



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105555265 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201480023902. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 02. 27

A61K 31/352(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/127(2006. 01)

61/770, 766 2013. 02. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/018944 2014. 02. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/134281 EN 2014. 09. 04

(71) 申请人 全谱实验室有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 罗伯特·温尼茨基 马克·东斯基

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司
责任公司 11287

代理人 林彦

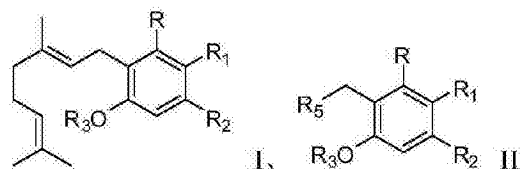
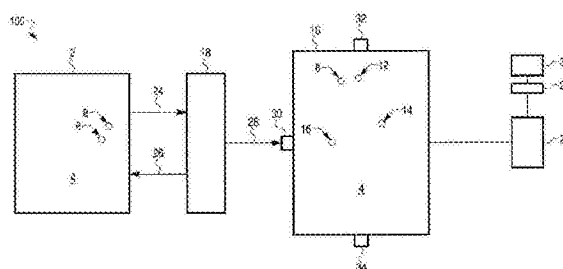
权利要求书4页 说明书21页 附图1页

(54) 发明名称

大麻素的生物合成

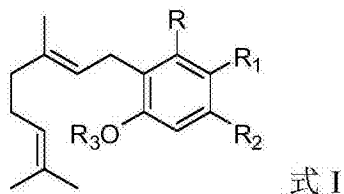
(57) 摘要

本发明提供制造大麻素和大麻素类似物的方法以及制造这些化合物的系统。本发明方法针对根据式 I 或式 II 的化合物与大麻素合成酶接触。还描述一种用于制造大麻素和大麻素类似物的系统,其通过使 THCA 合成酶与大麻素前驱体接触并且改性所述反应混合物的至少一种特性以相对于第二大麻素形成的量影响第一大麻素形成的量。



1. 一种制造大麻素或大麻素类似物的方法,其包含以下步骤:

(a)选择根据式I的化合物;



(b)选择大麻素合成酶作为将所述式I化合物转换成所述大麻素或大麻素类似物的催化剂;

(c)使所述式I化合物与所述大麻素合成酶在溶剂存在下反应;

(d)分离来自步骤(b)的产物;以及

(e)任选地使来自(c)的产物脱羧;

其中

R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团;

R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基,或

R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环;

R₃选自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基;以及

R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基;

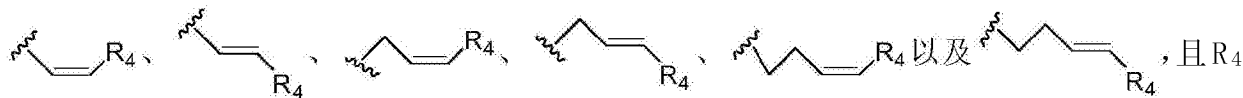
其前提条件是所述大麻素不是四氢大麻酚或大麻二酚。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述大麻素合成酶选自由以下组成的群组:大麻二酚酸合成酶、四氢大麻酚酸合成酶以及大麻环萜酚酸合成酶。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述C₅-C₁₀环状环包含一或多个选自氧、硫或氮的杂原子。

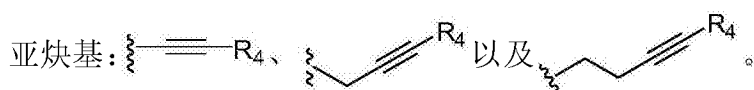
4. 根据权利要求1所述的方法,其中R₂为选自由以下组成的群组的直链亚烷基:CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉、C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₇H₁₅以及C₈H₁₇。

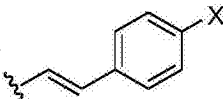
5. 根据权利要求1所述的方法,其中R₂为选自由以下组成的群组的C₂-C₁₀亚烯基:



为选自由以下组成的群组的直链亚烷基:CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉、C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₇H₁₅以及C₈H₁₇。

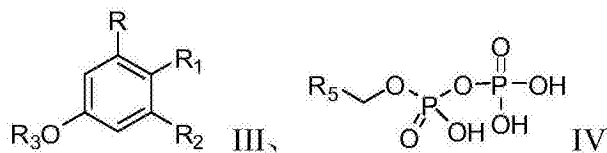
6. 根据权利要求1所述的方法,其中R₂为选自由以下组成的群组的C₂-C₁₀直链或分支链



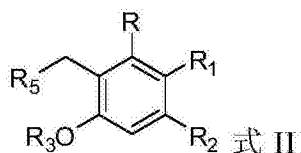
7. 根据权利要求1所述的方法,其中R₂为 , 其中X选自-OH、-SH或-NR_aR_b。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中R为-OH, R₁为-COOH, R₂为C₅H₁₁且R₃为-H。

9. 根据权利要求2所述的方法, 其另外包含使所述大麻素合成酶偶联到固体支撑物。
10. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述大麻素或大麻素类似物为单个对映异构体。
11. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述大麻素或大麻素类似物的对映异构纯度为至少95%。
12. 根据权利要求10所述的方法, 其中所述大麻素或大麻素类似物的所述对映异构纯度为至少99%。
13. 一种制造根据式II的大麻素或大麻素类似物的方法, 所述方法包含以下步骤:
- (a) 使根据式III的化合物与根据式IV的化合物;



在催化所述式III化合物与式IV化合物反应的酶存在下反应以形成式II化合物;



- (b) 使所述式II化合物与大麻素合成酶在溶剂存在下反应;
- (c) 分离来自步骤(b)的产物; 以及
- (d) 任选地使来自(c)的产物脱羧获得所述大麻素或所述大麻素类似物;
- 其中

R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团;

R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的直链或分支链(C₁-C₁₀)亚烷基、任选经取代的直链或分支链(C₂-C₁₀)亚烯基、任选经取代的直链或分支链(C₂-C₁₀)亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基, 或

R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环;

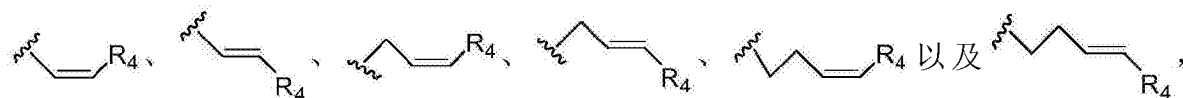
R₃选自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基;

R₅选自由以下组成的群组: 直链或分支链(C₁-C₁₀)亚烷基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚烯基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚炔基、-C(O)-(C₁-C₁₀)亚烷基、-C(O)-(C₂-C₁₀)亚烯基以及-C(O)-(C₂-C₁₀)亚炔基;

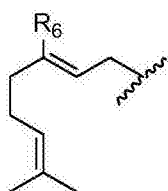
其中任何亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、芳基亚烷基或环烷基经一或多个选自由以下组成的群组的基团进一步取代:-OH、卤素、-NR_bR_c、-C(O)R_a、-C(O)NR_bR_c、(C₁-C₁₀)烷基、-CN、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)卤烷基以及(C₁-C₄)羟基烷基; 以及

R_a、R_b以及R_c各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中R₅为选自由以下组成的群组的(C₂-C₁₀)亚烯基:

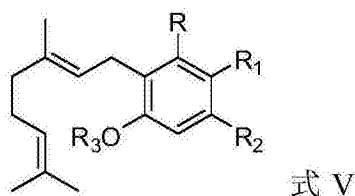


且R₄为选自由以下组成的群组的直链亚烷基:CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉、C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₇H₁₅以及C₈H₁₇。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中R₅为  且R₆选自(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₂-C₁₀)亚烯基、-OH、-SH、NO₂、F、Cl、Br、-NH₂或-NHR_a。

16. 一种用于制造四氢大麻酚、大麻环萜酚或四氢大麻酚和大麻环萜酚两者、或其类似物的方法, 其包含以下步骤:

(a) 选择根据式V的化合物;



(b) 使所述式V化合物与四氢大麻酚合成酶在溶剂存在下反应;

(c) 改性包含式V化合物和四氢大麻酚合成酶的反应混合物的至少一种特性以获得四氢大麻酚、大麻环萜酚或四氢大麻酚和大麻环萜酚两者或其类似物作为产物;

其中

R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团;

R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基, 或

R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环;

R₃选自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基; 以及

R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中步骤(c)包含改变所述反应混合物的pH。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述pH在约4.0到约8.0单位的范围内。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中特定pH下四氢大麻酚对大麻环萜酚的比率如下表所示:

pH	THCA	CBCA
4	100	痕量
5	70	30
6	85	15
7	0	100
8	0	0

20. 一种用于制造大麻素或大麻素类似物的系统, 其包含:

固持培养基和多个细胞的发酵器,其中所述细胞被配置成产生和分泌大麻素合成酶;
含有反应物的生物反应器,所述反应物被配置成与大麻素合成酶相互作用形成第一大麻素和第二大麻素;以及

控制机构,其被配置成控制所述生物反应器的条件,

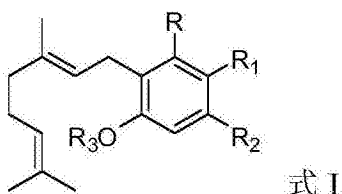
其中相对于第二大麻素形成的量,所述生物反应器的所述条件影响所述第一大麻素形成的量,以及

其中所述第一和所述第二大麻素为天然存在的大麻素或大麻素类似物中的每一者。

21. 根据权利要求20所述的系统,其另外包含被配置成至少部分分离所述多个细胞与所述培养基的过滤器,使得分离后所述培养基含有所述多个细胞产生的大麻素合成酶。

22. 根据权利要求20所述的系统,其中所述生物反应器为含有镍的柱式生物反应器,且其中所述大麻素合成酶包括被配置成结合到镍的标签。

23. 根据权利要求20所述的系统,其中所述反应物为根据式I的化合物;



其中

R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团;

R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基,或

R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环;

R₃选自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基;以及

R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。

24. 根据权利要求20所述的系统,其中所述大麻素合成酶为四氢大麻酚酸合成酶。

25. 根据权利要求24所述的系统,其中所述第一大麻素为四氢大麻酚酸和大麻环萜酚酸中的一者并且所述第二大麻素为四氢大麻酚酸和大麻环萜酚酸中的另一者。

26. 根据权利要求24所述的系统,其中所述四氢大麻酚酸合成酶与所述生物反应器中的所述反应物相互作用形成所述第一大麻素和所述第二大麻素两者。

27. 根据权利要求20所述的系统,其中所述生物反应器的所述条件随pH、溶剂、温度、压力以及流动速率中的至少一者改变。

28. 根据权利要求20所述的系统,其中所述生物反应器的所述条件的改变被配置成引起以下位移:从1)相对于所述第二大麻素以较大量形成所述第一大麻素到2)相对于所述第一大麻素以较大量形成所述第二大麻素。

29. 根据权利要求1、13和16中任一权利要求所述的方法,其中所述溶剂为DMSO。

大麻素的生物合成

技术领域

[0001] 本申请案要求2013年2月28日申请的美国临时专利申请案第61/770,766号的优先权,所述临时专利申请案的内容通过引用并入本文中。

[0002] 本发明涉及大麻素的生物合成。更具体来说,本发明涉及使用蛋白激酶合成酶酶类离体制造毫克到克或千克量的适于医药和保健食品应用的大麻素的方法,所述酶类负责在植物中合成大麻素。

