

文章编号 :1009-038X(2002)05-0538-07

生物催化剂在制药工业的应用

陶文沂, 李江华

(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 利用生物催化或生物转化的方法生产药物的组分已得到广泛的认同. 在生产小分子的药物及中间体时, 生物催化或生物转化和传统的化学方法最显著的区别就是非常有效地不对称合成手性化合物. 本文主要对氧化还原酶、转移酶、水解酶和裂解酶在制药工业中的应用进行综述.

关键词: 生物催化剂; 生物转化; 制药; 酶

中图分类号: F 120

文献标识码: A

Application of Biocatalysts in the Pharmaceutical Industry

TAO Wen-yi, LI Jiang-hua

(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The use of biocatalysis or biotransformation to produce pharmaceutical ingredients has been widely recognized. In the production of small molecules as either pharmaceutical products or intermediates, the ability of biocatalysis to efficiently introduce chirality distinguishes them from traditional chemical methods. The application of oxidoreductases, transferases, hydrolases and lyases in pharmaceutical industry will be reviewed in this paper.

Key words: Biocatalyst; Biotransformation; Pharmaceutical; enzymes

由于具有反应条件温和、催化效率高和专一性强的优点, 利用生物催化或生物转化等生物方法来生产药物的组分已成为当今生物技术研究的热课题. 生物催化剂主要有两种: 全细胞和游离酶. 两者的实质都是酶, 但前者酶保留在细胞中, 后者酶则已从细胞中分离纯化. 对于需要利用一种以上的酶和辅酶的复杂反应或酶不能游离使用的反应, 通常采用全细胞的生物转化, 否则为了简单起见则选择游离酶. 据推测, 自然界中约有 25 000 种酶, 其中已被认可的有 300 多种. 根据酶催化的反应类型, 可将酶分为 6 类: 氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂

合酶、异构酶和联结酶.

在生产小分子的药物及中间体时, 生物转化和传统的化学方法最显著的区别就是非常有效地不对称合成手性化合物. 手性是生物体的基本特征. 手性药物是指有药理活性的光学纯化合物, 体内许多内源性化合物, 包括与药物发生作用的天然大分子都具有手性. 人体的手性环境可以识别手性药物对映体, 使对映体的药代动力学和药理学出现差异. 不同手性的药物作用于生物体时, 它们所起的作用是不同的, 在活性、代谢过程及毒性等方面存在显著差异. 正是基于这一原因, 开发单一对映体

收稿日期 2001-04-30; 修订日期 2001-06-28.

作者简介: 陶文沂(1946-), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士生导师.

万方数据

形式的合成药成为近几年的研究热点.

根据 Technology Catalysts International(TCI) 的统计,2000 年,手性药物的销售额增加了 13%, 达到 133 亿美元,而且 TCI 预测,到 2008 年,这一数值有可能达到 200 亿美元.2000 年,在市场上销售的所有药物中,有 40% 为单一对映体,而在 1999 年,仅三分之一为单一对映体^[1].

生物催化剂还能合成经典的化学方法难以合成的非手性小分子化合物.此外酶还可用于生产大分子的化合物,如抗生素和有治疗作用的蛋白质.目前异构酶和联结酶在这一领域的应用还较少,因此本文主要对氧化还原酶、转移酶、水解酶和裂解酶在制药工业中的应用进行综述.

1 氧化还原酶(Oxidoreductases)

氧化还原酶是一类催化物质进行氧化还原反应的酶类,被氧化的底物就是氢或电子供体,这类酶都需要辅助因子参与.据估计所有的生物转化过程涉及的生物催化剂有 25% 为氧化还原酶.根据受氢体的物质种类可将其分为 4 类:脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶和加氧酶.

1.1 脱氢酶

脱氢酶的受氢体绝大部分是尼克酰胺二核苷酸(磷酸),作为辅助因子的尼克酰胺核苷酸有两种: NAD⁺ 和 NADP⁺.氧化还原反应在尼克酰胺环上进行,氧化状态时环上 N 为 4 价,写成 NAD(P)⁺,还原后则写成 NAD(P)H.脱氢酶是以辅酶或辅基为受氢体,所以又称为不需氧脱氢酶.

