构的不稳定性、糖苷配基与七元杂环中手性醇的立体选择性等3个关键问题开展研

究。1982年 Warner-Lambert公司在之前的基础上进行改进, 通过低温策略得到1:1糖基化产物, 其反应收率为80%–95%, 并选择硼氢化钠作为还原剂得到1:1的R/S产物, 其反应收率为85% (图2)^[19]。但这一反应存在诸多限制, 如: 原料价格昂贵、易导致催化剂中毒、需多次分离纯化等。1994年, Thien等以L-乙基甘氨酸来合成二氮杂卓环结构, 其原料可以特异性合成杂环中的R型手性醇^[20]。2002年, Bristol-Myers Squibb公司为进一步提高产率, 减少生产成本, 以5-硝基咪唑为原料合成二氮杂卓环, 该路线与Warner-Lambert的合成路线相比成本低、反应条

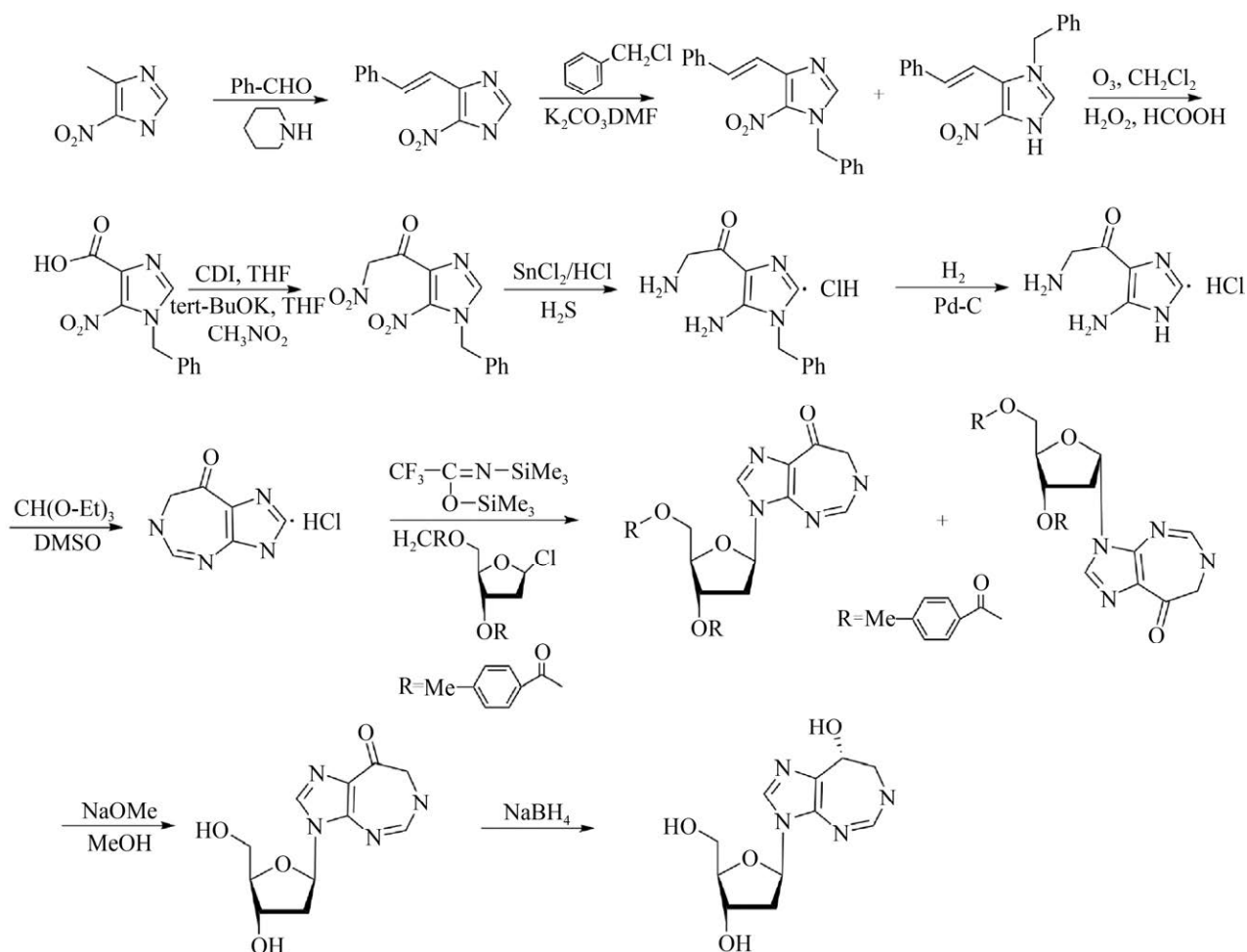


图2 Warner-Lambert公司的喷司他丁合成路线^[19]

Fig. 2 The synthetic route of pentostatin from Warner-Lambert company^[19].