背景技术

[0003] 大麻素为衍生自大麻(*Cannabis sativa*)的化合物,大麻为大麻科的一年生植物。所述植物含有约60种大麻素。大部分熟知的天然存在的大麻素为四氢大麻酚(THC),其用于治疗各种医学病况,包括青光眼、AIDS消瘦、神经痛、治疗与多发性硬化症有关的痉挛、肌肉纤维疼痛以及化学疗法诱发的恶心。另外,已报告THC呈现治疗过敏、发炎、感染、癫痫症、抑郁症、偏头痛、躁郁症、焦虑症以及药物依赖性和戒断综合症的治疗效果。THC作为抗催吐药物尤其有效并且投予以控制呕吐,呕吐是使用类鸦片镇痛剂和麻醉剂、高度活性抗反转录病毒疗法和癌症化学疗法所伴随的常见副作用。

[0004] 大麻素逐渐用于医药和保健食品应用。用于此类应用的大麻素化合物几乎完全获自天然来源,例如植物组织。因此,现有技术披露使用不同溶剂萃取方法从大麻植物的毛状体获得大麻素化合物。一些与此类方法有关的缺点包括产量差,与植物生长和维持有关的高成本以及与植物提取物的提取和纯化有关的成本。植物的安全性还是制造医药级大麻素化合物的成本附加的重要考虑因素。

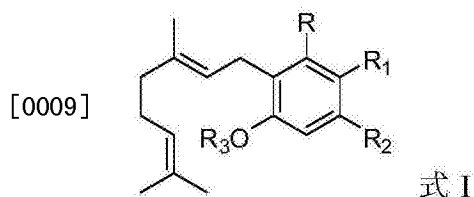
[0005] 然而,尤其用于治疗与化学疗法、疼痛有关的恶心和呕吐的大麻素化合物作为刺激患有消瘦综合症的AIDS患者食欲的药剂以及用于治疗青光眼的药剂的逐渐增加的重要性已促使本发明者开发离体酶催化的半合成方案来大规模制造大麻素和大麻素类似物。本发明方法还允许以降低的成本合成大麻素和其类似物。

发明内容

[0006] 前述总体描述以及下文的附图说明和具体实施方式都是示范性以及说明性的,并且打算提供对所主张的本发明的进一步解释。所属领域的技术人员从本发明的以下详细描述容易显而易见其它目标、优势和新颖特征。

[0007] 一方面,本发明提供一种制造大麻素或大麻素类似物的方法,所述方法通过:

[0008] (a)选择根据式I的化合物;



[0010] (b)选择大麻素合成酶作为将式I化合物转换成大麻素或大麻素类似物的催化剂;

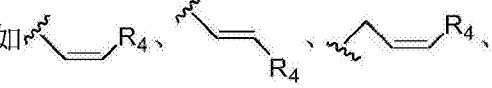
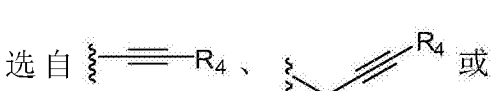
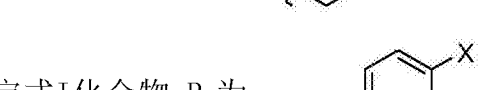
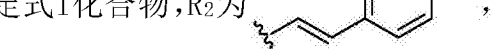
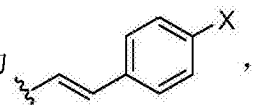
[0011] (c)使式I化合物与大麻素合成酶接触;以及

[0012] (d)分离来自步骤(b)的产物。可以依据这一合成策略将分离的产物脱羧。

[0013] 在式I中,R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团。取代基R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基。

[0014] 对于某些式I化合物,R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环。一方面,C₅-C₁₀环状环包含一或多个选自氧、硫或氮的杂原子。式I中的R₃选自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基,而R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。然而,本发明方法不允许四氢大麻酚或大麻二酚的合成。

[0015] 依据这一策略,大麻素合成酶选自大麻二醇酸合成酶、四氢大麻酚酸合成酶或大麻环萜酚酸合成酶群组。

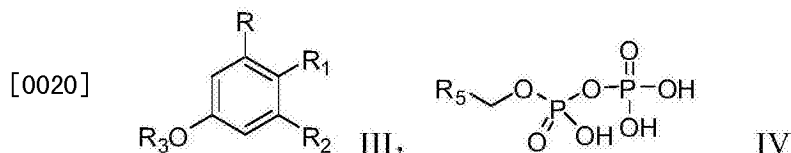
[0016] 式I中的R₂可为直链亚烷基、C₂-C₁₀亚烯基,例如  ,  , 或选自  或  的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基。对于特定式I化合物,R₂为  ,

其中X选自-OH、-SH或-NR_aR_b。

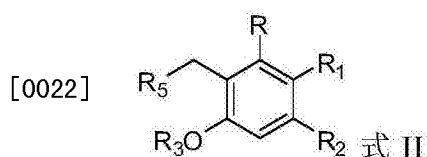
[0017] 一方面,本发明方法描述大麻素合成酶与固体支撑物的固定。根据上文所述的方法制造的大麻素和大麻素类似物以单个对映异构体形式存在。这些化合物的对映异构纯度为至少95%到至少99%。

[0018] 根据另一实施例提供制造根据式II的大麻素或大麻素类似物的方法,所述方法通过:

[0019] (a)使根据式III的化合物与根据式IV的化合物;



[0021] 在催化式III化合物与式IV化合物反应的酶存在下反应形成式II化合物;



[0023] (b)使式II化合物与大麻素合成酶接触;

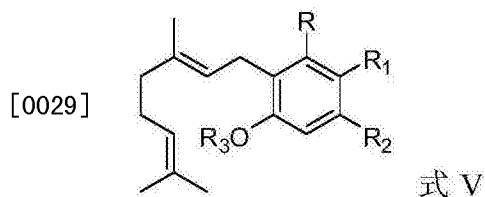
[0024] (c)分离来自步骤(b)的产物;以及

[0025] (d)任选地使来自(c)的产物脱羧获得大麻素或大麻素类似物。

[0026] 取代基R、R₁、R₂以及R₃如上文所定义并且R₅选自由以下组成的群组：直链或分支链(C₁-C₁₀)亚烷基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚烯基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚炔基、-C(O)-(C₁-C₁₀)亚烷基、-C(O)-(C₂-C₁₀)亚烯基以及-C(O)-(C₂-C₁₀)亚炔基。此外，对于式II、III和IV化合物，任何亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、芳基亚烷基或环烷基经一或多个选自由以下组成的群组的基团进一步取代：-OH、卤素、-NR_bR_c、-C(O)R_a、-C(O)NR_bR_c、(C₁-C₁₀)烷基、-CN、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)卤烷基以及(C₁-C₄)羟基烷基，并且R_a、R_b以及R_c可各自独立地为-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。

[0027] 还提供一种用于制造四氢大麻酚、大麻色素或四氢大麻酚和大麻色素两者或其类似物的方法，所述方法通过：

[0028] (a)选择根据式V的化合物；



[0030] (b)使式V化合物与四氢大麻酚酸合成酶接触；

[0031] (c)改性包含式V化合物和四氢大麻酚酸合成酶的反应混合物的至少一种特性获得四氢大麻酚、大麻环萜酚或四氢大麻酚和大麻色素两者或其类似物作为产物。

[0032] 对于式V化合物，R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团，R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组：-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基，并且R₃选自H、-C(O)R_a或C₁-C₁₀直链或分支链烷基。对于特定化合物，R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环并且取代基R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、-SH、-NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基。

[0033] 一方面，改性反应混合物的至少一种特性包含改变反应混合物的pH，例如将pH改为约4.0到约8.0单位的范围内从而控制上述方法制造的四氢大麻酚比大麻色素的比率。

[0034] 本发明技术还提供用于制造大麻素或大麻素类似物的系统。此类系统包含固持培养基和多个细胞的发酵器，其中细胞被配置成产生和分泌大麻素合成酶；含有反应物的生物反应器，反应物被配置成与大麻素合成酶相互作用形成第一大麻素和第二大麻素，以及被配置成控制生物反应器的条件的控制机构。后一控制机构用于相对于第二大麻素形成的量影响第一大麻素形成的量。

[0035] 所述系统可另外包含被配置成至少部分分离所述多个细胞与所述培养基的过滤器，使得分离后含有大麻素的培养基引入到生物反应器中。在一个实施例中，多个细胞表现的酶包括允许酶结合到生物反应器内的镍支撑物的标签。任何式I化合物或大麻萜酚酸都可以用作酶四氢大麻酚酸合成酶的底物。视生物反应器内的条件而定，四氢大麻酚酸或大麻环萜酚酸以第一大麻素的形式产生并且第二大麻素将为四氢大麻酚酸和大麻环萜酚酸中的另一个。

附图说明

[0036] 图1为用于根据示范性实施例制造大麻素或大麻素类似物的系统的示意性说明。

具体实施方式

[0037] 定义

[0038] 如本文所用,除非另外规定,否则单数形式“一”和“所述”包括多个参考物。因此,举例来说,提及“一个/种细胞”包括多个/种细胞,并且提及“一个/种分子”就是提及一或多个/种分子。

[0039] 如本文中所用,“约”将为所属领域普通技术人员理解并且在一定程度上将取决于其使用的情况而变化。如果使用所属领域普通技术人员不清楚的术语,那么考虑到其使用的情况,“约”将意味着达到特定术语的正或负10%。

[0040] 术语“烷基”指的是具有规定数目碳原子的直链或分支链饱和烃。举例来说,(C₁-C₁₀)烷基意味着包括(但不限于)甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、新戊基、己基、异己基以及新己基等。烷基可未经取代或任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。

[0041] 术语“烯基”指的是具有规定数目碳原子和至少一个双键的直链或分支链不饱和烃。(C₂-C₁₀)烯基的实例包括(但不限于)乙烯、丙烯、1-丁烯、2-丁烯、异丁烯、仲丁烯、1-戊烯、2-戊烯、异戊烯、1-己烯、2-己烯、3-己烯、异己烯、1-庚烯、2-庚烯、3-庚烯、异庚烯、1-辛烯、2-辛烯、3-辛烯、4-辛烯以及异辛烯。烯基可未经取代或任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。

[0042] 术语“炔基”指的是具有规定数目碳原子和至少一个三键的直链或分支链不饱和烃。(C₂-C₁₀)炔基的实例包括(但不限于)乙炔、丙炔、1-丁炔、2-丁炔、1-戊炔、2-戊炔、1-己炔、2-己炔、3-己炔、1-庚炔、2-庚炔、3-庚炔、1-辛炔、2-辛炔、3-辛炔以及4-辛炔。炔基可未经取代或任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。

[0043] 术语“烷氧基”指的是具有规定数目碳原子的-O-烷基。举例来说,(C₁-C₆)烷氧基包括-O-甲基、-O-乙基、-O-丙基、-O-异丙基、-O-丁基、-O-仲丁基、-O-叔丁基、-O-戊基、-O-异戊基、-O-新戊基、-O-己基、-O-异己基以及-O-新己基。

