

# 手性药物的生物合成与转化

何奕波 陶满天 (信阳职业技术学院, 河南信阳 464000)

**摘要** 手性药物的生物合成与转化的优点在于反应条件温和, 选择性强, 副反应少, 产率高, 产品光学纯度高, 无污染。不论在研究开发还是产业化进程上均具有很大优势, 国际上一致认为手性生物合成和拆分是首选的手性化技术。综述了脂肪酶、酯酶、转氨酶等在手性药物生产中的应用, 并对手性药物生物合成研究的新进展作一简单介绍。

**关键词** 手性药物; 生物转化; 生物合成

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)33-10585-02

生物催化(Biocatalysis)是指利用酶或有机体(细胞、细胞器等)作为催化剂实现化学转化的过程, 又称生物转化(Biotransformation)<sup>[1]</sup>。生物催化中常用的有机体主要是微生物, 其本质是利用微生物细胞内的酶催化非天然有机化合物的生物转化, 又称微生物生物转化(Microbial biotransformation)。生物催化反应具有高度的化学、区域和立体选择性, 特别适用于医药、食品和农药等精细化工产品的合成制备, 这些领域对单一对映体功能化合物的需求量正在逐年增加。目前, 世界上每年用化学-酶法制备的药物中间体就达1 800 t, 而食品添加剂量则更大, 仅阿斯巴甜一项就有1 500 t<sup>[2]</sup>。生物催化法在手性化合物合成中发挥着重要作用, 并将得到更广泛的应用。酶催化的反应可在温和的条件下进行, 如室温、中性或接近中性pH, 这样的反应条件将会减少产物的分解、异构化、消旋和重排反应。生物催化过程一般无污染或污染较少、能耗相对较低, 是一种环境友好的合成方法, 它将会为绿色化学工业做出贡献。

酶是一种高效催化剂, 能加速化学反应的速度, 最高可达非酶催化反应速度的 $10^{12}$ 倍。酶催化反应还具有化学、区域和立体选择性, 因此酶在有机化合物手性合成中有着重要的应用。最近几年生物催化剂在有机合成中的应用已经成为一种极具吸引力的常规化学合成方法。大量的酶和酶催化的反应相继被报道, 生物催化剂数据库(Biocatalysis Database)中已有8 000篇论文和专利, 介绍了18 500种由酶、微生物和抗体酶催化的生物催化反应, 其中有不少反应已经在工业合成中得到应用<sup>[3]</sup>。手性药物的生物合成和转化是利用酶催化反应的高度底物、立体、区域选择性, 将化学合成的前体或潜手性化合物或外消旋衍生物转化成单一光学活性产物。它主要包括酶促不对称合成、拆分及微生物转化。

## 1 酶法拆分外消旋体合成手性药物

酶的活性中心是一个不对称环境, 有利于识别的消旋体, 在一定条件下, 酶只能催化消旋体中的一个对映体发生反应而成为不同的化合物, 从而使2个对映体分开, 反应产物的对映过剩百分率(ee值)可达100%。因此, 用催化效率高、专一性强的酶拆分消旋体是获取对映纯化合物的捷径。目前, 绝大多数氨基酸(包括非天然氨基酸)都能用酶法拆分得到高纯度对映体, 许多常见氨基酸已能大规模生产<sup>[4]</sup>。酶的固定化技术、多相反应器等新技术日趋成熟, 大大促进了

酶拆分技术的发展, 脂肪酶、蛋白酶、转氨酶等诸多酶类已能用于外消旋体的拆分<sup>[5]</sup>。

脂肪酶是研究最早的酶类之一, 是一类特殊的酯键水解酶。脂肪酶具有高度的选择性和立体异构专一性, 且反应时不需要辅酶, 条件温和, 不良反应少, 适用于催化非水相介质中的化学反应<sup>[6]</sup>。有些脂肪酶具有2个活性中心, 最近, Sanchez等<sup>[7]</sup>用Candida antarctica脂肪酶(CAL)催化双重对映选择性氨解获得成功。反应中有1个亲核物质(醇或胺)和1个手性酰基供体(酸或酯), 由于CAL具有对二者不同的对映识别位点, 因此在一步反应中可实现对二者的同时拆分。CAL对两种反应底物都显示出高对映选择性, 这样就能以高非对映异构率和高ee值生产对映纯的3-羟基酰胺, 而这是合成含有两个立体中心的3-羟基吡咯烷和2-氧代吡咯烷的起始物质。在一步反应中既实现了酰胺的转化, 又实现了酯和胺的拆分。