件温和,并使反应收率提升了近一倍^[21]。2002年,Reliable Biopharmaceutical公司提出利用L-酒石酸二甲酯合成喷司他丁的方法,该路线简短、原材料价格低廉,且解决了糖基化的立体选择性问题,但手性醇的问题没有得到有效的解决^[22]。2005年,美国SuperGen公司提出了喷司他丁中杂环合成的新方法,以次黄嘌呤为原料,将其六元环在O-C-N官能团处扩为七元杂环,极大缩减了喷司他丁合成的反应步骤,反应收率得到了明显提高^[23]。2010年,浙江大学吴东平教授团队在Bristol-Myers Squibb公司现有合成路线的基础上,以5-硝基咪唑为原料进行喷司他丁的合成,过程中采用不对称氢转移反应使手性醇R/S的比例达到99:1,但该反应的催化剂的反应活性并不稳定,中试中喷司他丁的总收率为1.3%^[24]。表1总结了以上不同路线化学合成喷司他丁中间产物的立体选择性(表1)。

综上,喷司他丁化学合成路线中七元杂环的稳定性得到了有效解决,但是,针对糖苷配基与七元杂环中手性醇的立体选择性等问题尚未有突破性的进展。目前,采用化学合成喷司他丁过程路线长、产率低、反应条件苛刻、中间体纯化难度大、成本高,难以实现大规模工业化生产。

3 喷司他丁生物合成机制

随着生物技术的快速发展,组学技术在核苷类抗生素生物合成机制的挖掘方面展现出巨大的潜力^[25]。如Lacalle等利用*dmpm*和*pac*作为探针

从白黑链球菌*Streptomyces alboniger*的基因组文库中克隆出生物合成嘌呤霉素基因簇,并在此基础上,通过基因簇的异源表达实现了嘌呤霉素在变铅青链霉菌*Streptomyces lividans*中的合成^[26]。2017年,武汉大学陈文青教授团队根据抗生链霉菌*Streptomyces antibioticus* NRRL 3238的全基因组数据,挖掘出一个参与嘌呤代谢途径的基因簇,并成功解析了喷司他丁的生物合成机制^[27]。同时,马杜拉放线菌*Actinomadura madurae*与蛹虫草*Cordyceps militaris*中的喷司他丁生物合成机制也被揭示^[13,28]。

3.1 细菌中喷司他丁的生物合成机制

针对抗生链霉菌中喷司他丁生物合成途径,Hanvey等通过在抗生链霉菌发酵液中添加[U-¹⁴C]-甘氨酸、[U-¹⁴C]-腺嘌呤和[U-¹⁴C]-腺苷溶液,发现腺苷是喷司他丁生物合成的前体物质,且其生物合成途径与初级代谢中组氨酸生物合成途径有一定的关联^[29]。在此基础之上,研究发现抗生链霉菌中存在一种NADPH依赖性还原酶,其可催化8-酮基喷司他丁还原生成喷司他丁^[19,30-31]。

2017年,武汉大学陈文青教授团队将基因簇*pen*导入到金产色链霉菌*Streptomyces aureochromogenes* CXR 14中,实现了喷司他丁的异源合成^[27]。该基因簇大小为10.5 kb,包含*penA-penJ*共10个基因,其中的PenA、PenB、PenC是喷司他丁生物合成的关键酶,共同介导喷司他丁的合成。PenA被鉴定为一种与HisG同源

表1 不同路线化学合成喷司他丁中间产物的立体选择性

Table 1 Stereoselectivity of the intermediates in the chemical synthesis of pentostatin via different routes

Starting materials	Target products	Glycosylation ratios (α/β)	Chirality ratios (R/S)	References
5-nitro-4-styrylimidazole	Pentostatin	15:14	3:2	[19]
4-methyl-5-nitroimidazole	Pentostatin	1:1	1:1	[20]
L-vinylglycine	Tetrahydroimidazodiazepinol aglycon of pentostatin	/	99:1	[21]
L-dialkyl tartarates	Pentostatin	7:15	Unknown	[23]
4-methyl-5-nitroimidazole	Pentostatin	1:1	99:1	[25]

的 ATP 磷酸核糖转移酶, 在组氨酸代谢途径中负责磷酸核糖焦磷酸 (Phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP) 与 dATP 的偶联; 体外实验表明 PenB 是短链脱氢酶家族中的一员, 负责喷司他丁合成的最后一步; 而 PenC 作为 SAICAR 合成酶的同系物, 其功能尚未明确。2020 年, Ren 等研究表明纯化后的 PenA 只能以 dATP 为底物, 并且 PenA 是喷司他丁生物合成途径中的限速酶^[32]。