[0044] 术语“芳基”指的是3到14元单环、双环、三环或多环芳香族烃环系统。芳基的实例包括萘基、茚基和蒽基。芳基可未经取代或任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。

[0045] 单独或作为另一取代基的部分的术语“亚烷基”、“亚烯基”和“亚芳基”分别意味着衍生自以下的二价基团:烷基、环烷基、烯基、芳基或杂芳基,如-CH₂CH₂CH₂CH₂-所示范。对于亚烷基、烯基或芳基连接基团,未暗示连接基团的方向。

[0046] 术语“卤素”和“卤基”指的是-F、-Cl、-Br或-I。

[0047] 术语“杂原子”意味着包括氧(O)、氮(N)和硫(S)。

[0048] “羟基”指的是-OH基团。

[0049] 术语“羟基烷基”指的是具有规定数目碳原子的烷基,其中烷基的氢原子中的一或多个置换为-OH基团。羟基烷基的实例包括(但不限于)-CH₂OH、-CH₂CH₂OH、-CH₂CH₂CH₂OH、-CH₂CH₂CH₂CH₂OH、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH以及其分支链形式。

[0050] 术语“环烷基”指的是单环、双环、三环或多环3到14元环系统,其饱和、不饱和或为芳香族的。杂环可通过任何杂原子或碳原子连接。环烷基包括如上文所定义的芳基和杂芳基。环烷基的代表性实例包括(但不限于)环乙基、环丙基、环异丙基、环丁基、环戊基、环己基、环丙烯、环丁烯、环戊烯、环己烯、苯基、萘基、蒽基、苯并呋喃基以及苯并噻吩基。环烷基可未经取代或任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。

[0051] 术语“腈或氰基”可互换使用并且指的是结合于杂芳基环、芳基环和杂环烷基环的碳原子的-CN基团。

[0052] 术语“胺或氨基”指的是-NR_cR_d基团,其中R_c和R_d各自独立地指的是氢、(C₁-C₈)烷基、芳基、杂芳基、杂环烷基、(C₁-C₈)卤烷基以及(C₁-C₆)羟基烷基。

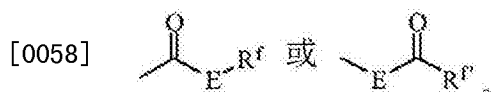
[0053] 术语“烷芳基”指的是C₁-C₈烷基,其中C₁-C₈烷基链的至少一个氢原子置换为芳基原子,所述原子可任选地经一或多个如下文所述的取代基取代。烷芳基的实例包括(但不限于)甲基苯基、乙基萘基、丙基苯基以及丁基苯基。

[0054] “芳基亚烷基”指的是二价亚烷基,其中C₁-C₁₀亚烷基中的一或多个氢原子置换为(C₃-C₁₄)芳基。(C₃-C₁₄)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基的实例包括但不限于1-苯基亚丁基、苯基-2-亚丁基、1-苯基-2-甲基亚丙基、苯基亚甲基、苯基亚丙基以及萘基亚乙基。

[0055] “芳基亚烯基”指的是二价亚烯基,其中C₂-C₁₀亚烯基中的一或多个氢原子置换为(C₃-C₁₄)芳基。

[0056] 术语“芳基亚炔基”指的是二价亚炔基,其中C₂-C₁₀亚炔基中的一或多个氢原子置换为(C₃-C₁₄)芳基。

[0057] 术语“羧基”和“羧酸酯基”包括可由以下通式表示的此类部分:



[0059] 所述式中的E为键或O,并且R^f独立地为H、烷基、烯基、芳基或药学上可接受的盐。其中E为O,并且R^f如上文所定义,所述部分在本文中称为羧基,并且具体来说,当R^f为氢时,所述式代表“羧酸”。一般来说,在明确显示氧置换为硫的情况下,所述式表示“硫羧基”。

[0060] 除非另外指示,否则“立体异构体”意味着实质上不含所述化合物的其它立体异构体的化合物的一种立体异构体。因此,具有一个手性中心的立体异构纯化合物实质上不含所述化合物的相反对映异构体。具有两个手性中心的立体异构纯化合物将实质上不含所述化合物的其它非对映异构体。典型立体异构纯化合物包含大于约80重量%的所述化合物的一种立体异构体以及小于约20重量%的所述化合物的其它立体异构体,例如大于约90重量%的所述化合物的一种立体异构体以及小于约10重量%的所述化合物的其它立体异构体,或大于约95重量%的所述化合物的一种立体异构体以及小于约5重量%的所述化合物的其它立体异构体,或大于约97重量%的所述化合物的一种立体异构体以及小于约3重量%的所述化合物的其它立体异构体。

[0061] 如果描绘的结构和根据所述结构给出的名称之间有偏差,那么以描绘的结构为准。另外,如果结构或结构的一部分的立体化学未用例如粗体或短划线指示,那么所述结构或所述结构的部分应解释为涵盖其所有立体异构体。

[0062] 本发明关注在无细胞环境中酶催化合成大麻素或大麻素类似物的方法。还描述一种用于离体制造大麻素和大麻素类似物的设备。术语“类似物”指的是与天然存在的大麻素

结构上相关的化合物,但其化学和生物学特性可能与天然存在的大麻素不同。在本发明的情形中,类似物指的是不呈现天然存在的大麻素的一或多种非所需副作用的化合物。类似物还指的是通过化学、生物学或半合成转型天然存在的大麻素从天然存在的大麻素衍生的化合物。

[0063] 本发明中包括但不限于的说明性大麻素化合物为大麻酚、大麻二酚、 Δ 9-四氢大麻酚、 Δ 8-四氢大麻酚、11-羟基-四氢大麻酚、11-羟基- Δ 9-四氢大麻酚、左南曲朵(levonantradol)、 Δ 11-四氢大麻酚、四氢次大麻酚、屈大麻酚、阿曼达酰胺(amandamide)以及大麻隆(nabilone),以及具有基础大麻素结构并且经合成改性以获得大麻素类似物的天然或合成分子。

[0064] 本发明技术还涉及大规模克隆和表现在大麻素生物合成中起作用的酶类以及真核表达系统用于制造大麻素和大麻素类似物的用途。适于克隆和表达大麻素合成酶酶类的示范性真核细胞包括但不限于大肠杆菌、酵母和杆状病毒宿主。在这一技术的一实施例中披露一种用于使用粉红毕赤酵母表达系统(pink *Pichia* yeast expression system)大规模制造若干大麻素合成酶酶类的方法,所述酶包括四氢大麻酚酸合成酶(THCA合成酶)、大麻环萜酚酸合成酶(CBCA合成酶)以及大麻二醇酸合成酶(CBDA合成酶)。因此,这些酶类的大规模制造可以通过用包含针对THCA合成酶、CBCA合成酶或CBDA合成酶的基因的DNA构筑体转型酵母,并且在适于促进功能上活性酶的表达的条件下培养经转型酵母细胞来进行。

[0065] 针对THCA合成酶和CBDA合成酶的基因的序列获自公众可用数据库并且改变其蛋白质编码区以优化甲醇酵母细胞(*Pichia Pastoris* yeast cell)中的蛋白质表达。使用来自英杰(Invitrogen)的GeneArt®程序进行密码子优化。

[0066] 另外,两种基因都经改性以包括酵母 α 分泌性序列以及密码子以将His标签纳入所表达的蛋白质中。前者在基因的5'端插入并且为所表达蛋白质的胞外分泌所必需。针对His标签的密码子存在于基因的3'端并且并入以促进通过亲和性色谱法纯化表现的蛋白质。

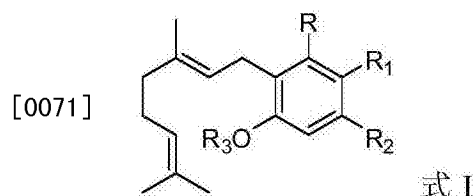
[0067] 这些嵌合序列、 α -CBDA合成酶和 α -THCA合成酶插入到pPink-HC载体(Invitrogen®)中,并且用于获得Top 10F转型的大肠杆菌细胞,所述细胞以琼脂针刺培养物形式储存用于将来使用。在酵母细胞转型之前,含有大麻素合成酶相关基因(GOI)的载体从含有经转型大肠杆菌细胞的琼脂针刺培养物分离并且使用PmeI或SpeI限制酶类线性化。使用*Pichia*Pink™酵母表达系统(Invitrogen®)将经线性化质粒电穿孔到甲醇酵母pepB缺失型突变细胞中。使用限制酶PmeI的线性化引导向毕赤酵母基因组的AOX1启动子区中的插入,而限制酶SpeI引导向TRP基因中的插入。

[0068] 经转型酵母细胞在腺嘌呤缺失型选择性培养盘上生长并且使用基于颜色的筛选来鉴别阳性转型体。依据这一筛选方法,将不携带相关基因的红/粉红菌落信号转型体以及携带有限数目的相关基因拷贝的转型体整合到甲醇酵母的基因组中。另一方面,白色菌落指示具有多个相关基因拷贝的转型体。通常,需要具有6-10个相关基因拷贝的细胞来获得大量重组蛋白,例如每升培养物约1.0g到约2.0g蛋白质。定量在通过向经转型酵母细胞中添加甲醇诱导THCA合成酶或CBDA合成酶时底物大麻萜酚酸(CBGA)到THCA或CBDA产物的转化的酶分析法用于鉴别酵母细胞白色菌落,其产生大于20%底物到产物转化。

[0069] 因此,携带THCA合成酶基因或CBDA合成酶基因的酵母细胞的个别白色菌落分别使用BMY培养基在烧瓶中培养,随后通过在BMY培养基中生长来诱导,以如下文进一步描述

诱导THCA合成酶或CBDA合成酶的表达。简单来说,各培养物中含有酶的培养基与细胞分离并且向来自各培养烧瓶的培养基中添加已知量的底物CBGA。在培育之后,分析各培养烧瓶以定量CBGA到产物的转化百分比。显示大于20%转化的转型体的培养物将用于依据本发明的方法商业合成大麻素或大麻素类似物。

[0070] 使用上文所述的PichiaPink™酵母表达系统获得的大麻素合成酶酶类THCA合成酶和CBDA合成酶可用于制造大麻素或大麻素类似物。在一个实施例中,提供一种用于通过选择式I化合物和大麻素合成酶制造大麻素或大麻素类似物的方法,所述大麻素合成酶作为将式I化合物转型成大麻素或大麻素类似物的催化剂。



[0072] 在式I中,R可选自羟基(-OH)、卤素、硫醇(-SH)或-NR_aR_b基团。取代基R₁和R₂各自独立地选自自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基。或者,R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环。对于根据式I的化合物,R₃选自自由以下组成的群组:H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基,并且R_a和R_b各自独立地是-H、-OH、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基、-SH、-NH₂或C₃-C₁₀环烷基。