Bommarius 等^[2]利用亮氨酸脱氢酶,以不同的酮酸为底物合成了一系手性列氨基酸(图 1).在这一方法中,辅助因子通过甲酸脱氢酶再生.

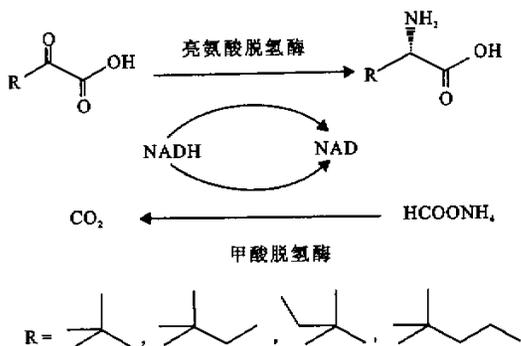


图 1 脱氢酶催化酮酸转化为手性氨基酸

Fig.1 Production of chiral amino acids with keto acids catalysed by dehydrogenase

Omapatrilat 是血管紧张素转化酶和肽链内切

酶的抑制剂,临床上可用于治疗高血压. L-6-羟基己氨酸是用于合成 Omapatrilat 的手性中间体,分别以氨基酸氧化酶和谷氨酸脱氢酶为催化剂,通过两步反应可将外消旋-6-羟基己氨酸转化为 L-6-羟基己氨酸,转化率为 97%,对应体过量(e. e 值),大于 98%(图 2)^[3].

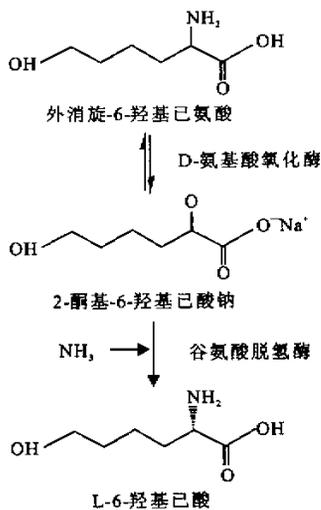


图 2 酶法合成 L-6-羟基己氨酸

Fig.2 Enzymatic production of L-hydroxyhexanoic acid

1.2 氧化酶

氧化酶以氧分子为受氢体,所以又称为需氧脱氢酶.这类酶常需要黄素核苷酸(FMN 或 FAD)为辅酶,且结合紧密,故又称黄素蛋白.

氨基酸氧化酶催化氨基酸转化为相应的酮酸,逆反应则由脱氢酶催化,例如以头孢菌素 C 为原料,二步酶法制备 7-氨基头孢烷酸(7-ACA)(图 3)^[4].

阿昔洛韦是一种无环的鸟苷结构类似物,主要用于抑制单纯疱疹病毒 I、II 型及 E-B 病毒作用.黄嘌呤氧化酶能催化各种含氮杂环化合物的区域选择氧化.利用这一性质,能有效地将 6-脱氧阿昔洛韦氧化成阿昔洛韦(图 4)^[5].

1.3 过氧化物酶

过氧化物酶常以黄素 FAD、血红素为辅基担负 H₂O₂ 与过氧化物的分解与转化,催化以 H₂O₂ 为氧化剂的氧化还原反应:

佳息患是 HIV-I 蛋白酶抑制剂,临床上用于爱滋病的治疗.生产佳息患的一个关键中间体反-1S, 2R-氨基茛醇能以手性的 1S, 2R-环氧茛为前体合成,而以 *Curvularia protuberate* MF5400 中的溴过氧化物酶和脱氢酶为催化剂,可直接将茛转化为 1S, 2R-环氧茛(图 5)^[6].