2017 年, 武汉大学陈文青教授团队证实马杜拉放线菌 ATCC 39365 可以同时生产喷司他丁、2'-氯代喷司他丁及 2'-氨基-2'-脱氧腺苷, 并基于

抗生链霉菌 NRRL 3238 中喷司他丁合成基因簇序列信息, 通过分析马杜拉放线菌 ATCC 39365 全基因组序列, 定位到 2'-喷司他丁和 2'-氨基-2'-脱氧腺苷的生物合成基因簇 *ada*^[13]。该研究发现, 基因簇 *ada* 全长 14.4 kb, 由 *adaA-adaM* 共 13 个基因组成, 其中 AdaA、AdaB、AdaC、AdaK、AdaL 与 AdaM 参与喷司他丁的合成, 但 AdaK 与 AdaM 的敲除不影响喷司他丁的合成, 而 AdaE 被预测为一种反向转运蛋白负责喷司他丁的氯化。目前, 喷司他丁在细菌中的生物合成途径如图 3 所示。

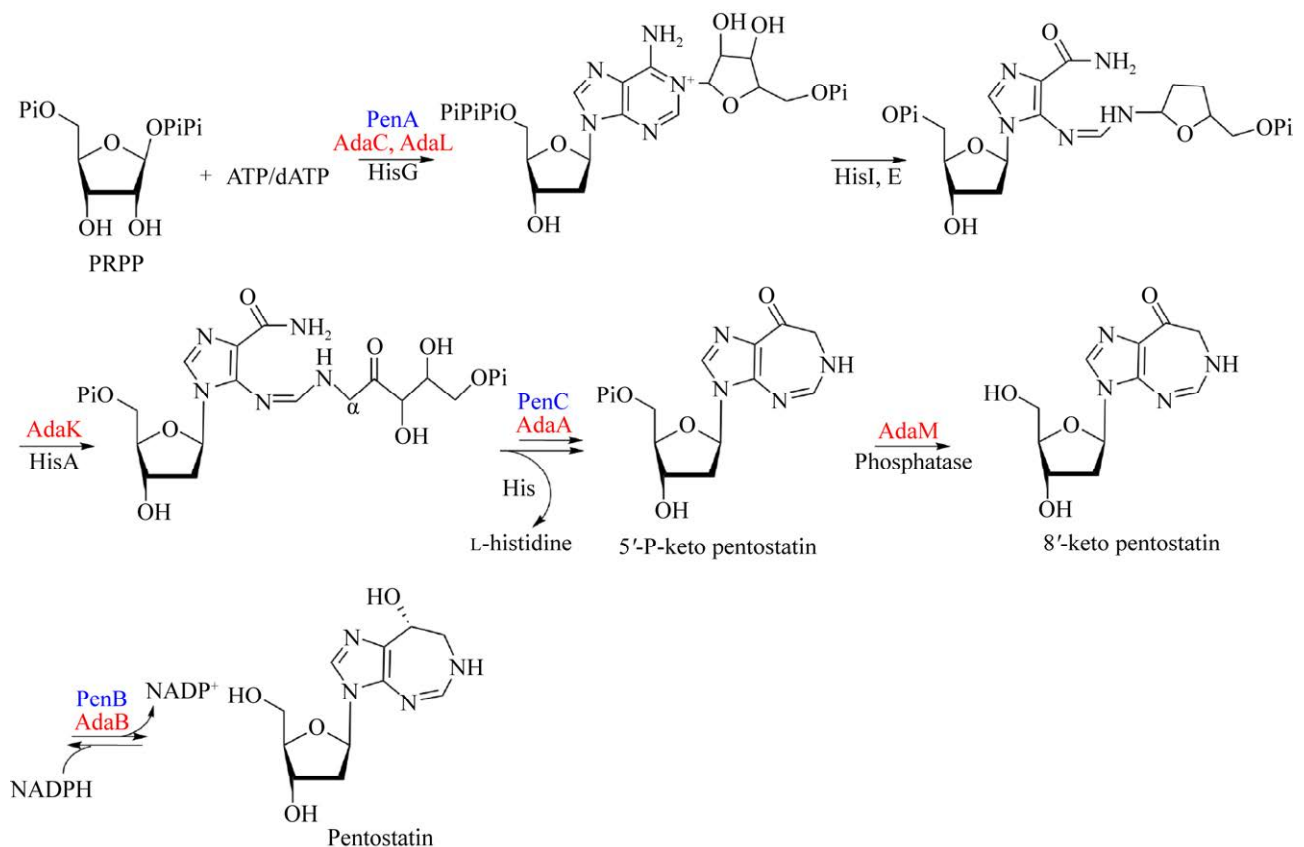


图 3 细菌中的喷司他丁生物合成途径 (根据文献[13]和[27]修改)

Fig. 3 The biosynthetic pathway of pentostatin in bacteria (modified from reference [13] and [27]). PRPP: phosphoribosyl pyrophosphate; PenA, AdaC, AdaL, HisG: ATP phosphoribosyltransferase; HisE: phosphoribosyl-ATP pyrophosphohydrolase; HisI: phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase; HisA: phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase; AdaK: phosphoribosyl isomerase A; His: other enzymes required to synthesize histidine; PenC, AdaA: SAICAR synthetase; PenB, AdaB: short-chain dehydrogenase; AdaM: hydrolase.