广泛存在于自然界中并具有生物活性的内酯大多数具有手性, 化学合成过程复杂且产率低, 而利用脂肪酶在有机相中催化羟基脂肪酸形成内酯则是一种很有应用前景的方法<sup>[8]</sup>。酯酶也具有很高的工业应用价值。从1996年开始, 日本研究人员将F. oxysporum的菌丝固定在藻酸钙凝胶中大规模生产D-泛酰内酯, 他们将菌丝置于pH值为6.5~7.0, 浓度为70%的DL-泛酰内酯中保温20 h, D-异构体被完全水解, 从而实现消旋体的拆分。

随着科技的发展, 新酶层出不穷。Snell等<sup>[9]</sup>从当地筛选出一种能降解乙腈的细菌Rhodococcus AJ270, 其含有的一种腈水合酶具有单一的酰胺酶活力, 能用于腈与酰胺的转化反应。David用该酶对消旋布洛芬酰胺进行动力学拆分, 由于其对S-布洛芬酰胺的选择性强, 水解速度快, 经过适当反应时间后, 可得到ee值为90%~94%的S-布洛芬。但若反应时间过短, 则转化不完全, 底物利用率低; 若反应时间过长, 则底物完全水解, 产物将是消旋混合物。

酶法拆分的一个主要缺点是要产生一半无效异构体, 但是在某些反应可以方便地改变反应条件而使无效异构体原位消旋化。例如, 利用酯酶催化的酯交换反应制备R-2-苯氧基丙酸衍生物过程中不需要的S-对映体用催化量的甲醇钠进行加热可以很容易地进行外消旋转化。酶催化反应往往速率较慢, 可通过微波照射, 改变底物结构和溶剂系统等方法进行改善<sup>[10]</sup>。

## 2 酶催化手性药物合成

生物合成是利用微生物或酶直接转化, 如利用氧化还原酶、合成酶、裂解酶等直接从前体化合物不对称合成各种结

**作者简介** 何奕波(1968-), 男, 河南信阳人, 硕士, 讲师, 从事基础化学方面的研究。

收稿日期 2007-07-19

构复杂的手性醇、酮、醛、胺、酸、酯、酰胺等衍生物,以及各种含硫、磷、氮及金属的手性化合物和药物。理论上可将前体化合物 100% 地转化为手性目的产物,相对比较简单、高效,且能完成一些在化学反应中难以进行的反应。

以转氨酶为例,其特点是底物特异性低,反应速度快,无需辅因子,已被用于大规模生物合成非天然氨基酸,以满足生产单旋药物的需要。降压药依那普利的作用靶位是血管紧张素转化酶,其结构中含有的 L 同型苯丙氨酸属非天然氨基酸;另外,非天然氨基酸 D 苯丙氨酸和 L 叔丁基亮氨酸也分别是抗血栓药和抗爱滋病药的组成部分<sup>[11]</sup>。

工业生产 D 对羟基苯甘氨酸的最后一步要在酸性条件下使用等摩尔的脲,这样不仅脲的消耗量大而且毒性也大。Ohashi 发现用 D 氨甲酰酶作生物催化剂,不仅能取代有毒的脲,使反应更安全,而且生产过程也较简化,提高了生产效率。一般来说,D 或 L 氨甲酰酶只催化 D 或 L 型异构体的反应,而 Ogawa 从 *Alcaligenes xylosoxidans* 中分离纯化出的新 L 氨甲酰酶,对底物的特异性范围宽,立体选择性强,对长、短链化合物均有作用。