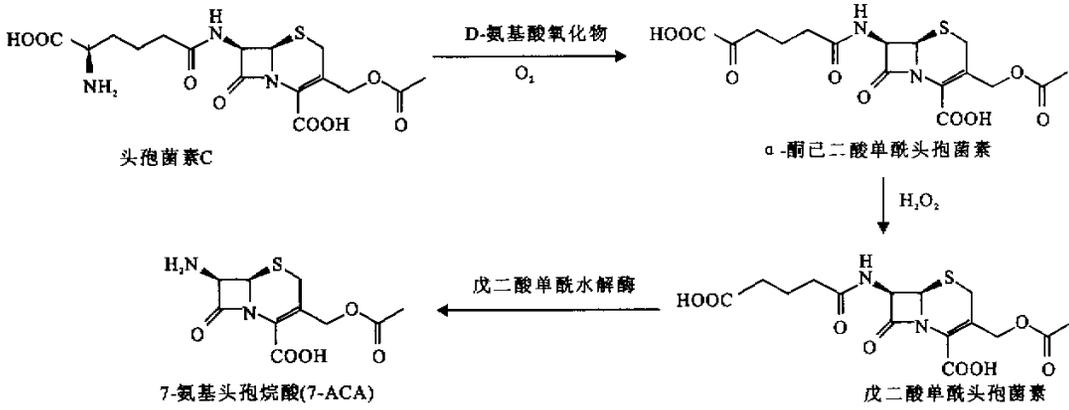


图 3 酶法制备 7-氨基头孢烷酸

Fig.3 Enzymatic production of 7-aminocephalosporanic acid

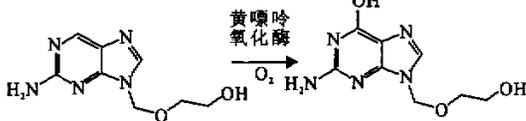


图 4 酶法制备阿昔洛韦

Fig.4 Enzymatic production of acyclovir

根据反应体系中氢供体数目分为两个亚类:单加氧酶和双加氧酶。

例如,在降血糖药物格列吡嗪(glipizide)的合成中,其中一个前体就是在生物催化剂的催化下,直接将甲基基团上的一个非活化碳直接氧化而成(图 6)^[7]。

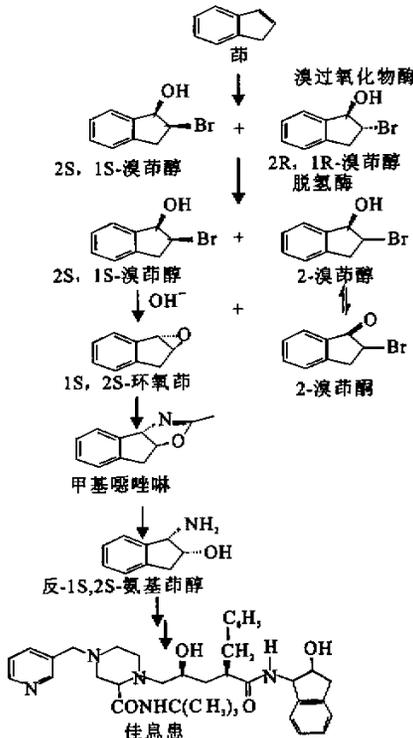


图 5 酶法合成 1S,2R-环氧茚

Fig.5 Enzymatic production of 1S,2R-Indene Oxide

1.4 加氧酶

这类酶常伴随羟基形成,故又称为羟化酶。和氧化酶不同,羰基氧化原子直接参与有机分子,可

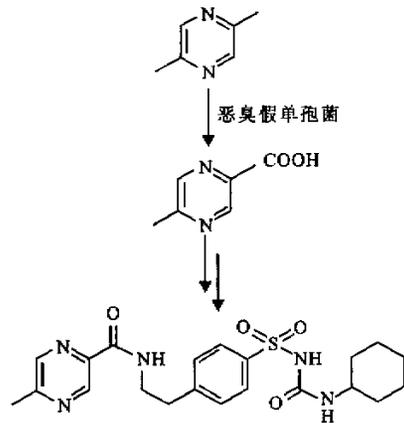


图 6 酶法合成格列吡嗪的前体

Fig.6 Enzymatic production of a precursor of Glipizide

内酯化合物是重要的手性构架。Stewart^[8]等将 *Acinetobacter sp.* NCIB 9871 中的环己酮单加氧酶在面包酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行表达,并以该酵母全细胞为催化剂催化不对称的拜尔-维利格氧化反应,合成了一系列的内酯化合物(图 7)。