3.2 真菌中喷司他丁的生物合成机制

1979年, Kodama 等发现构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 能同时生产喷司他丁和虫草素, 这是真菌生产喷司他丁的首次报道^[33]。1983年, Kanbe 等报道了构巢裸胞壳 *Emericella nidulans* 也能合成喷司他丁^[34]。2017年, 中国科学院上海植物生理生态研究所王成树团队通过蛹虫草基因组数据分析, 鉴定出虫草素生物合成基因簇 *cns*。该基因簇全长 10.3 kb, 由 *cns1-cns4* 组成, 其中 *Cns1* 和 *Cns2* 负责虫草素的合成, *Cns3* 和 *Cns4* 参与喷司他丁生物合成及转运^[28]。该团队的进一步研究发现, *Cns3* 包含核苷/核苷酸激酶 (Nucleoside/nucleotide kinase, NK) 与 HisG 两个结构域。在罗伯茨绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 与球孢虫草 *Cordyceps bassiana* 中异源表达 NK 与 HisG 结构域, 结果表明 HisG 结构域能独立介导喷司他丁的合成。最近, 山东大学凌建亚教授团队基于蛹虫草的研究, 从九州虫草 *Cordyceps kyushuensis Kobayasi* 中比对出 4 个参与虫草素和喷司他丁合

成的假定基因, 但未对其功能进行进一步的验证^[35]。目前, 在真菌中的喷司他丁生物合成途径如图 4 所示。

携带有喷司他丁生物合成基因簇的细菌与真菌, 在合成喷司他丁的同时, 还能生产其他腺苷类似物。喷司他丁通过抑制腺苷脱氨酶的活性, 可防止微生物细胞中伴生的其他腺苷类似物经腺苷脱氨酶脱氨发生转化, 这一保护机制被称为 Protector-protégé strategy^[27-28]。表 2 对比了抗生链霉菌与蛹虫草体内喷司他丁的生物合成过程。放线菌中由多酶共同参与喷司他丁的合成, 但蛹虫草中仅 *Cns3* 就能转化喷司他丁的合成。造成这种现象的原因一方面可能是细菌与真菌进化上存在的差异, 另一方面可能是这类真菌中有其他内源酶参与了喷司他丁的合成。研究表明, 源于抗生链霉菌参与喷司他丁合成的功能酶 PenA、PenB 和 PenC 与源于蛹虫草的功能酶 *Cns3* 并未存在序列相似性^[28]。除此之外, 真菌与细菌中喷司他丁合成酶是否共用一个途径, 还需要进一步的研究来验证。

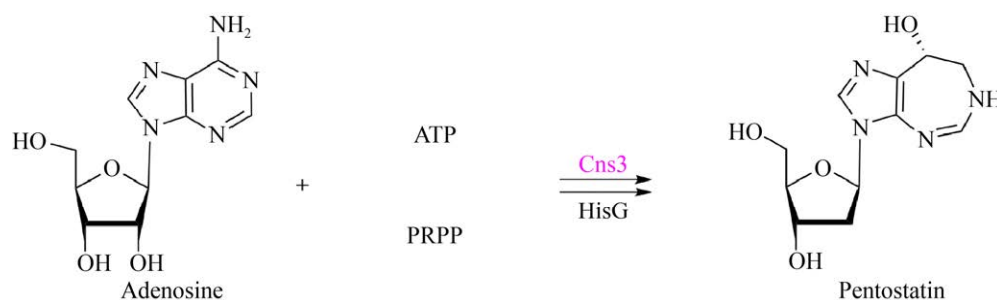


图 4 真菌中的喷司他丁生物合成途径 (根据文献[28]修改)

Fig. 4 The biosynthetic pathway of pentostatin in fungus (modified from reference [28]). *Cns3*, HisG: ATP phosphoribosyltransferase.