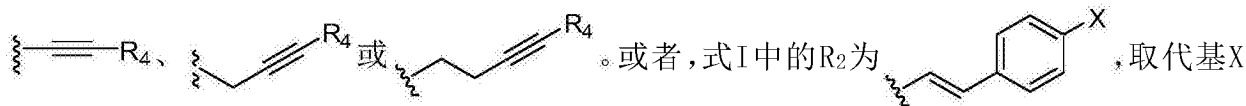
[0073] 通过式I化合物与大麻素合成酶接触获得的大麻素或大麻素类似物可经分离、纯化并且用作疗法,或和大麻素或大麻素类似物可经历任选的脱羧步骤以在将大麻环萜酚用作药剂或保健食品试剂之前将例如大麻环萜酚酸(CBCA)转化成大麻环萜酚(CBC)。

[0074] 对于某些实施例,大麻素合成酶为大麻二醇酸合成酶。对于这一技术的其它方面,大麻素合成酶为四氢大麻酚酸合成酶或大麻环萜酚酸合成酶。对于某些式I化合物,R₁和R₂连同其键结的环碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环。对于此类式I化合物,所述环的一或多个碳原子经选自氧、硫或氮的杂原子取代。

[0075] 对于根据式I的化合物,R₂可为直链亚烷基或分支链亚烷基。示范性直链亚烷基包括但不限于CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉、C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₇H₁₅以及C₈H₁₇。说明性分支链亚烷基为选自以下的基团:异丙基、仲丁基、异丁基、新戊基、2-甲基己基或2,3-二甲基己基。在一些实施例中,R₂可为任选经取代的直链或分支链亚烷基,其中一或多个氢原子置换为(但不限于)选自以下的基团:氯、氟、溴、硝基、胺基、羟基、苯基或苯甲基。

[0076] 对于某些式I化合物,R₂为C₂-C₁₀亚烯基并且选自自由以下组成的群组:





为选自-OH、-SH或NR_aR_b的基团并且基团R_a和R_b如上文所定义。

[0077] 许多天然存在的大麻素以其羧酸衍生物的形式在植物中产生。然而，在向含有大麻素酸的植物组织施加热量以及通过在使用之前干燥植物材料时发生脱羧之后，其精神刺激活性提高。使用本发明方法合成的大麻素和大麻素类似物也可以具有羧酸(-COOH)基团，因为R₁取代基和此类化合物可在其用作医药或营养药剂之前进行任选的脱羧步骤。示范性此类大麻素或大麻素类似物为通过使R为-OH，R₁为-COOH，R₂为C₅H₁₁并且R₃为-H的式I物质与大麻素合成酶接触获得的化合物。

[0078] 大麻素或大麻素类似物的合成、分离和纯化可以通过将大麻素合成酶固定于固体支撑物或通过将合成酶封装于脂质体内来改善。在合成的一个方面中，酶固定到固体支撑物。此类固定为有利的，因为其允许再循环和再使用固定的酶，这显著降低与医药级大麻素或大麻素类似物制造有关的成本。固定酶还允许容易使用和回收酶催化剂，容易纯化所要产物，保留对映异构体过量(ee)的最终产物以及整体改良产物产量。通常，根据所要求方法的大麻素或大麻素类似物的对映异构纯度为约90% ee到约100% ee，例如使用本发明方法制造的大麻素或大麻素类似物可具有约91% ee、约92% ee、约93% ee、约94% ee、约95% ee、约96% ee、约97% ee、约98% ee以及约99% ee的对映异构纯度。

[0079] 通常，待固定的酶可吸附到固体支撑物上，吸附到支撑物上，共价连接到支撑物上或可通过离子相互作用固定到固体支撑物上。在一个实施例中，大麻素合成酶共价连接到固体支撑物。将酶连接到固体支撑物的适合策略为生物化学技术中所熟知并且包括适当官能化的支撑物与胺基酸基团的侧链之间的共价键或通过使用适当官能化连接基团或间隔基分隔支撑物与酶来共价连接。术语“连接基团”指的是分隔支撑物与酶的任何基团。因此，连接基团为一端共价系栓到支撑物表面上的基团并且另一端连接到酶的基团。说明性连接基团包括乙二醇的(C₁-C₁₀)亚烷基连接基团聚合物，例如-(OCH₂-CH₂)_n-O-基团，其中n为0到10的整数、-(C₁-C₁₀)亚烷基-NH-、-(C₁-C₁₀)亚烷基硅烷氧基或-(C₁-C₁₀)亚烷基-C(O)-。

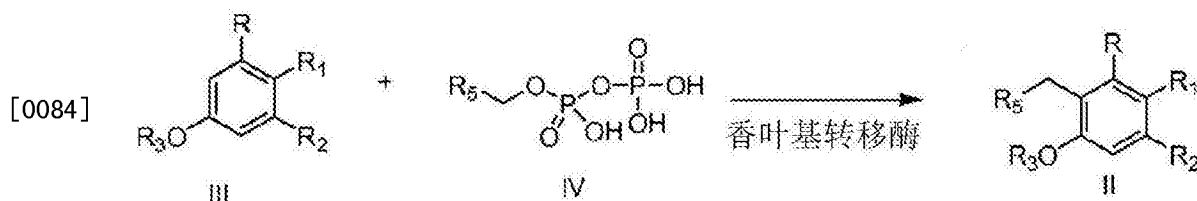
[0080] 适于固定酶类的支撑物包括但不限于安伯来特(Amberlite)树脂、杜利特(Duolite)树脂、例如Eupergit® C的丙烯酸树脂、DEAE-Sephadex以及使用聚乙烯醇制成的凝胶，其可用作固定本发明技术的大麻素合成酶酶类的支撑物。

[0081] 大麻素发挥不同生理学特性并且已知会减轻疼痛、刺激食欲并且已作为用于治疗多种疾病病状的候选治疗剂测试，所述疾病例如过敏、发炎、感染、癫痫症、抑郁症、偏头痛、躁郁症、焦虑症以及青光眼。大麻素发挥的生理学作用大部分取决于其刺激或钝化大麻素受体(例如CB₁、CB₂以及CB₃受体)的能力。因为受体活性的调节取决于大麻素受体活性位点内配位体的结合相互作用和定向，所以连接到大麻素或大麻素类似物的取代基的性质和定向将影响此类化合物展现的医药特性。

[0082] 在一个实施例中，提供一种用于制造大麻素的方法，所述大麻素具有连接到中央核心的结构上不同且多样的取代基。此类化合物预期展现不同医药学上有益的特性。将通过使适当取代的式III化合物与式IV化合物在酶(例如GPP奥利弗酸酯(olivetolate)香叶基转移酶，一种聚酮合成酶)存在下接触引入结构多样性来获得式II化合物。流程1结构上

说明依据这一实施例合成式II化合物的方案。

[0083] 流程1



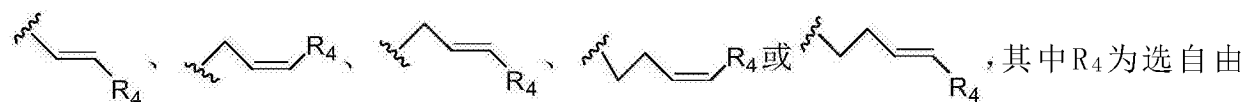
[0085] 视式III和IV中R、R₁、R₂、R₃以及R₅处取代基的性质和类型而定,本发明方法允许合成在中心苯基核心周围具有不同取代基的式II化合物作为合成子的前驱体,用于制造大麻素或大麻素类似物。因此,根据这一方法,大麻素或大麻素类似物可以通过使式II化合物与大麻素合成酶(例如THCA合成酶、CBCA合成酶或CBDA合成酶)接触,随后使获得的产物分离和脱羧获得大麻素或大麻素类似物来获得。

[0086] 在式III中,R可选自羟基(-OH)、卤素、硫醇(-SH)或-NR_aR_b基团。取代基R₁和R₂各自独立地选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的直链或分支链(C₁-C₁₀)亚烷基、任选经取代的直链或分支链(C₂-C₁₀)亚烯基、任选经取代的直链或分支链(C₂-C₁₀)亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基。

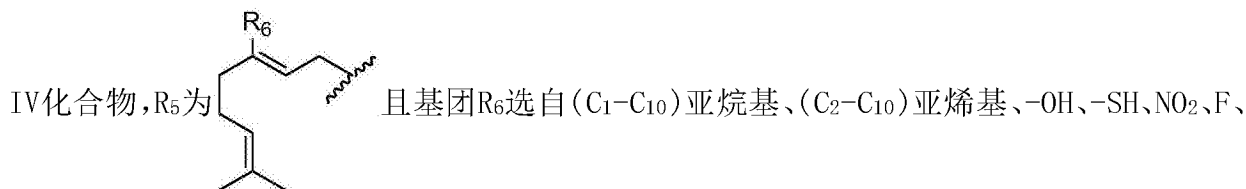
[0087] 在某些实施例中,R₁和R₂连同其键结的碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环且R₃选自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a以及C₁-C₁₀直链或分支链烷基。

[0088] 式IV中的R₅可为直链或分支链(C₁-C₁₀)亚烷基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚烯基、直链或分支链(C₂-C₁₀)亚炔基、-C(O)-(C₁-C₁₀)亚烷基、-C(O)-(C₂-C₁₀)亚烯基以及-C(O)-(C₂-C₁₀)亚炔基。对于式II、III和IV化合物,任何亚烷基、亚烯基、亚炔基、芳基、芳基亚烷基或环烷基可经一或多个选自由以下组成的群组的基团进一步取代:-OH、卤素、-NR_bR_c、-C(O)R_a、-C(O)NR_bR_c、(C₁-C₁₀)烷基、-CN、(C₁-C₄)烷氧基、(C₁-C₄)卤烷基以及(C₁-C₄)羟基烷基,其中R_a、R_b以及R_c各自独立地选自-H、-OH或(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基、-SH、-NH₂或C₃-C₁₀环烷基。

[0089] 根据一个实施例,式IV中的R₅可为选自以下的(C₂-C₁₀)亚烯基:



以下组成的群组的直链亚烷基:CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉、C₅H₁₁、C₆H₁₃、C₇H₁₅以及C₈H₁₇。对于某些式



Cl、Br、-NH₂或-NHR_a,其中R_a如上文所定义。

[0090] 酶关于其催化的化学反应的类型以及这些反应中涉及的底物的形式和类型具有非常高的特异性。酶还展现高水平的立体特异性、区位特异性以及化学选择性。因此出人意料的,本发明者观测到视所催化的环化反应的条件而定,酶THCA合成酶使用相同底物大麻萜酚酸(CBGA)可能产生两种不同产物四氢大麻酚酸(THCA)和大麻环萜酚酸(CBCA)。

[0091] 因此,研究温度、pH、溶剂、离子强度和培育时间对THCA比CBCA产物的分布比率的作用。在一个实施例中,评估溶剂对产物分布比率的作用。大麻素的性质上为亲脂性的并且在水性溶剂中溶解不充分。大麻素在水性溶剂中的溶解度差阻止开发用于合成大麻素和大麻素类似物的离体酶催化方法。本发明者出人意料地发现如果混合物中的非水性溶剂的浓度保持低于40体积%,那么THCA合成酶在含有缓冲液和非水性溶剂(例如二甲亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)、异丙醇和环糊精)的溶剂混合物中保留其催化活性。