2 转移酶(transferases)

转移酶能催化一种底物分子上的特定基团(例如酰基、糖基、氨基、磷酸基、甲基、醛基和羰基等)转移到另一种底物分子上,在很多场合,供体是一种辅助因子(辅酶),它是被转移基团的携带者,所以大部分转移酶需有辅酶的参与。

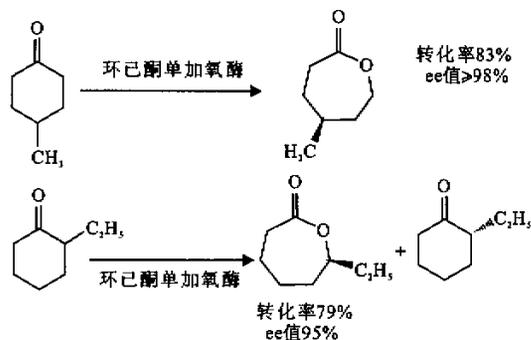


图 7 环己酮单加氧酶催化的不对称的拜尔-维利格氧化反应

Fig. 7 Asymmetric Baeyer-Villiger Oxidations Catalysed by cyclohexanone monooxygenase

在转移酶中,转氨酶是应用较多的一类酶.这类酶通常都需要磷酸吡哆醛为辅酶.磷酸吡哆醛是维生素 B₆ 的衍生物,它除了参与转氨基反应以外,也是脱羧反应以及消旋反应的辅酶.反应过程中先要形成活泼的 Schiff 碱,然后再根据酶的催化特性进行相应的反应.转氨酶的特点是底物特异性低,反应速度快,已被用于大规模合成非天然氨基酸,以满足生产手性药物的需要(表 1)^[9]. L-同型苯丙氨酸是抗高血压药依那普利(enalapril)的组分. D-苯丙氨酸和 L-叔丁亮氨酸分别是抗血栓药和抗爱滋病药的组分.

表 1 用转氨酶生产非天然氨基酸

Tab.1 Production of unnatural amino acids

转氨酶的种类	缩写	基因	来源	产物
天冬氨酸	AAT	<i>AspC</i>	<i>E. coli</i>	L-同型苯丙氨酸
分枝氨基酸	BCAT	<i>LlvE</i>	<i>E. coli</i>	L-叔丁基亮氨酸
酪氨酸	TAT	<i>TyrB</i>	<i>E. coli</i>	L-2-氨基丁酸 L-磷丝菌素 L-噻吩丙氨酸
D-氨基酸	DAT	<i>DaT</i>	<i>Bacillus sp. YMI</i> <i>Bacillus sphaericus</i>	D-谷氨酸, D-亮氨酸 D-苯丙氨酸 D-酪氨酸 D-2-氨基丁酸

L-丝氨酸是一个重要的药用氨基酸.孙进等^[10]利用丝氨酸羟甲基转移酶催化甲醛和甘氨酸,可逆地合成 L-丝氨酸(图 8),反应过程中丝氨酸羟甲基转移酶需要 PLP 和四氢叶酸作为辅助因子.最终反应液中 L-丝氨酸浓度达到 0.2 mol/L,该法是目前最有应用前景的 L-丝氨酸生产方法.

