

《现代生物技术制药丛书》编委会

编委会主任 甄永苏

编委会副主任 刘海林 肖梓仁 吴剑波 赵贵英

委 员 (以姓氏汉语拼音为序)

程克棣 中国医学科学院药物研究所 研究员

董德祥 中国医学科学院医学生物学研究所 研究员

劳为德 中国科学院遗传与发育生物学研究所 研究员

李 元 中国医学科学院医药生物技术研究所 研究员

刘海林 中国医药生物技术协会 副理事长兼秘书长 研究员

吴剑波 中国医学科学院医药生物技术研究所 研究员

吴朝晖 中国医药生物技术协会 副秘书长

肖梓仁 中国医药生物技术协会 副理事长 研究员

许实波 中山大学药学院 教授

叶和春 中国科学院植物研究所 研究员

赵贵英 中国医学科学院医药生物技术研究所 研究员

甄永苏 中国医学科学院医药生物技术研究所 研究员 中国工程院院士

本 册 主 编

主编 李荣秀 上海交通大学生命科学技术学院
李平作 中国科学院上海生物工程研究中心

现代生物技术制药丛书

酶 工 程 制 药

Enzyme Engineering in Pharmaceuticals

李荣秀 李平作 主编



化 学 工 业 出 版 社
现代生物技术与医药科技出版中心

此为试读, 需要完整PDF请访问: www.ertongbook.com

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

酶工程制药/李荣秀, 李平作主编. —北京: 化学工业出版社, 2004. 3

(现代生物技术制药丛书)

ISBN 7-5025-5305-3

I. 酶… II. ①李…②李… III. 酶制剂: 药物-制造 IV. TQ464. 8

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 020530 号

现代生物技术制药丛书

酶工程制药

Enzyme Engineering in Pharmaceuticals

李荣秀 李平作 主编

责任编辑: 莫小曼 叶 露

责任校对: 顾淑云 周梦华

封面设计: 潘 峰

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

http: //www. cip. com. cn

*

新华书店北京发行所经销

北京兴顺印刷厂印装

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 12½ 字数 299 千字

2004 年 5 月第 1 版 2004 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5305-3/R·201

定 价: 28.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

序


在人类基因组工程和生物信息学的推动下，生物技术创新日新月异，生物医药产业正在经历一个飞速发展的新阶段。生物技术将为人解决疾病防治、人口膨胀、食物短缺、能源匮乏、环境污染等一系列问题。发展生物技术产业是我国难得的机遇与挑战。生物技术产业在今后 20 年内，将与 30 年以前的计算机产业一样，对人类生活产生愈来愈大的影响。近几年来，科学家、金融家、企业家对生物医药产业的信心倍增，表现在用于生物医药产业发展的研究和发 展 (R & D) 费用每 5 年翻一番，是世界上用于 R & D 费用最多的产业。在开发生物医药的品种上也正在发生明显的转变，即从治疗一般疾病转向治疗疑难病症，从防治儿童和成人疾病转向防治老年病，从治疗疾病转向提高人的生活质量，从生产药品转向生产功能性食品。

2002 年 5 月 1 日世界卫生组织发表的关于基因研究报告中指出，基因研究可以大幅度地提高发展中国家的医疗保健事业，振兴民族经济。我国在 2001 年已有 20 多种基因工程药物和疫苗被批准进行商业化生产，奠定了我国现代生物技术制药产业的基础。我国政府对发展生物技术极为重视：我国“十五”计划高技术产业化规划中“生物技术产业化工程”已列为十二项重点项目之一；在我国“十五”计划科技规划中“功能基因组和生物芯片”已列为十二个重点科技专项之一。

2002 年 4 月 18 日美国参议院一致通过一项决议，指定 4 月 21~28 日为“国家生物技术周”，以示国家对生物技术的重视。现代生物技术可提高健康保障水平，振兴医药工业，在农业上可提高产量，改进农产品的质量，并可保护环境。确定“国家生物技术周”的目的是要使美国人民了解生物技术对改善人的生活质量和环境质量是多么重要。

正值国际上生物制药蓬勃发展之时，化学工业出版社组织编写的《现代生物技术制药丛书》即将出版，这是我国生物技术界的一件大事。丛书从理论到实践全面系统地概括介绍了现代生物技术制药的最新进展。丛书包括《基因工程药物》、《抗体工程药物》、《动物细胞与转基因动物制药》、《植物细胞工程制药》、《酶工程制药》、《海洋生物制药》、《微生物制药》、《疫苗技术基础与应用》、《生物制药设备和分离纯化技术》以及《生物制药生产规范与质量控制》10 个分册。本丛书的作者均是国内一流的专家或院士，不仅具有很高的学术水平，而且也有丰富的实践经验。本丛书的宗旨

是基础理论与实用技术相结合，并侧重于实用性，它不仅适合于生物制药相关领域的技术人员，也适用于大专院校相关专业的师生们。我坚信，本套丛书的出版必将对提高我国现代生物技术制药水平发挥积极作用，从而促进我国生物医药产业的发展。