[0092] 举例来说,当非水性溶剂的浓度为约20%时,酶催化剂最有效。随着非水性溶剂的浓度增加,催化速率略微降低。因此,20%DMSO产生最高催化速率,比单独缓冲液中的催化剂快约2.5倍。表1说明非水性溶剂浓度对催化活性速率的作用。

[0093] 如这一表格中进一步说明,非水性溶剂的浓度可改变作为产物产生的THCA比CBCA的比率。因此,当缓冲液中的DMSO浓度小于所述的20%时获得较高含量的THCA,其中当使用10%DMSO作为溶剂时观测到THCA:CBCA分布比为10:1。

[0094] 表1

[0095]

DMSO	快	THCA:CBCA
0%	1X	
10%	1.2X	10:1
20%	2.5X	5:1
25%	—	1:1
30%	0.3X	

[0096] 观测到向100mM磷酸钠缓冲液中添加例如十二烷基硫酸钠(SDS)的清洁剂不会影响底物CBGA到产物的转化百分比。相比之下,向含有环糊精的100mM柠檬酸盐缓冲液中添加SDS破坏THCA合成酶催化反应的能力。在这些反应条件下,仅8%底物转化成产物,在这些反应条件下适宜形成THCA作为产物。

[0097] 大麻萜酚酸(CBGA)在天然存在的大麻素的生物合成期间用作不同大麻素合成酶酶类的常见底物。举例来说,前述研究已表明分别在四氢大麻酚酸、大麻二醇酸和大麻环萜酚酸的生物合成期间,酶类THCA合成酶、CBDA合成酶和CBCA合成酶各自使用CBGA作为其底物。

[0098] 因此,在旨在评估THCA合成酶活性的最佳pH的研究期间,本发明者惊奇地注意到视进行催化的pH而定,酶THCA合成酶催化底物CBGA转化成THCA或CBCA。这一观测是出人意料的,因为在植物中单一酶THCA合成酶可负责形成两种不同大麻素产物。

[0099] 表3说明旨在鉴别pH对产物比率(即当THCA合成酶与作为底物的CBGA接触时产生的THCA比CBCA化合物的比率)的作用的pH研究的结果。在这一研究中,反应混合物的pH在4.0到8.0的pH范围内。因为THCA合成酶在pH大于8.0时无催化活性,所以未测试较高pH值。

[0100] 如表3中所示,THCA优选地在低于6.0的pH值下合成。实际上,THCA为在pH 4.0下进行催化的主要产物。反应混合物的pH升高改变产物分布比率,其中pH 5.0下约30%CBCA作为产物产生并且PH值6.0下约15%CBCA作为产物产生。反应混合物的pH的另一增加(例如反应混合物的pH增加到pH 7.0)唯一地产生CBCA作为THCA合成酶催化的CBGA转化的产物。此外,pH中的任何进一步增加会降低或消除THCA合成酶的催化活性,在pH 8.0下观测不到

反应混合物的产物。

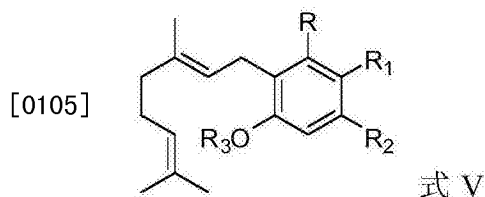
[0101] 表3

[0102]

pH	THCA	CBCA
4	100	痕量
5	70	30
6	85	15
7	0	100
8	0	0

[0103] 因此,在一个实施例中,本发明提供一种用于制造四氢大麻酚、大麻色素或四氢大麻酚和大麻色素两者或其类似物的方法,所述方法通过选择式V化合物作为反应物,使式V化合物与四氢大麻酚酸合成酶(THCA合成酶)接触并且改性反应混合物的至少一种特性获得四氢大麻酚、大麻色素或四氢大麻酚和大麻色素两者或其类似物作为产物。

[0104] 在式V中,R选自-OH、卤素、-SH或-NR_aR_b基团。取代基R₁和R₂各自独立地选自自由以下组成的群组:-H、-C(O)R_a、-OR_a、任选经取代的C₁-C₁₀直链或分支链亚烷基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚烯基、任选经取代的C₂-C₁₀直链或分支链亚炔基、任选经取代的C₃-C₁₀芳基、任选经取代的C₃-C₁₀环烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚烷基、(C₃-C₁₀)芳基-(C₂-C₁₀)亚烯基以及(C₃-C₁₀)芳基-(C₁-C₁₀)亚炔基。



[0106] 对于某些实施例,R₁和R₂连同其键结的环碳原子一起形成C₅-C₁₀环状环,其中一或多个碳原子可任选地置换为一或多个选自氧、硫、氮或-NR^a基团的杂原子。式V中的R₃可为选自H、-C(O)R_a或(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基的基团并且取代基R_a和R_b各自独立地选自-H、-OH、-SH、NH₂、(C₁-C₁₀)直链或分支链烷基或C₃-C₁₀环烷基部分。

[0107] 可以对已知对酶活性和催化剂具有作用的任何物理特性进行调节以改变产物THCA比CBCA的比率。在一个实施例中,因此,可改变反应混合物的pH以调节酶促产生的作为产物的THCA比CBCA的比率。依据这一合成方法,约4.0到约6.0范围内的较低pH下的催化剂有利于形成THCA作为产物,而约6.5到约7.5范围内的中性pH(neutral pH)下的催化剂有利于形成CBCA作为产物。

[0108] 因此,本发明者已显示有可能通过控制反应混合物的pH来控制形成THCA或CBCA作为催化剂的产物。

[0109] 例如反应溶剂的组成性构成、离子强度、温度、压力、反应介质的粘度以及试剂浓度等其它物理特性也可以改变产物比率。许多这些物理参数实际上在使用生物反应器大规模制造大麻素或大麻素类似物期间在调节催化剂时起重要作用。

[0110] 因此,在一个实施例中提供一种用于通过相对于第二大麻素或其类似物的量控制影响形成的第一大麻素或其类似物的量的条件来制造大麻素或大麻素类似物的系统100。图1中示意性显示的系统100可包含发酵器2、过滤器18、生物反应器10以及控制机构20。下

文提供如图1中所呈现的系统的描述。

[0111] 发酵器2固持细胞培养基4和多个细胞6。细胞6被配置成产生和分泌大麻素合成酶8。发酵器2中用于制造大麻素合成酶8的细胞6可为已经遗传修饰以包括编码大麻素合成酶蛋白质的核酸序列或基因的任何真核细胞。在某些实施例中,编码大麻素合成酶蛋白质的核酸序列经修饰以在其5'末端包括酵母 α 分泌序列并且在其3'末端并入6-残基组胺酸标签。添加酵母 α 分泌序列允许向用于真核细胞生长的培养基中分泌大麻素合成酶蛋白质。大麻素合成酶8的胞外分泌为有利的,因为其促进在发酵器2与生物反应器10之间使用过滤器18分离和传输酶。在发酵器2中产生大麻素合成酶8之后,清液层(例如培养基4、细胞6以及大麻素合成酶8沿路径24传输到过滤器18。路径24可为管或适于传输清液层的任何其它路径。

[0112] 过滤器18可过滤清液层以至部分分离细胞6与含有所表达的酶的培养基4。通常,过滤器18分离至少80%总细胞6与培养基4。对于某些实施例,在将这一培养基4引入到生物反应器10之前,过滤器18分离至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%总细胞6与培养基4。过滤之后,细胞6沿路径26传输回到发酵器2。在一个实施例中,过滤器18可为包括多个过滤器和贮存器以纯化大麻素合成酶8的过滤和纯化系统。

[0113] 通过过滤器18之后,大麻素合成酶8沿路径28流入生物反应器10中并且经入口30进入生物反应器10。生物反应器10还包括用于反应物(例如底物CBGA或上文所述的根据式I化合物的其它底物)的入口32。因此,如图1所示,生物反应器10含有反应物12,其被配置成与大麻素合成酶8相互作用形成第一大麻素14。生物反应器10也可以提供用于合成第二大麻素16的环境。第二大麻素16可以使用相同类型的大麻素合成酶8和作为第一大麻素14的底物产生。举例来说,第一大麻素14和第二大麻素16都可以使用作为反应物12的CBGA以及作为大麻素合成酶8的THCA合成酶。在这一实施例中,第一大麻素14可为THCA并且第二大麻素16可为CBCA。在替代实施例中,第二大麻素16可使用与用于合成第一大麻素14的底物或大麻素合成酶不同的底物或大麻素合成酶合成。

[0114] 生物反应器10可为具有用二价金属离子浸渍的固体支撑物或表面用二价金属离子官能化的支撑物的柱式生物反应器。通常,琼脂糖凝胶、琼脂糖或其它生物聚合物用作用于结合二价金属离子(例如镍、钴、镁和锰)的支撑物。此类支撑物具有所表达大麻素合成酶8上存在的针对组氨酸标签的强亲和力并且可用于螯合合成酶以及将其与可能干扰或阻碍大麻素合成的其它非必需蛋白质和碎片分离。

[0115] 用于合成大麻素的生物反应器10针对分批和连续合成工艺进行配置以允许商业制造医药学上适用的大麻素。在一个实施例中,生物反应器10针对分批合成配置,在所述分批合成中在工艺开始时固定培养基4的组成、酶和底物的浓度固定并且在催化期间不允许改变。当生物反应器10的培养基中的所要产物的浓度达到预定值或底物浓度低于预定程度(例如不存在底物到产物的可检测催化转化的程度)时合成终止。

[0116] 在一个实施例中,因此,His标记的大麻素合成酶8在向生物反应器10中引入已知量的底物(例如大麻萜酚酸(CBGA))或式I、II或V化合物之前螯合到生物反应器柱内的含有镍的树脂支撑物上。在替代实施例中,在向生物反应器10中引入含有大麻素合成酶8的培养基4之前,具有镍树脂支撑物的生物反应器10内可存在大麻萜酚酸(CBGA)或式I、II或V化合

物。在任一情形下,已知量的酶与已知量的式I、II或V化合物或作为底物的CBGA接触以合成为产物的大麻素或大麻素类似物,例如第一大麻素14或第二大麻素16。

[0117] 可以定期或持续监测生物反应器10内的反应进展。举例来说,可利用光学监测系统来检测生物反应器10内培养基4中随时间变化的产物浓度。或者,可以监测底物浓度中的降低直到合成信号终止。因此产生的大麻素产物容易使用标准溶剂萃取或色谱纯化方法从培养基回收。监测系统可为下文进一步描述的控制机构20的部分或可与其相互作用。

[0118] 分批加工模式的替代为连续加工模式,其中向生物反应器10中连续添加限定量的底物和培养基4,同时从生物反应器10去除相等量的含有大麻素产物的培养基4以维持恒定产物形成速率。培养基4可通过入口32进入生物反应器10并且通过出口34离开生物反应器10。所属领域中已知使形成产物的速率最大化时牵涉到的调节底物浓度、酶和其它因素的方法。