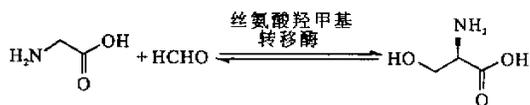


图 8 酶法合成 L-丝氨酸

Fig. 8 Enzymatic production of L-serine

3 水解酶(hydrolases)

水解酶是指在有水参加下,把大分子物质底物水解为小分子物质的酶,大多不可逆,一般不需要辅助因子.此类酶发现和应用数量日增,是目前应用最广的一种酶,据估计,生物转化利用的酶约三分之二为水解酶.在水解酶中,使用最多的是脂肪酶,其它还包括酯酶、蛋白酶、酰胺酶、腈水解酶、磷脂酶和环氧化物水解酶.由于脂肪酶较易获得,在已报道的生物转化过程约有 30% 与脂肪酶有关.常用的脂肪酶包括猪胰脂肪酶、假丝酵母属脂肪酶、假单孢杆菌属脂肪酶和毛霉属脂肪酶.例如用固定化脂肪酶合成抗高血压病药物地尔硫卓(diltiazem)的一个关键中间体(图 9)^[11].在这一过程中,目的物的产率为 40% ~ 43%,光学纯度(e. e 值)为 100%.

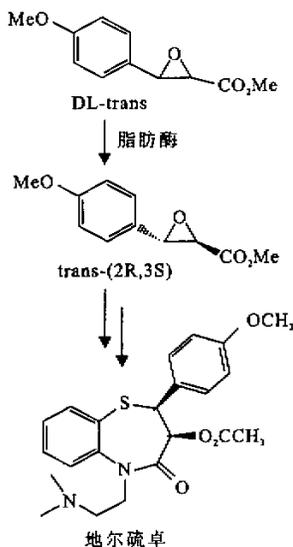


图 9 脂肪酶催化合成地尔硫卓的中间体

Fig. 9 Production of precursor of Diltiazem catalysed by lipase

酶法拆分也已广泛应用于制药工业.例如抗癌药物泰素(taxol,人工半合成紫杉醇)的 β-氨基酯侧链就是用脂肪酶催化拆分外消旋氮杂环丁酮衍生物合成的(图 10)^[12].

酰胺酶通常含有 Zn²⁺,它们催化 L-氨基酸酰胺的水解.例如用恶臭假单孢菌中的酰胺酶可以合

成癫痫附加治疗药哌啶酸的衍生物(图11)^[13]。

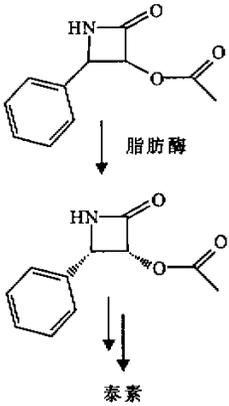


图10 酶法制备泰素的 β -氨基酯侧链

Fig. 10 Enzymatic production of β -amido ester side chain of Taxol

该拆分工艺的生产规模已达到吨以上(e. e 值大于99%) ,而且副产物可通过动态拆分循环利用。

另一个使用较广的酰胺酶是乙内酰胺酶,该酶常用于大规模制备D-氨基酸。例如用乙内酰胺酶工业化生产阿莫西林的侧链D-对羟基苯甘氨酸(图12)^[14] ,在该工艺中,非目的对映体可通过动态拆分循环利用。

用磷酸化酶作为催化剂可制备天然和非天然的核苷。例如,用两步酶法合成抗病毒药利巴韦林(图13)^[15]。

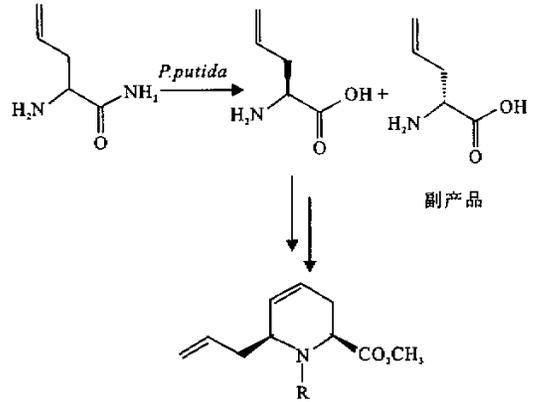


图11 酶法合成哌啶酸的衍生物

Fig. 11 Enzymatic synthesis of oioecolic acid derivatives

D-泛酸钙为维生素类药物,用D-泛解酸内酯水解酶将DL-泛解酸内酯拆分得到D-泛解酸内酯,再与 β -丙氨酸钙缩合生产D-泛酸钙。该方法工艺简单,成本低,从环境角度考虑也有利^[16]。