表 2 抗生链霉菌与蛹虫草体内喷司他丁合成过程的比较

Table 2 Comparison of the biosynthetic pathway of pentostatin between *Streptomyces antibioticus* and *Cordyceps militaris*

	<i>Streptomyces antibioticus</i>	<i>Cordyceps militaris</i>
Substrate	PRPP, dATP	PRPP, adenosine
Enzyme	PenA, PenB, PenC	<i>Cns3</i>
NADPH	√	Unknown
ATP	√	√
Protector-protégé strategy	Arabinofuranosyladenine	Cordycepin

4 喷司他丁的发酵生产

相对于步骤烦琐、反应条件苛刻的化学合成,微生物合成喷司他丁具有合成步骤简单、收率高、成本较低等优势^[36]。目前,微生物合成喷司他丁的菌株主要是抗生链霉菌与马杜拉放线菌,成品药 Nipent[®]已经采用抗生链霉菌进行生产。

1975年, Warner-Lambert 公司发表专利提供了一种利用抗生链霉菌 NRRL 3238 发酵生产喷司他丁的方法,并于 1992 年报道了从抗生链霉菌 NRRL 3238 发酵液中大规模分离提取喷司他丁的方法,其提取纯度大于 99.7%^[37-38]。1995 年, Warner-Lambert 公司进一步优化喷司他丁分离提取的方法,将 50 000 L 的发酵液经微孔过滤器过滤后,通过 5 000 L 的离子交换柱,经过“洗脱→浓缩→沉淀→过滤→重结晶→分离”等多个步骤后,得到 648.5 g (纯度 > 99.7%) 喷司他丁^[10]。2010 年,华东医药集团朱健等公开了一种链霉菌 SW 0701 发酵生产喷司他丁的专利,但未报道具体产量^[39]。上海医药工业研究院陈少欣等通过优化抗生链霉菌 NRRL 3238 的培养基组分、温度和 pH 等发酵参数,使喷司他丁产量达到 55 mg/L^[40]。2013 年,福建微生物研究所邹昕研究员通过优化抗生链霉菌 Fim 06-063 发酵条件,包括 pH、温度、接种量及发酵周期等参数,使得喷司他丁产量达到 183 mg/L^[41]。最近,福建微生物研究所郑孝贤研究员发现添加植物油对提升抗生链霉菌产喷司他丁能力有显著的影响^[42]。在该研究中,通过优化发酵工艺,建立了抗生链霉菌 Fim 0426 摇瓶水平发酵产量为 232 mg/L 的工艺;在此基础上,放大发酵工艺,最终实现抗生链霉菌 Fim 0426 在 5 000 L 发酵罐中产 210 mg/L 喷司他丁的能力。

此外, Warner-Lambert 公司发现马杜拉放线菌 ATCC 39365 可以合成喷司他丁衍生物——2'-氯代喷司他丁^[43-44]。2014 年,中国科学院天津工业生物技术研究所刘涛团队在最适 pH 发酵条件下,采用变温发酵技术,使得马杜拉放线菌 ATCC

39365 产喷司他丁能力达 100 mg/L^[45]。2019 年,天津商业大学王素英教授团队通过常压室温等离子诱变 (Atmospheric room temperature plasma, ARTP) 技术与核糖体工程,成功筛选到一株马杜拉放线菌 ATCC 39365 突变菌株,其摇瓶水平发酵产量为 6.077 mg/L^[46]。

目前,研究人员主要通过优化微生物菌株外界生产环境,包括培养基组分、温度、pH 等发酵参数,以提升喷司他丁合成效率。在现有的研究报告中,利用微生物合成喷司他丁的最高产量为 232 mg/L,但这与工业化生产还存有较大的差距。因此,利用系统代谢工程进行喷司他丁的规模化生产已成为必然趋势。

5 总结与展望

喷司他丁注射剂 Nipent[®]作为治疗毛细胞性白血病的一线药物,其售价高达 2 200 美元每瓶 (10 mg)^[47]。目前,既无原研药进入我国市场,也无国内企业生产这类药物。为了满足喷司他丁的市场需求,出于当前合成喷司他丁方式存在的局限,迫切需要建立一种更加经济、高效、绿色的生物合成方法。微生物的高效合成需要解决菌种和发酵工艺两个关键性问题。尽管,已有多株菌种用于喷司他丁的发酵生产,并利用现代发酵技术优化生产条件,但产量较低,难以满足临床需求。研究表明,喷司他丁关键酶的过表达及前体物质的添加已被证明能显著增加喷司他丁的产量^[28]。

通过现代生物技术对菌种进行基因改造,使喷司他丁绿色高效合成成为可能。系统代谢工程作为一种提升菌株性能的有力研究策略,通过将系统生物学、合成生物学、进化工程与传统代谢工程相结合,为实现喷司他丁高效生物合成提供了新方法与新思路^[48]。转录因子的调控、核糖体工程、前体饲喂、生物合成基因簇的修饰及扩增等手段是增加核苷类抗生素产量的通用策略^[49]。将来,可通过以下两方面策略来改造生产喷司他