[0119] 可使用控制机构20控制生物反应器10的条件。控制机构20可耦接到生物反应器10或可与生物反应器10无线或远程相互作用。控制机构20可控制生物反应器10的至少一种条件从而相对于第二大麻素16形成的量影响第一大麻素14形成的量。举例来说,在一个实施例中,大麻素合成酶8为THCA合成酶并且通过基因工程改造的甲醇酵母细胞产生。如上文所述,这一酶与大麻萜酚酸接触允许产生THCA或CBCA两者。一种相对于CBCA影响THCA产生的量(例如THCA比CBCA的比率)的条件为生物反应器10中的培养基4的pH。生物反应器10内的其它条件也可以影响生物反应器10中产生的第一大麻素14(例如THCA)和第二大麻素16(例如CBCA)的相对量,例如温度、压力和流动速率。在一个实施例中,条件(例如pH、温度、压力和/或流动速率)的改变可引起相对于第二大麻素16以较大量形成第一大麻素14转变成相对于第一大麻素14以较大量形成第二大麻素16。

[0120] 在另一实施例中,控制机构20也可用于控制发酵器2的条件,例如氧含量、搅拌、pH和馈入速率。控制机构20也可以控制进入或离开发酵器2、过滤器18和生物反应器10的材料流量(例如通过控制泵)。

[0121] 控制机构20可包括具有处理器和存储装置的处理线路。处理器可作为通用处理器、专用集成电路(ASIC)、一或多种现场可编程门阵列(FPGA)、处理组件的群或其它适合电子处理组件执行。存储装置(例如存储器、存储器单元、存储设备等)为一或多种用于储存数据和/或计算机代码以完成或促进本申请案中所述的多种工艺和功能的装置(例如RAM、ROM、快闪存储器、硬盘储存等),所述工艺和功能例如控制生物反应器10的pH、温度和压力,或改变进入或离开生物反应器10的培养基4的流动速率。存储装置可为或包括易失性存储器或非易失性存储器。存储装置可包括数据库组件、目标代码组件、脚本组件或用于支持本申请案中所述的多种活动和信息结构的任何其它类型的信息结构。根据一个实施例,存储装置通过处理线路可联通连接到处理器并且包括用于执行(例如通过处理线路和/或处理器)一或多种本文所述的方法的计算机代码。

[0122] 本发明涵盖用于实现多种操作(例如控制生物反应器10的条件)的方法、系统和任何机器可读媒体上的程序产品。本发明的实施例可使用为这一或另一目的并入的现有计算机处理器或针对适当系统的专用计算机处理器,或通过硬接线系统执行。本发明范围内的实施例包括包含用于上面运载或储存有机器可执行指令或数据结构的机器可读媒体的程序产品。此类机器可读媒体可为可以通过通用或专用计算机或其它具有处理器的机器存取

的任何可用媒体。举例来说,此类机器可读媒体可包括RAM、ROM、EPROM、EEPROM、CD-ROM或其它光盘存储装置、磁盘存储装置、其它磁性存储装置、固态储存装置或任何其它可用于运载或存储机器可执行指令或数据结构形式的所要程序代码并且可以由通用或专用计算机或具有处理器的其它机器存取的任何其它媒体。当信息经网络或另一通信连接(硬接线、无线或硬接线或无线的组合)转移或提供到机器时,所述机器适当地把连接看作是机器可读媒体。因此,任何此类连接可适当地称为计算机可读媒体。以上各项的组合也包括在机器可读媒体的范围内。机器可执行指令包括例如使通用计算机、专用计算机或专用处理机器执行某一功能或功能组的指令和数据。

[0123] 控制机构20可另外包含辅助装置(例如键盘22和显示器36)以允许用户与控制机构20相互作用以控制生物反应器10的条件。举例来说,显示器可包括允许用户监测生物反应器10的pH、温度、压力和流动速率改变或监测系统的任何其它条件以制造大麻素或大麻素类似物的显示屏。

[0124] 如多种示范性实施例中所示的用于制造大麻素或大麻素类似物的系统的构造和排列仅为说明性的。尽管本发明已详细描述仅几个实施例,但许多修改是可能的(例如多种元件的尺寸、维度、结构、形状和比例、参数值、材料使用、色彩、定向等的变化)。举例来说,元件的位置可逆转或变化并且离散元件或位置的性质或数目可改变或变化。因此,所有此类修改打算包括在披露内容的范围内。此外,任何工艺或方法步骤的顺序或次序可根据替代实施例改变或重新排序。可在不脱离本发明的范围的情况下在示范性实施例的设计、操作条件和布置上进行其它替代、修改、改变和省略。

[0125] 本发明技术通过以下实例进一步描述,所述实例不打算限制权利要求书的范围。

[0126] 实例

[0127] A. 来自高产量酵母转型体的蛋白质的分子克隆、筛选和表达

[0128] 1. 限制消化。

[0129] 通过在37°C下用Pme I或Spe I限制酶消化质粒维持适当时间使THCA α 质粒DNA或CBDA α 质粒DNA线性化。DNA接着使用3M乙酸钠的1:10稀释溶液和2.5体积90%乙醇进行乙醇沉淀。沉淀后,通过在12,000rpm下离心10分钟使DNA粒化。用80 μ L 80%乙醇洗涤团粒并且使用加热离心离心直到干燥。重复这一清洗和离心步骤并且将因此获得的DNA再悬浮于10 μ L无菌水中并且在使用之前在-20°C下冷冻。

[0130] 2. 制备电感受态酵母细胞。

[0131] 通过用基因工程改造Ade2、pep4基因敲除pPink酵母应力2的甘油原料接种10mL YPD培养基制备电感受态PichiaPink(pPink)细胞。这些细胞在27°C下在125mL具有档板的烧瓶中生长隔夜,使用在270rpm下选装的震荡器直到培养物的OD₆₀₀达到指示对数期生长的1.3单位的值。这一培养物接着添加到100mL YPD培养基中并且在相同条件下培育隔夜。每小时检验OD₆₀₀并且在12小时培育期之后达到1.3单位的值。

[0132] 此时,培养物转移到500mL离心管中并且在4°C和5200rpm下旋转5分钟。倾析清液层并且添加250mL无菌冰冷水再悬浮细胞。这一洗涤和离心方案重复两次以确保完全去除YPD培养基。使用50mL无菌冰冷水进行最终洗涤来悬浮细胞,随后在5200rpm下重新粒化细胞并且通过倾析去除清液层。

[0133] 向细胞团粒添加10mL无菌冰冷的1M山梨糖醇。接着将山梨糖醇-细胞混合物转移

到无菌15mL圆锥管中并且在5200rpm下离心。使用300μL无菌冰冷1M山梨糖醇第二次洗涤细胞团粒,随后使用这些细胞进行电穿孔。

[0134] 3.电穿孔.

[0135] 在冰上解冻预先冷冻的线性化THCA α 质粒DNA或CBDA α 质粒DNA并且向试管添加80μL电感受态pPink细胞。接着将这一混合物转移到0.2cm电穿孔比色皿并且在冰上培育5分钟。比色皿在1640V, 200 Ω 和25μF下脉冲,持续约4ms的总脉冲时间。在脉冲之后立即向比色皿中添加1mL YPDS培养基并且通过吸液彻底混合全部混合物。接着在无震荡下将比色皿放入27°C恒温箱中2小时,随后在新鲜PAD培养盘上加条纹300μL。这些培养盘在27°C下培育约7-10天以促进细胞生长。

[0136] 4.筛选和蛋白质表达

[0137] 使用基于颜色的筛选鉴别阳性酵母细胞转型体。白色菌落指示阳性表达相关基因,然而红色菌落指示不表达。因此,白色菌落选自PAD培养盘并且在新鲜PAD培养盘上重新加条纹,培育所述培养盘3-5天以促进个别菌落生长。接着使用单个菌落接种10mL置于125mL具有档板的烧瓶中的BMGY培养基,所述烧瓶在27°C下在震荡(270rpm)下培育隔夜。定期测量600nm(OD₆₀₀)下所述培养物的1:10倍稀释样品的光密度(OD)。

[0138] 当接种物培养物达到1.2-1.5单位的OD₆₀₀时停止培育。接着将接种物转移到50mL圆锥管中并且在5200rpm下离心5分钟以使细胞粒化。倾析清液层后,向团粒添加1mL新鲜BMMY培养基,随后用允许无菌空气交换的空气有孔胶带覆盖试管,并且置于27°C的震荡恒温箱中。

[0139] 24小时后,去除100μL细胞样品,向其中添加100μL 40%甲醇以诱导酶产生。这一甲醇样品接着在12,000rpm下离心5分钟并且清液层和团粒以T1样品形式保存。48小时培育期之后获得第二培养物样品并且如上文所述用甲醇处理。离心后,清液层和团粒以T2样品形式保存。72小时时,全部培育混合物用适当体积的40%甲醇处理。在72小时培育期之后,从培养物的甲醇处理获得的清液层和团粒标记为T3。T3清液层旋转通过Amicon 30kD蛋白质过滤器并且使用SDS-PAGE凝胶分析蛋白质。

[0140] 通过按比例放大使用发酵器的培养物的体积获得商业用量的THCA合成酶或CBDA合成酶。因此,酵母接种物首先通过使125mL具有档板的烧瓶中的10mL BMGY培养基与酵母的单个白色菌落接触来制备。这一起始培养物在27°C下在270rpm震荡下培育隔夜,获得OD₆₀₀为1.2到1.5单位的培养物。使用这一起始培养物接种1L具有档板的烧瓶中的90mL BMGY培养基。当这一培养物的OD₆₀₀达到1.2-1.5单位时,将接种物转移到500mL离心瓶中并且酵母细胞在5200rpm下粒化5分钟。

[0141] 5.酶促转化.

[0142] 通过在30°C下用200μL 100mM柠檬酸盐缓冲液(pH 4.8,具有10%DMSO)中的25μL 11mg/ml原料培育来自T3样品的25μL无细胞清液层2小时来测量THCA合成酶的催化活性。CBGA于反应混合物中的最终浓度为0.1mg/ml并且最终pH为5.0。表4说明关于从经转型pPink酵母细胞的独立菌落获得的THCA合成酶的催化活性的数据,所述酵母细胞即使用线性化THCA合成酶质粒转型的pPink酵母细胞。选择将超过20%底物转化成产物THCA的培养物样品用于按比例扩大。

[0143] 表4

[0144]

样品ID	含有0.1mg/ml CBGA的反应物中CBGA到THCA的转化%.
Spe THC#3	20.6
Spe THC#4	28.7
Spe THC#22	20.6
Spe THC#23	18.7
Pme THC#5	32.5
Pme THC(2)#1	29.1
Pme THC(2)#2A	27.2
Pme THC(2)#25	31.6
Pme THC(2)#36	27.7
Pme THC(2)#41	32.5
Pme THC(2)#42	27.6
Pme THC(2)#46	40.7
Pme THC(2)#51	26.8
Pme THC(3)#1	55.2
Pme THC(3)#11	35.0
Pme THC(3)#17	69.9
Pme THC(3)#19	36.8
Pme THC(3)#20	34.3

[0145] 6.用于体外产生多拷贝GOI插入物的克隆策略。

[0146] 如上文所述,具有6-10个相关基因拷贝的经转型细胞可用于潜在地增加异源蛋白质的产量。使用替代酵母表达系统获得具有多个相关基因拷贝的经转型细胞。使用来自英杰的多拷贝毕赤酵母表达试剂盒建构允许酵母细胞用多个质粒拷贝转型的新质粒。