R-3-羟基-4-腈丁酸乙酯(ethyl-(R)-3-hydroxy-4-cyanobutyrate)是生产降胆固醇药阿妥伐他汀(Atorvastatin,商品名Lipitor)的中间体。在已报道的用2,3-二羟基氯丙烷合成该中间体的方法,需要6步反应,而用腈水解酶催化表氯醇合成该中间体只需3步反应(图14)^[17]。

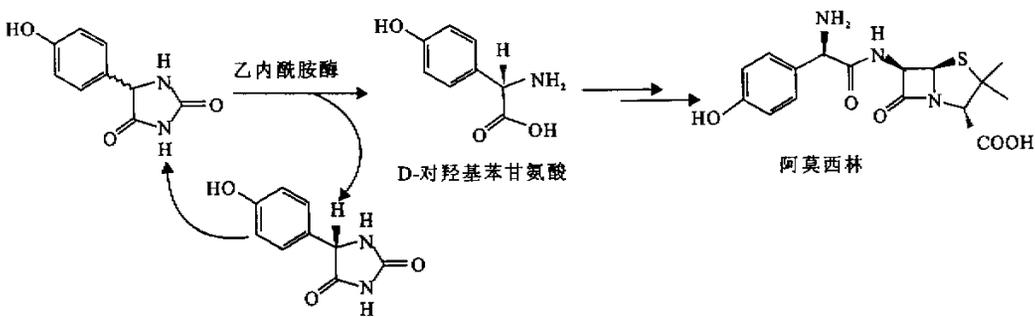


图12 两步酶法合成D-对羟基苯甘氨酸

Fig. 12 Two-step enzymatic synthesis of D-p-hydroxyphenylglycine

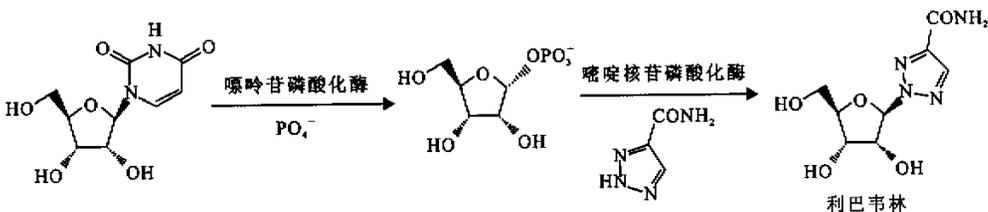


图13 酶法合成抗病毒药利巴韦林

Fig. 13 Two-step enzymatic production of the antiviral drug Ribavirin

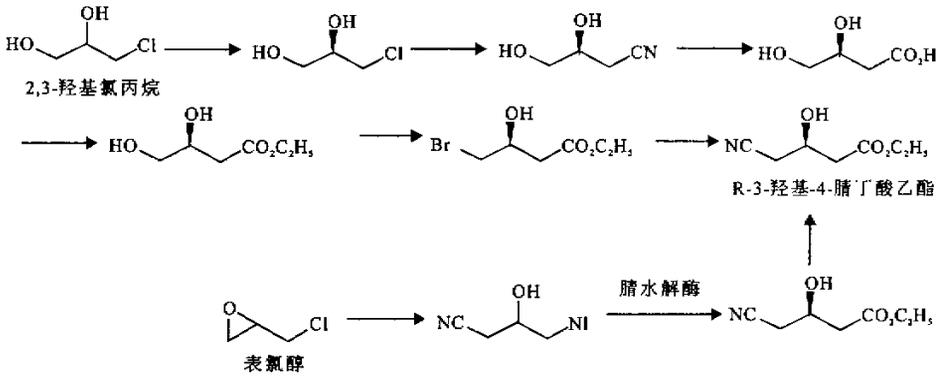


图 14 腈水解酶催化表氯醇合成 R-3-羟基-4-腈丁酸乙酯

Fig. 14 Synthesis of Ethyl(R)-3-hydroxy-cyanobutyrates from epichlorohydrin catalysed by epichlorohydrin