丁的微生物细胞工厂,以提升目标产物合成效率。一方面,利用诱变育种策略,构建一株遗传性状稳定的高产菌株,以此为出发菌株,建立成熟的遗传操作手段,并在此基础上采用代谢工程手段对菌株进行改造,以提升喷司他丁的合成效率;另一方面,选择合适的底盘细胞以实现喷司他丁的异源从头合成。放线菌作为抗生素、抗肿瘤药物等次级代谢产物的主要来源菌,不仅能提供丰富的前体物质,还具备独特的抗性机制来抵御产物的自毒性^[50]。天蓝色链霉菌 *Streptomyces coelicolor*、变铅青链霉菌等常见的链霉菌底盘细胞宿主已成功实现多种核苷类抗生素的异源表达^[51]。除此之外,大肠杆菌、酿酒酵母作为模式微生物,具有遗传背景清晰、基因编辑技术成熟等优势,被广泛应用于各类天然产物的异源合成^[52]。目前,笔者实验室已经开展喷司他丁异源合成的相关工作。

喷司他丁在微生物细胞工厂中合成时,不仅给细胞带来较大的代谢压力,同时也会造成细胞代谢的失衡。针对这些问题,转运工程、共培养工程及动态调控等策略可有效改善细胞代谢压力^[53-55]。采用转运工程策略可将喷司他丁分泌到胞外,减少胞内产物积累对细胞造成的毒害;通过分析喷司他丁生物合成途径的特征,采用动态调控策略通过平衡微生物生长与目标产物的合成,使得代谢流更多用于喷司他丁的合成;基于模块化工程设计喷司他丁合成路径,通过共培养工程思路构建高版本生物体系进行目标产物优质合成,提升喷司他丁生产效率。随着代谢工程与合成生物技术的快速发展,改造微生物使其成为高效生产喷司他丁的细胞工厂,为解决喷司他丁高效优质合成开辟了一条新途径。本文通过介绍喷司他丁的合成方法及其生物合成机制,并提供提升喷司他丁合成效率的相关策略,以期对喷司他丁的生物合成提供参考。

REFERENCES

- [1] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770-803.
- [2] Catteau L, Zhu L, Van Bambeke F, et al. Natural and hemi-synthetic pentacyclic triterpenes as antimicrobials and resistance modifying agents against *Staphylococcus aureus*: a review. *Phytochem Rev*, 2018, 17(5): 1129-1163.
- [3] Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2016, 43(2/3): 155-176.
- [4] Niu G, Tan H. Nucleoside antibiotics: biosynthesis, regulation, and biotechnology. *Trends Microbiol*, 2015, 23(2): 110-119.
- [5] Isono K. Nucleoside antibiotics: structure, biological activity, and biosynthesis. *J Antibiot*, 1988, 41(12): 1711-1739.
- [6] Baker DC, Putt SR. A total synthesis of pentostatin, the potent inhibitor of adenosine deaminase. *J Am Chem Soc*, 1979, 101(20): 6127-6128.
- [7] Woo PWK, Dion HW, Lange SM, et al. A novel adenosine and Ara-a deaminase inhibitor, (R)-3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3]diazepin-8-ol. *J Heterocycl Chem*, 1974, 11(4): 641-643.
- [8] Agarwal RP, Spector T, Parks RE Jr. Tight-binding inhibitors—IV. Inhibition of adenosine deaminases by various inhibitors. *Biochem Pharmacol*, 1977, 26(5): 359-367.
- [9] 徐积恩. 抗肿瘤药——喷司他丁. 国外医药 合成药 生化药 制剂分册, 1994(3): 175-176.
Xu JE. Pentostatin, an antitumor drugs. *World pharm*, 1994, 15(3): 175-176 (in Chinese).
- [10] French JC, Edmunds CR, McDonnell P, et al. Process for purifying pentostatin. *Biotechnol Adv*, 1996, 14(4): 609.
- [11] 王鹏. 抗肿瘤药——喷司他丁. 中国药学杂志, 1999, 34(10): 3-5.
Wang P. Antitumor drugs—pentostatin. *Chin Pharmacol J*, 1999, 34(10): 3-5 (in Chinese).
- [12] Iannitto E, Tripodo C. How I diagnose and treat splenic lymphomas. *Blood*, 2011, 117(9): 2585-2595.