羟脯氨酸是药物合成中的重要手性原料,尤其是反-4-羟基-2-脯氨酸,它是羟脯氨酸的 8 种异构体之一,是生产抗炎药 N 乙酰羟脯氨酸、抗生素 carbapenem、血管紧张素转化酶抑制剂的重要前体。Shibasak 等分别从 *Dactylosporangium* sp. RHI 和 *Streptomyces* sp. TH1 中发现了重要的脯氨酸-4-羟化酶和脯氨酸-3-羟化酶。前者能催化生产反-4-羟基-L-脯氨酸,后者能催化生产顺-3-羟基-L-脯氨酸,这两种酶均已在大肠杆菌中克隆表达成功,并已用于工业生产<sup>[12]</sup>。

### 3 手性药物生物合成方法的新进展

酶技术的一个新方向是美国 Altus Biologics 的交联酶结晶(Cross-linked enzyme crystals)。Altus 已将来自 *Candida rugosa* 酵母的一种交联结晶酯酶(Lipase)加入到其肽酶(Peptidase)产品 thermolysin 中,该酯酶能催化广泛的酯化和水解反应。Thermolysin 可以将肽缝合在一起,又可以将它们拆散。作为交联酯酶能力的一个实例是布洛芬消旋体甲酯的选择水解成(S)-(+)-布洛芬,对映体过剩 95%。该蛋白酶还可以用来装配人工甜味剂 aspartame 的 3 个 L 氨基酸。

交联酶晶体技术(CLEC)<sup>[13]</sup>的生产过程分 2 步:酶的分批结晶和晶体的化学交联。该技术将水溶液中生成的长度为 50~100 μm 的酶结晶加入戊二醛进行交联并干燥,形成一种具有稳定结构和酶催化活性的晶态物质。交联酶晶体既具有酶的特征(高活性、高选择性、易处理、反应条件温和),又具有固相催化剂的优点(环境适应性强、能循环利用),使其催化剂在有机合成中非常有用<sup>[14]</sup>。交联酶晶体纯度高,催化活力不仅大大高于原酶粉,而且是固定化酶的 100 倍,用量仅为反应体系总量的 1%。相对于可溶酶,交联酶晶体在稳定性、活性、机械强度方面均有突出优势,对热、有机溶剂、蛋白质水解造成的变性作用稳定性强。用 CLEC 技术在低水有机溶剂中拆分消旋醇、酸,其 ee 值可达 95%~99%。

近年来,运用分子进化法改变天然酶化学结构的研究受到人们的关注<sup>[15]</sup>,它是连接生物催化剂工程和介质工程的一座新桥梁<sup>[16]</sup>。分子进化法又称体外进化法和直接进化法,

包括 DNA 改组,体外随机引发重组(RPR),交错延伸(StEP)等方法<sup>[17]</sup>。以 RPR 为例,是以单链 DNA 为模板,配合一套随机序列引物,先产生大量互补于模板不同位点的短 DNA 片段,由于碱基的错配和错误引发,这些短 DNA 片段中也会有少量的点突变,在随后的 PCR 反应中,它们互为引物进行合成,伴随组合,再组装成完整的基因长度。反复进行上述过程,最终可获得满意的进化酶性质<sup>[18]</sup>。

分子进化法可改进酶的热稳定性、反应活性、底物特异性和对映体选择性等,通过分子进化法获得的酶更适于手性药物的大规模生产。例如,氯碳头孢(Loracarbef)为第 4 代头孢菌素类抗生素,可耐受-内酰胺酶的水解,在体内相对稳定,半衰期长,抗菌谱广。合成中需要先将母核中羧基用对硝基苄酯加以保护,然后进行扩环和取代反应,合成后期采用有机溶剂中锌催化还原法脱保护,但产生大量含锌废液而污染环境。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)酯酶可水解此保护基,使反应更加高效环保。但底物氯碳头孢母核对硝基苄酯在水中溶解度很低,酶水解产率低。Arnold 采用直接进化法将酯酶基因在体外随机有限突变,筛选能在 30%DMF 水溶液中高效水解氯碳头孢母核对硝基苄酯的酯酶。经过 4 轮随机突变和一步 DNA 片段离体重组后,成功获得了总活性净增加 50~60 倍的新酯酶,通过对其序列进行分析,确定了基因突变位点,为今后酶的理性设计奠定了基础<sup>[19]</sup>。运用此项技术还对脂肪酶、胸腺激酶(Thymidine kinase)<sup>[20]</sup>、真菌过氧化物酶(Fungal peroxidase)、绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein)等实施体外直接进化获得成功。