4 裂解酶(lyases)

裂解酶催化小分子在不饱和键(C=C, C=N 和 C=O)上的加成或消除. 裂解酶中的醛缩酶、转羟乙醛酶和氧脲酶 3 类酶在形成 C—C 时具有高度的立体选择性,因而日渐引起关注. 用醛缩酶催化的醛缩反应可用于将醛的长度延长 2 个或 3 个碳单元. 类似于化学醛缩反应,该反应可能是将一个稳定的带负电的碳加到醛上,并具有高度立体选择性.

例如用固定化醛缩酶合成 N-乙酰神经氨酸已达到吨以上的规模(图 15)^[18]. N-乙酰神经氨酸为神经氨酸苷酶抑制剂的前体,该抑制剂临床上用于治疗病毒性流感.

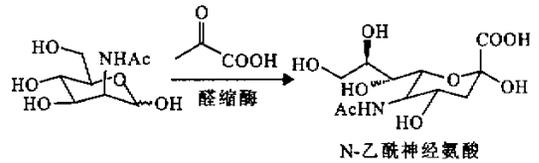


图 15 酶法合成 N-乙酰神经氨酸

Fig. 15 Enzymatic synthesis of N-acetylneuraminic acid

多巴胺是哺乳动物中枢神经系统的神经传递质,也是激素降肾上腺素和肾上腺素的前体. 临床上用于治疗急性循环系统不全和低血压. 以 3,4-二羟基-L-苯丙氨酸(L-DOPA)为底物, L-DOPA 脱羧酶为催化剂可合成多巴胺(图 16)^[19].

在偶姻反应中成功的例子就是工业上用裂解酶制备 L-麻黄素的前体(图 17)^[20],此反应所用的酶为丙酮酸脱羧酶,该酶需用焦磷酸硫胺素(TPP)作为辅助因子.

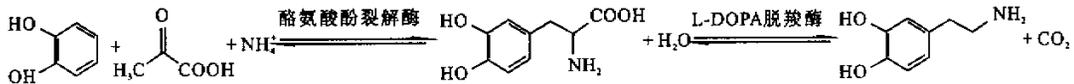


图 16 酶法合成多巴胺

Fig. 16 Enzymatic synthesis of dopamine

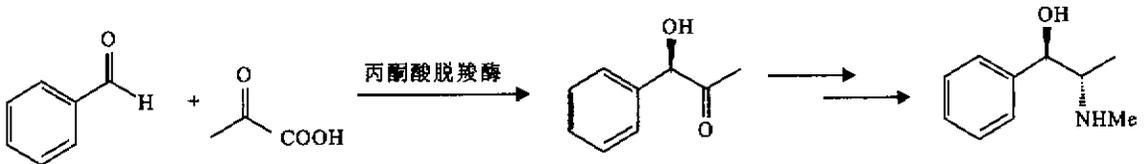


图 17 酶法合成 L-麻黄素的前体

Fig. 17 Enzymatic synthesis of precursor of L-ephedrine

5 结 语

在对映体选择性合成和官能团区域性选择转化过程中,酶是非常有用的工具. 在有机合成中,生物转化适用的范围也较广. 近年酶工程领域不断涌

现许多新的技术,如抗体酶、人工合成酶、模拟酶、交联酶晶体、反胶束酶、固定化酶、固定化细胞、酶的修饰及非水相酶学等都是当今酶学研究领域的热点. 此外利用基因工程技术、蛋白质工程技术改善原有酶的各种性能,如提高酶的产率,增加酶的

稳定性;运用基因工程技术将原来有害的、未经批准的微生物产生的酶的基因,或由生长缓慢的、动植物产生的酶的基因,克隆到安全的、生长迅速的、

产量较高的微生物体内,改由微生物来生产.随着这些技术的发展与完善,未来必将会有更多的生物催化过程被应用于制药工业.