[0147] 简单来说,使用pA0815载体克隆相关基因。因此,使用EcoR I和Bam HI限制酶从pPink-HC质粒切割 α -CBDA合成酶和 α -THCA合成酶的基因。在37°C下用1 μ l EcoR I缓冲液、1 μ l各限制酶(10单位/ μ l)和1 μ l BSA(总反应体积20 μ l)培育100ng含有 α -CBDA合成酶基因或 α -THCA合成酶基因的pPink-HC载体2小时。分别使用上文所述的方案用Eco R I和Bam HI酶消化100ng pA0815载体。

[0148] 接着将消化混合物装载到0.8%琼脂糖凝胶上并且通过在95V下电泳1小时来彼此分离DNA片段。使用英杰凝胶萃取试剂盒从凝胶萃取对应于THCA合成酶或CBDA合成酶基因的条带。这些基因片段使用T4DNA接合酶并且遵照来自NEB®的接合方案接合到线性化pA0815载体上。

[0149] 接合之后,通过在1500V,200 Ω 和25 μ F下电穿孔4ms将含有相关基因的圆形载体转型到大肠杆菌Top 10F⁻细胞中。接着将经转型细胞与250 μ l SOC培养基(具有来自英杰的OneShot®Top 10ElectrocompTM大肠杆菌)混合并且在37°C下接种到LB-Amp100培养盘上隔夜。

[0150] 培育后,使用菌落PCR方案鉴别阳性菌落,所述方案依赖于5'AOX1和3'AOX1引物来进行PCR。在37°C下,在液体LB-Amp100培养基中生长含有相关基因的阳性菌落隔夜。第二

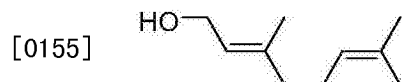
天,使用英杰快速制备型试剂盒少量制备质粒并且在进一步扩增之前在0.8%琼脂糖凝胶上分析质粒浓度。

[0151] α -THCA合成酶和 α -CBDA合成酶基因插入到pA0815中之后,重组质粒分成2批。第一批用作插入第二相关基因拷贝的载体。第二批pA0815重组质粒用于萃取 α -THCA合成酶或 α -CBDA合成酶基因。因此,用作载体的pA0815重组质粒首先用Bam HI限制酶,随后NEB单消化方案消化。同时,第二批pA0815重组质粒用Bgl II和Bam HI限制酶消化。

[0152] 第一和第二消化混合物使用0.8%琼脂糖凝胶纯化,随后从凝胶萃取经纯化线性化载体和 α -THCA合成酶或 α -CBDA合成酶基因序列。各基因序列接着遵照NEB T4DNA接合酶方案与线性化载体接合并使用含有所述基因的载体通过电穿孔转型大肠杆菌Top10F⁻细胞。在37℃培育经转型细胞隔夜,并且接着针对校正基因插入物筛选。重复上述方案若干次获得多拷贝插入质粒。确认基因插入物的序列一致性之后,多拷贝质粒通过限制酶消化在His4序列区线性化并且用于转型感受态甲醇酵母菌株G115(his4,Mut⁺)细胞。在His⁻培养盘上生长经转型细胞用于筛选。对His⁻培养盘进行筛选以确认甲醇酵母基因组的His位点处质粒的整合。选择阳性菌落用于蛋白质的甲醇诱导,并且使用上文所述的方案分析分泌性蛋白的活性。

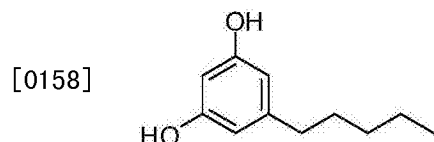
[0153] 化学合成

[0154] A.合成香草醇(3,7-二甲基辛-2,6-二烯-1-醇)



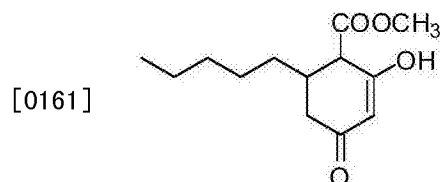
[0156] 通过蒸馏玫瑰草油获得香草醇。在减压下蒸馏玫瑰草油(新方向芳香族化合物)并且将在139-145℃和25mm Hg减压下蒸馏的部分汇聚在一起获得纯香草醇。

[0157] B.合成橄榄醇



[0159] 使用公开程序(弗西拉,A(Focella,A)等人,有机化学杂志(J.Org.Chem.),第42卷,第21期,(1977),第3456页-第3457页)合成橄榄醇。

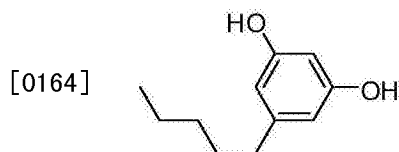
[0160] 1.6-N-戊基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯



[0162] 向甲醇钠(32.4g,0.60mol)和丙二酸二甲酯(90g,0.68mol)于230mL无水甲醇中的搅拌溶液中逐份添加75g(0.48mol)90%3-壬烯-2-酮。随后在N₂下回流反应混合物3小时,并且使其冷却到室温。减压蒸馏溶剂并且将残余物溶解于350mL水中。白色晶体的浆料和几乎澄清的溶液用80mL氯仿萃取三次。用浓HCl将水层酸化到pH 4并且使形成的白色沉淀物在过滤之前静置隔夜。在50℃下在高真空下干燥晶体5小时获得106.5g(0.4416mol)(92%)6-正戊基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯(mp 96-98℃)。使用石油醚:乙酸乙酯

(9:1)的混合物使产物再结晶,并且获得94g纯6-正戊基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯(熔点98-100°C)。

[0163] 2.1-N-戊基-3,5-二羟基苯(橄榄醇)。



[0165] 向6-N-戊基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯(58.4g, 0.24mol)溶解于115mL二甲基甲酰胺中的搅拌冰冷却溶液中逐滴添加溶解于60mL二甲基甲酰胺中的37.9g (0.23mol)溴。添加结束时(约90分钟),将反应混合物缓慢加热到80°C,在此期间二氧化碳的逸出变得相当剧烈。

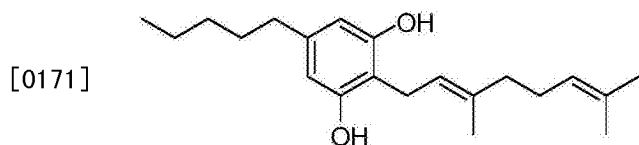
[0166] 反应物维持在这一温度下直到气体逸出停止,随后将反应物进一步加热到160°C并且在这一温度下保持约10小时。加热后,使反应物冷却并且在减压下去除溶剂DMF。因此获得的残基用水(80mL)处理并且用250mL乙醚萃取两次。合并的乙醚层用水洗涤,接着用2×80mL 10%亚硫酸氢钠溶液、2×80mL 10%乙酸溶液洗涤,接着又用水洗涤。

[0167] 经无水硫酸钠干燥后,在减压下去除溶剂获得46.8g黏稠油状物。在减压下蒸馏油状物获得30.3g(0.168mol)(69.3%)橄榄醇作为产物。HPLC分析指示97.5%纯度。

[0168] C. 合成CBG

[0169] 遵照陶拉(Taura)等人,(1996),生物化学杂志(The Journal of Biological Chemistry),第271卷,第21号,第17411页-第17416页披露的方案合成CBG。

[0170] 1. 合成2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-戊基-苯-1,3-二醇(大麻萜酚(CBG))



[0172] 香草醇(3g, 0.0194mol)和橄榄醇(2g, 0.0111mol)溶解于含有80mg对甲苯磺酸作为催化剂的400mL氯仿中,并且在室温下在暗处搅拌反应混合物12小时。12小时后,用饱和碳酸氢钠(400mL)并且接着用H₂O(400mL)洗涤反应混合物。在40°C下在减压下浓缩氯仿层,并且获得的残余物在2.0cm×25cm硅胶柱上使用苯(1000mL)作为洗脱剂进行色谱获得1.4g (0.00442mol)(39.9%)CBG作为产物。

[0173] 或者,如下纯化粗CBG。向250mL烧杯中添加7.25g粗CBG和50mL苯。旋动烧瓶溶解CBG并且添加50g硅胶连同搅拌棒。搅拌溶液隔夜,并且接着倒入44cm×2.75cm柱中。用300mL苯洗脱柱。分析洗脱剂(约70mL洗脱份)的CBG。合并含有CBG的洗脱份1、2和3(约230mL)并且在压力下去除溶剂获得6.464g残余物,其含有>80%CBG,具有适用于随后合成步骤中的纯度。

[0174] 在一个实施例中,通过在250mL烧杯中混合7.25g粗CBG残余物与硅胶浆料(50mL)来纯化粗CBG。缓慢搅拌这一混合物1小时,并且接着使用细筛孔滤纸真空过滤。用250mL苯洗涤滤饼直到获得澄清滤液。在减压下去除溶剂获得6.567g残余物,其具有>80%CBG。

[0175] 2. 合成CBG酸(CBGA)

[0176] A. 合成甲基碳酸镁(MMC)

[0177] 遵照巴拉斯巴曼亚(Balasubrahmanyam)等人,(1973),有机合成(Organic Synthesis),总第V卷,约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.),第439页-第444页披露的方案合成甲基碳酸镁(MMC)。

[0178] 无水2升三颈烧瓶装配有机械搅拌器、冷凝器和1升压力均衡加料漏斗,其顶部装配有进气口管。将清洁无水镁条(40.0g,1.65mol)置于烧瓶中并且在添加无水甲醇(600mL)之前用氮气吹扫系统。通过外部冷却反应混合物控制氢气逸出。当氢气停止逸出时,使缓慢氮气流通过系统并且冷凝器置换为取走蒸馏头的总压缩部分。停止氮气流并且在减压下从溶液蒸馏大部分甲醇。当搅拌甲醇镁的糊状悬浮液不再可行时停止蒸馏。系统再用氮气吹扫并且蒸馏头的出口连接到含有矿物油的小捕集器使得可以估算从反应系统流出的气体体积。

[0179] 向反应烧瓶中添加无水二甲基甲酰胺(DMF)(700mL),并且剧烈搅拌所得悬浮液,同时使无水二氧化碳流通过连接到加料漏斗的进气口管通入反应器。二氧化碳溶解伴随着悬浮甲醇镁的放热反应。当不再吸附CO₂时,在缓慢CO₂气流下加热无色溶液直到液体蒸馏的温度达到140℃,指示已从反应混合物去除残余甲醇。使用缓慢氮气流吹扫反应混合物以帮助在惰性氛围下将混合物冷却到室温。这获得具有536mg MMC/mL DMF的溶液。⁸

[0180] B. 形成CBG-A

[0181] 如下制备6-甲酸-2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-戊基-苯-1,3-二醇、大麻萜酚酸(CBGA)。向10mL锥形瓶中添加1mL MMC的DMF溶液。向这一溶液添加2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-戊基-苯-1,3-二醇(120mg,0.379mmol)。在120℃下加热烧瓶1小时,随后将反应混合物溶解于100mL氯仿:甲醇(2:1)溶液中。使用稀HCl将这一溶液的pH调整到pH 2.0,并且接着使用50mL H₂O分配。