酶法实现手性药物的生物合成与转化的发展前景非常诱人,各种新的方法与技术正在不断出现,抗体酶、交联酶晶体、反胶束酶、固定化酶、酶的修饰及非水相酶学等都是当今酶学研究的活跃领域,这些技术的发展与完善必将推动手性药物转化的研究发展。

### 参考文献

- [1] 陈亿新,刘天穗.手性药物技术与展望[J].广州大学学报,2002,1(1):40-45.
- [2] 杜灿屏,林国强.手性与手性药物研究中的若干科学问题[J].中国科学基金,2003,27(2):72-76.
- [3] 王普善,王宇梅.手性药物研究开发的再认识[J].中国新药杂志,2004(10):4-8.
- [4] 张学红.布洛芬新工艺对绿色化学的贡献[J].太原科技,2003(3):16-17.
- [5] FABER K,FRANSEN MCR. Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations[J].Tibtech,2003,11(11):461-470.
- [6] AKKARA JA, AYYAGARI MSR, BRUNO FF. Enzymatic synthesis and modification of polymers in nonaqueous solvents[J].Tibtech,2002,17(2):67-74.
- [7] SANCHEZ VM, REBOLLEDO F, GOIER V, et al. Asymmetric lipase-catalyzed enantioselective amidolysis reactions. Chemocatalytic synthesis of 3-Hydroxy pyrrolidines and 4-(Silyloxy)-2-oxopyrrolidines with two stereogenic centers[J].J Org Chem,2004,69(5):1464-1470.
- [8] 潘冰峰,李祖义.应用生物法合成内酯化合物[J].生物工程进展,1999,19(2):52-55.
- [9] SNELL D, COLBY J. Enantioselective hydrolysis of racemic ibuprofen amide to S(+)-ibuprofen by *Rhodococcus* A1270[J].Enzyme Microb Technol,2003,24:160-163.
- [10] 徐诗伟.微生物转化在药物合成中的应用前景[J].中国医药工业杂志,1996,27(9):422-430.
- [11] TAYLOR PP, PANIALEONE DP, SENKPHIL RF, et al. Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases[J].Tibtech,2003,16(10):412-418.

(上接第10586页)

- [12] OGAWA J, SHIMZUS. Micro enzymes: New industrial applications from traditional screening methods[J]. *Tibtech*, 2005, 17(1): 13 - 20.
- [13] JAEGER K E, REEIZ M T. Microbial lipases for versatile biotechnology[J]. *Tibtech*, 2001, 16(9): 396 - 403.
- [14] 李祖义, 朱伟. 交联酶晶体的性能及其在有机合成中的应用[J]. *有机化学*, 1999, 19(3): 242 - 248.
- [15] TOMDAKI M, KOUJI M, SAMTR T, et al. Evolutionary molecular engineering by random elongation mutagenesis[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(1): 58 - 62.

- [16] CLAUDIA S D, FRANCE H A. Directed evolution of industrial enzymes[J]. *Tibtech*, 1999, 17(4): 135 - 136.
- [17] SHIGEAKI H. Artificial evolution by DNA shuffling[J]. *Tibtech*, 2004, 16(2): 76 - 83.
- [18] 张红缨, 孔祥铎, 张今. 蛋白质工程的新策略——酶的体外定向进化[J]. *科学通报*, 1999, 44(11): 1121 - 1125.
- [19] JEFFREY C M, FRANCES H A. Directed evolution of a para-nitrobenzyl esterase for aqueous organic solvents[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 14(4): 458 - 468.
- [20] CHANG C C J, CHEN T T, COX B W, et al. Evolution of a cytokine using DNA family shuffling[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 17(8): 793 - 797.