- [13] Gao YJ, Xu GD, Wu P, et al. Biosynthesis of 2'-chloropentostatin and 2'-amino-2'-deoxyadenosine highlights a single gene cluster responsible for two independent pathways in *Actinomadura* sp. strain ATCC 39365. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(10): e00078-17.
- [14] Cha S, Agarwal RP, Parks RE. Tight-binding inhibitors-II. non-steady state nature of inhibition of milk xanthine oxidase by allopurinol and alloxanthine and of human erythrocytic adenosine deaminase by coformycin. *Biochem Pharmacol*, 1975, 24(23): 2187-2197.
- [15] Schramm VL, Baker DC. Spontaneous epimerization of (S)-deoxycoformycin and interaction of (R)-deoxycoformycin, (S)-deoxycoformycin, and 8-ketodeoxycoformycin with adenosine deaminase. *Biochemistry*, 1985, 24(3): 641-646.
- [16] Caron N, Lee SH, Kimball AP. Effects of 2'-deoxycoformycin, 9-beta-D-arabinofuranosyladenine 5'-phosphate, and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine triple combination therapy on intracerebral leukemia 1210. *Cancer Res*, 1977, 37(9): 3274-3279.
- [17] Alfayez M, Thakral B, Jain P, et al. First report of clinical response to venetoclax combination with pentostatin in T-cell-prolymphocytic leukemia (T-PLL). *Leuk Lymphoma*, 2020, 61(2): 445-449.
- [18] Lamanna N, Kalaycio M, Maslak P, et al. Pentostatin and cyclophosphamide with or without rituximab has significant activity in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia and other low grade lymphoid neoplasms. *Blood*, 2011, 104(11): 3484.
- [19] Chan E, Putt SR, Showalter HDH, et al. Total synthesis of (8R)-3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3] diazepin-8-ol(pentostatin), the potent inhibitor of adenosine deaminase. *J Org Chem*, 1982, 47(18): 3457-3464.
- [20] Thien VT, Henry R. Chiro-specific synthesis of the tetrahydroimidazodiazepinol aglycon of pentostatin and its analogs. *J Org Chem*, 1993, 58(22): 6090-6096.
- [21] Chen BC, Chao ST, Sundeen JE, et al. Vicarious nucleophilic substitution of 1-benzyl-5-nitroimidazole, application to the synthesis of 6,7-dihydroimidazo[4,5-d][1,3] diazepin-8(3H)-one. *Tetrahedron Lett*, 2002, 43(9): 1595-1596.
- [22] Nadji S, James S, Umashanker S. Process for the production of pentostatin aglycone and pentostatin: US, 7393954. 2002-12-12.
- [23] Phiasivongsa P, Redkar S. Azacytosine analogs and derivatives: US, 20060205687. 2006-9-14.
- [24] 高丽萍. 喷司他汀的合成与质量控制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
Gao LP. Studies of pentostatin synthesis and quality control[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010 (in Chinese).
- [25] Shiraishi T, Kuzuyama T. Recent advances in the biosynthesis of nucleoside antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*, 2019, 72(12): 913-923.
- [26] Lacalle RA, Tercero JA, Jiménez A. Cloning of the complete biosynthetic gene cluster for an aminonucleoside antibiotic, puromycin, and its regulated expression in heterologous hosts. *EMBO J*, 1992, 11(2): 785-792.
- [27] Wu P, Wan D, Xu G, et al. An unusual protector-protégé strategy for the biosynthesis of purine nucleoside antibiotics. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(2): 171-181.
- [28] Xia Y, Luo F, Shang Y, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(12): 1479-1489.e4.
- [29] Hanvey JC, Hawkins ES, Tunac JB, et al. Biosynthesis of 2'-deoxycoformycin: evidence for ring expansion of the adenine moiety of adenosine to a tetrahydroimidazo[4,5-d][1,3]diazepine system. *Biochemistry*, 1987, 26(18): 5636-5641.
- [30] Hanvey JC, Smal E, Suhadolnik RJ, et al. 2'-deoxycoformycin: biosynthesis and enzymatic conversion of 8-keto-deoxycoformycin to 2'-deoxycoformycin by *Streptomyces antibioticus*. *Nucleosides Nucleotides*, 1987, 6(1/2): 495-496.
- [31] Hanvey JC, Hawkins ES, Baker DC, et al. 8-ketodeoxycoformycin and 8-ketocoformycin as intermediates in the biosynthesis of 2'-deoxycoformycin and coformycin. *Biochemistry*, 1988, 27(15): 5790-5795.