[0182] 经硫酸钠干燥有机层并且通过蒸发去除溶剂。粗反应物的HPLC分析显示约40% CBG转化成CBG-A。

[0183] 或者,在压力相容容器中密封3.16g(10mmol)CBG(或任何其它中性大麻素)、8.63g(100mmol)甲基化镁和44g(1mol)干冰。将容器加热到50℃,并且将温度保持在这一值下三小时。加热之后,容器冷却到室温并且缓慢排放。将反应混合物溶解于100mL氯仿:甲醇(2:1)溶剂中。使用稀HCl将这一溶液的pH调整到pH 2.0并且接着使用50mL H₂O分配这一溶液。经硫酸钠干燥有机层并且通过蒸发去除溶剂。粗反应混合物的HPLC分析显示使用这一方案约85%CBG转化成CBG-A。

[0184] 通过色谱法使用2.0cm×25cm硅胶柱纯化粗CBG-A。使用正己烷:乙酸乙酯的混合物(2:1)(1000mL)洗脱产物,获得45mg(0.125mmol)(37.5%)所要产物。

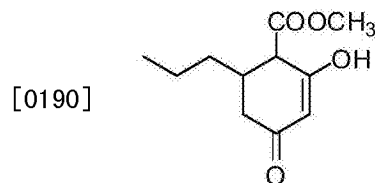
[0185] 或者,通过使用LH-20亲脂性树脂作为介质对粗产物进行色谱法来获得超高纯度CBGA。400g LH-20Sephadex树脂首先使用2L DCM:氯仿(4:1)溶剂溶胀。溶胀树脂重力装填于44×2.75cm柱中。柱装载2.1g溶解于最少量DCM:氯仿(4:1)溶剂中的粗CBGA并且用1.7L相同溶剂洗脱。收集100mL洗脱份。使用这一溶剂系统洗脱出黄色/橙色溶液形式的未反应CBG。约1.7L这一溶剂通过之后,不再观测到黄色/橙色洗脱份并且洗脱溶剂变成100%丙酮以洗脱结合的CBGA。

[0186] 汇聚含有CBGA的洗脱份并且去除溶剂获得0.52g CBGA(约90%回收率)。增加用丙酮洗脱之前通过柱的DCM:氯仿(4:1)溶剂的体积,获得纯度大于99.5%的CBGA。

[0187] CBGV合成

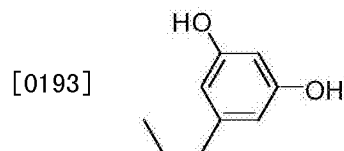
[0188] 如下合成CBGV。

[0189] A.6-N-丙基-2-羟基-4-氧代基环己-2-烯-1-甲酸甲酯:



[0191] 简单来说,向丙二酸二乙酯(52.016g,0.323mol)和甲醇钠(16.206g,0.3mol)的无水甲醇(125mL无水MeOH)溶液中逐滴添加3-庚-2-酮(30.1g,0.25mol)。在45℃下在真空烘箱中干燥隔夜后称量到粗产物为46.315g。粗产物溶解于石油醚(300mL)中。搅拌后,在添加乙酸乙酯(30mL)以使CBGV沉淀之前,从溶液过滤任何未溶解的材料。过滤沉淀物并且在44℃下在真空烘箱中干燥隔夜。回收总计33.569g(0.157mol)(52.3%)所要产物。

[0192] B.1-N-丙基-3,5-二羟基苯



[0194] 使用与上文针对合成橄榄醇所述的一种程序类似的程序制造标题化合物,但使用6-N-丙基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯作为起始物质。简单来说,向6-N-丙基-2-羟基-4-氧代基-环己-2-烯-1-甲酸甲酯的冰冷DMF搅拌溶液中添加溴的DMF溶液。添加溴之后,将反应混合物加热到80℃。加热伴随着产生和释放二氧化碳气体。气体停止逸出后,反应物的温度增加到160℃并且继续加热10小时。接着冷却反应物并且减压去除DMF。用水稀释粗混合物并且使用乙醚进行溶剂萃取。通过移去乙醚和蒸馏剩余的油状物获得标题化合物。

[0195] C.2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-丙基-苯-1,3-二醇(CBGV)。

[0196] 通过向香草醇和1-N-丙基-3,5-二羟基苯的氯仿溶液中添加对甲苯磺酸进行CBGV合成。在室温下在暗处搅拌反应物12小时后,添加水以将粗产物分配到氯仿层。氯仿层接着用饱和碳酸氢钠洗涤,干燥并且在如上文所述纯化之前去除有机溶剂以用于合成CBG。

[0197] D.6-甲酸-2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-丙基-苯-1,3-二醇(CBGVA)。

[0198] 如下制备6-甲酸-2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-丙基-苯-1,3-二醇、大麻萜酚酸(CBGVA)。如上文所述制备甲基碳酸镁(MMC)。向MMC于烧瓶中的DMF溶液添加2-[(2E)-3,7-二甲基辛-2,6-二烯基]-5-丙基-苯-1,3-二醇。在120℃下加热烧瓶1小时,随后将反应混合物溶解于氯仿:甲醇的2:1混合物中。使用稀HCl将这一溶液的pH调整到pH 2.0,并且使用H₂O萃取反应混合物。

[0199] 有机层经硫酸钠干燥并且通过蒸发去除溶剂获得粗产物形式的标题化合物CBGVA。

[0200] 大规模酶促制造大麻素

[0201] 100ml 10mM磷酸钠缓冲液(pH 5.0)置于装配有氧气鼓泡器和搅拌器的玻璃反应器中。向这一溶液中添加35g/l 2-羟基丙基-β-环糊精(HPβCD; Kleptose® HPB)、磺基丁醚β-环糊精钠盐(SBEβCD; Captisol®)或随机甲基化β-环糊精(RMβCD)。以5g小份添加CD以确保完全溶解。

[0202] 向缓冲环糊精溶液中添加2.5g大麻素合成酶底物(例如CBGA或CBGV-A)或式I、II或V化合物。CD比底物的摩尔比为约4:1。向溶液中添加60mg纯化合成酶并且在30℃下培育反应混合物8小时。通过HPLC定期监测反应进展,并且使用酶分析检测和定量过氧化氢的逸出。

[0203] 8小时后,超过90%CBGA底物转化成THCA和CBCA。在酸性pH 5.0下,THCA比CBCA的比率为约10:1。CBC异构体的比率为5:1。

[0204] 用95%EtOH 10:1稀释水溶液。这使环糊精沉淀出来,留下大麻素溶液。环糊精真空过滤,用1L 90%EtOH洗涤,并且干燥以允许其重新用于未来反应。将残余物悬浮于DCM:氯仿(4:1)溶剂中之后,浓缩含有大麻素的乙醇溶液获得约25g粗橙色-黄色残余物。

[0205] 大规模纯化大麻素

[0206] 使用LH-20亲脂性树脂色谱纯化使用这一技术的方法合成的大麻素。简单来说,4000g树脂使用20L DCM:氯仿(4:1)溶胀。溶胀树脂在44×2.75cm柱中重力装填。溶胀树脂的体积为约1350mL。用25g溶解于最少量溶剂中的粗残余物装载柱,并且接着用4L DCM:氯仿(4:1)溶剂洗涤来洗脱CBG。这一洗脱期间无大麻素酸从柱洗脱出来。

[0207] 用1:1到0:1DCM:丙酮溶剂梯度洗脱来洗脱大麻素酸。梯度的各步骤使用一种溶剂柱体积(4L)。首先洗脱CBCA,随后CBGA,并且接着THCA。各大麻素的纯度为>99.5%。

[0208] 纯大麻素可通过在90℃下在真空下加热酸形式进一步加工成其中性或“活性”形式。定量脱羧获得中性大麻素。必要时,可进行再结晶以获得医药级大麻素。

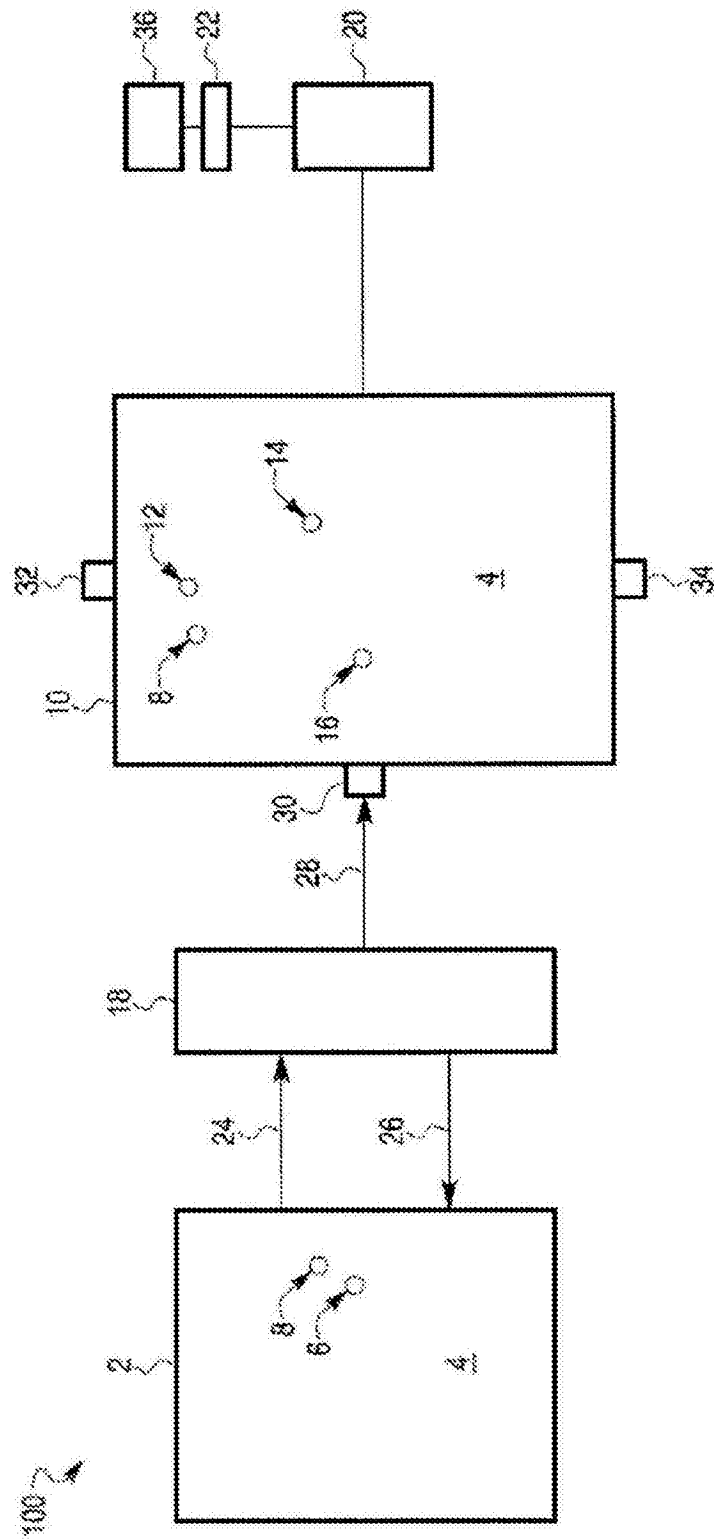


图1