参考文献:

- [1] STINSON S C. Chiral drugs-growth and development of these pharmaceuticals continue unabated[J]. *C&E News*, 2001, 79(40):79-97.
- [2] BOMMARIUS A S, SCHWARM M, DRAUZ K. Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals-examples and perspectives[J]. *J Mol Cat B: Enzymatic*, 1998, 5:1-11.
- [3] PATEL R N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for omapatrilat, an antihypertensive drug[J]. *Biomolecular Engineering*, 2001, 17:167-182.
- [4] CAMBIAGHI S, Tomaselli S, Verga R. Enzymatic process for preparing 7-aminocephalosporanic acid and derivative[P]. 欧洲专利 0496993, 1992-08-05.
- [5] KRENITSKY T A, Hall W W, DE MIRANDA P, et al. 6-Deoxyacyclovir: a xanthine oxidase-activated prodrug of acyclovir[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(10):3209-3213.
- [6] ZHANG J, ROBERGE C, REDDY J, et al. Bioconversion of indene to trans-2S,1S-bromoindanol and 1S,2R-indene oxide by bromoperoxidase/dehydrogenase preparation from *Curvularia protuberata* MF5400[J]. *Enzyme and microbial technology*, 1999, 24(1):86-95.
- [7] KIENER A. Microbiological oxidation of methyl groups in heterocycle[P]. 美国专利:USP 5236832, 1993-08-17.
- [8] STEWART J D, Reed K W, Martinez C A. Recombinant baker's yeast as a whole-cell catalyst for asymmetric baeyer-villiger oxidation[J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120(15):3541-3548.
- [9] TAYLOR P P, PANTALEONE D P, SENKPEIL R F, et al. Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases[J]. *Trends in Biotechnology*, 1998, 16(10):412-418.
- [10] 孙进, 吴梧桐, 吴震等. 酶法合成 L-丝氨酸及反应液中氨基酸的分离[J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(2):135-138.
- [11] MATSUMAE H, FURUI M, SHIBATANI T, et al. Production of optically active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1994, 78(1):59-63.
- [12] HOLTON R A. Method for preparation of taxol using β -lactam[P]. 美国专利:USP 5175315, 1992-12-29.
- [13] STINSON S C. Chiral drug[J]. *C&E News*, 2000, 78(43):55-78.
- [14] CAROL J H, SHAUN K, STEPHANIE G B. Production of D-amino acid from D,L-5-substituted hydantoins by an *Agrobacterium tumefaciens* strain and isolation of a mutant with inducerindependent expression of hydantoinhydrolysing activity[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(7):707-711.
- [15] SHIRAE H, YOKOZEKI K. Purification and properties of purine nucleoside phosphorylase from *Brevibacterium acetylum* ATCC 954[J]. *Agric Biol Chem*, 1991, 55(2):493-9.
- [16] 汤一新, 孙志浩, 华蕾等. D-泛解酸内酯水解酶产生菌的筛选及产酶条件研究[J]. 微生物学报, 2002, 42(1):81-87.
- [17] ROUHI A M. Biocatalysis buzz-Deals underscore interest in biotechnology-based methods to improve chemical processes[J]. *C&E News*, 2002, 80(7):86-87.
- [18] MAHMOUDIAN M, NOBLE D, Drake C S, et al. An efficient process for production of n-acetylneuraminic acid using n-acetylneuraminic acid aldolase[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(5):393-400.
- [19] LEE S G, HONG S P, SUNG M H. Development of an enzymatic system for the production of dopamine from catechol, pyruvate, and ammonium[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25:298-302.
- [20] POHL M. New enzymes for organic synthesis[M]. New York: Springer, 1997. 5.

(责任编辑 杨 萌)