- [32] Ren DA, Rusczycky MW, Ko Y, et al. Characterization of the coformycin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces kaniharaensis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(19): 10265-10270.
- [33] Kodama K, Kusakabe H, Machida H, et al. Isolation of 2'-deoxycoformycin and cordycepin from wheat bran culture of *Aspergillus nidulans* Y₁₇₆₋₂. Agric Biol Chem, 1979, 43(11): 2375-2377.
- [34] Kanbe T, Endo A, Hashizume T. Production of 2'-deoxycoformycin by the fungus *Emericella nidulans* and its inhibitory effect on adenosine deaminase. Nucleic Acids Symp Ser, 1983(12): 115-118.
- [35] Zhao X, Zhang G, Li C, et al. Cordycepin and pentostatin biosynthesis gene identified through transcriptome and proteomics analysis of *Cordyceps kyushuensis* Kob. Microbiol Res, 2019, 218: 12-21.
- [36] 李晓辉. 喷司他丁生物合成的发酵优化[D]. 天津: 天津科技大学, 2014.
Li XH. Optimization of fermentation for pentostatin biosynthesis[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2014 (in Chinese).
- [37] Woo PW, Dion HW, Ryder A, et al. (R)-3-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-3,6,7,8-tetrahydroimidazo[4,1-b]pyridin-8-ol: US, 3923785. 1974-04-22.
- [38] Showalter HD, Bunge RH, French JC, et al. Improved production of pentostatin and identification of fermentation cometabolites. J Antibiot (Tokyo), 1992, 45(12): 1914-1918.
- [39] 朱健, 陈晓霞, 谢祥茂, 等. 一种链霉菌及其应用: 中国, 101792722A. 2010-08-04.
Zhu J, Chen XX, Xie XM, et al. *Streptomyces* and application thereof: CN, 101792722A. 2010-08-04 (in Chinese).
- [40] 陈少欣, 王岩, 杨鹏. 抗生链霉菌发酵生产喷司他丁的发酵培养基以及发酵方法: 中国, 102234673A. 2011-11-09.
Chen SX, Wang Y, Yang P. Fermentation culture medium and fermentation method for producing pentostatin by fermentation of *Streptomyces antibioticus*: CN, 102234673A. 2011-11-09 (in Chinese).
- [41] 邹昕. 喷司他丁发酵条件的优化. 生物技术进展. 2013, 3(5): 371-376.
Zou X. Optimization of pentostatin fermentation conditions. Curr Biotechnol, 2013, 3(5): 371-376 (in Chinese).
- [42] 郑孝贤. 抗生素链霉菌合成喷司他丁发酵工艺的关键原料研究. 中国抗生素杂志, 2019, 44(12): 1371-1376.
Zhen XX. Studies on the critical materials in the fermentation process of pentostatin produced by *Streptomyces antibioticus*. Chin J Antibio, 2019, 44(12): 1371-1376 (in Chinese).
- [43] Tunac JB, Underhill M. 2'-chloropentostatin: discovery, fermentation and biological activity. J Antibiot, 1985, 38(10): 1344-1349.
- [44] Schaumberg JP, Hokanson GC, French JC, et al. 2'-chloropentostatin, a new inhibitor of adenosine deaminase. J Org Chem, 1985, 50(10): 1651-1656.
- [45] 李晓辉, 姜文侠, 张笑然, 等. 变温及控制 pH 提高喷司他丁发酵产量. 药物生物技术, 2014, 21(5): 433-436.
Li XH, Jiang WX, Zhang XR, et al. Effects of temperature and pH on fermentation of pentostatin production. Pharm Biotechnol, 2014, 21(5): 433-436 (in Chinese).
- [46] 周秋玲. 复合育种策略选育喷司他丁高产菌株[D]. 天津: 天津商业大学, 2019.
Zhou QL. Breeding the strain with high-yield of pentostatin by combined mutation strategy[D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2019 (in Chinese).
- [47] 美国药店注射用喷司他丁 Nipent 实时价格 [EB/OL]. [2021-05-17]. <https://www.pharmacychecker.com/nipent/?zipcode=10605>.
- [48] Ko YS, Kim JW, Lee JA, et al. Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production. Chem Soc Rev, 2020, 49(14): 4615-4636.
- [49] Gong R, Yu L, Qin Y, et al. Harnessing synthetic biology-based strategies for engineered biosynthesis of nucleoside natural products in actinobacteria. Biotechnol Adv, 2021, 46: 107673.
- [50] 肖丽萍, 邓子新, 刘天罡. 链霉菌底盘细胞的开发现状及其应用. 微生物学报, 2016, 56(3): 441-453, 330.

- Xiao LP, Deng ZX, Liu TG. Progress in developing and applying *Streptomyces chassis*. *Acta Microbiol Sin*, 2016, 56(3): 441-453, 330 (in Chinese).
- [51] Ahmed Y, Rebets Y, Estévez MR, et al. Engineering of *Streptomyces lividans* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 5.
- [52] Lee SY, Kim HU, Chae TU, et al. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nat Catal*, 2019, 2(1): 18-33.
- [53] Bu X, Lin JY, Cheng J, et al. Engineering endogenous ABC transporter with improving ATP supply and membrane flexibility enhances the secretion of β -carotene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 168.
- [54] Yuan SF, Yi X, Johnston TG, et al. *De novo* resveratrol production through modular engineering of an *Escherichia coli*-*Saccharomyces cerevisiae* co-culture. *Microb Cell Fact*, 2020, 19(1): 143.
- [55] 于政, 申晓林, 孙新晓, 等. 动态调控策略在代谢工程中的应用研究进展. *合成生物学*, 2020, 1(4): 440-453.
- Yu Z, Shen XL, Sun XX, et al. Application of dynamic regulation strategies in metabolic engineering. *Synth Biol J*, 2020, 1(4): 440-453 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)