中国工程院院士 

2002年5月于北京

前 言

生物技术正在越来越多地从根本上改变进行药物发现和开发的方法。酶工程是生物技术中发展时间较长的一门技术。近 20 年来，随着与其相关的诸多基础理论和技术以及实验手段的发展，酶工程走出被动、低效的状态，它的优势逐步显现出来而发展成为主动、高效的当代生物技术，被列入到高技术领域。

酶工程的应用主要集中于食品工业、轻工业以及医药工业中。酶工程对医药方面贡献巨大，以往采用化学合成、微生物发酵及生物原料提取等传统技术生产的药物，皆可通过现代酶工程生产，还可获得传统技术不可能得到的昂贵药物。而且酶工程还能解决好制药工业上使用的各种药物化学合成难以克服的缺点，许多新型药物产品都可利用酶工程在传统制药基础上进行修饰和改造，使其效价和功能提高。

本书着重从工程和技术化的角度介绍酶工程在制药工业中的应用，并提供基本的实验方法和步骤，作为读者深入研究的跳板。本书能够帮助读者了解酶工程制药所涉及的内容和可能应用的场合，而对于有志于在该领域挖掘知识财富的人们，还需要去参阅一些专业书籍和学术期刊，同时需要具备坚持不懈的科学献身精神和在实际工作中的辛勤耕耘。

在本书编写的过程中，葛佳佳参编了第 3 章、第 4 章中固定化酶生产氨基酸的内容；朴文花参编了第 5 章中有关工程菌克隆表达的部分内容；王莉为第 4 章中酶的精制和非水相酶的催化技术准备了丰富的参考资料；魏诚哲、汤祺麟分别为第 5 章、第 6 章准备了部分参考资料，对他们的辛勤劳动表示诚挚地感谢！特别感谢远在美国 NIH 的高修功博士，他提供了自己撰写的有关非水相酶法催化的宝贵资料。同时也要感谢西风鸣先生、鲁绍梅女士的无私帮助。在写作的一年中，许多同事和朋友都提供了热情的帮助。其中吴美□帮助整理了许多资料，慧昕、张富山、孔明、程永刚、辛择毓、蔡青松、周密和郑文彪也帮助整理了本书中的一些资料，对本书能够迅速完稿作出了重要贡献，在此表示感谢。在本书的写作过程中，有许多周末和夜晚不能陪伴家人，没有尽到丈夫和父亲应该尽到的责任。在此书完成之际，感谢张小芳女士、西霞女士和李华、李彦夷先生持续不懈的理解和支持。

由于酶工程制药领域的发展十分迅速，研究方法和技术都在不断更新，本书力求

对相关原理及其技术做比较全面的介绍，对其应用性进行分析评价，并对现状和发展前景进行讨论，但由于本书涉及面广，局限性在所难免，读者在阅读的过程中，如发现本书所述方法和观点有不妥之处，敬请提出宝贵意见。

编者

2003年11月于上海

目 录

第 1 章 绪论	1
参考文献	3
第 2 章 酶工程原理	5
2.1 酶研究概况	5
2.2 酶催化反应的特点	6
2.3 与酶相关的概念	9
2.4 酶催化机理	11
2.5 影响酶催化反应的因素	13
2.6 酶的立体专一性反应机制	14
2.7 酶催化反应三点结合学说	15
2.8 对映体过量值的检测	16
2.9 酶催化反应的类型	17
2.10 非水相酶催化反应	17
2.10.1 非水相酶催化反应中微量水的作用	18
2.10.2 非水相中酶的结构与功能	19
2.10.3 非水相中酶的特性	20
参考文献	24
第 3 章 酶的生产与制备	26
3.1 天然微生物酶的发酵技术	27
3.1.1 营养性因子的影响	27
3.1.2 非营养性因子的影响	28
3.2 工程菌的高密度发酵	31
3.2.1 大肠杆菌工程菌的高密度发酵	31
3.2.2 酵母工程菌的高密度发酵	34
3.3 酶生产的下游技术	43
3.3.1 提取	43
3.3.2 包涵体的变性和复性	44
3.3.3 浓缩	45

3.3.4	酶的精制-柱色谱分离	47
	参考文献	57
第4章	酶工程制药的工艺和工程化技术	59
4.1	酶工程制药中的固定化技术	59
4.1.1	引言	59
4.1.2	共价结合	61
4.1.3	吸附	64
4.1.4	包埋和微胶囊	64
4.1.5	固定化酶的催化特性	66
4.1.6	固定化酶的反应器	68
4.1.7	固定化酶的应用举例	70
4.2	酶工程制药中的非水相酶催化技术	75
4.2.1	酶促合成手性四氢咪喃磺酸酯	76
4.2.2	二醇烯烃的酶促非对称化作用	80
4.2.3	酶促合成甲酰肼	88
4.2.4	肽的非水相酶法合成	102
4.3	酶法手性合成技术	109
4.3.1	概论	109
4.3.2	血管肽酶抑制剂	110
4.3.3	β_3 受体激活剂	115
4.4	游离酶与全细胞在制药工艺中的应用	118
4.4.1	游离酶与全细胞的优点及局限性比较	118
4.4.2	游离酶与全细胞应用与发展	119
4.5	辅酶的再生-依赖于辅因子的氧化还原酶的应用	123
4.5.1	氧化还原酶在氨基酸合成中的应用	123
4.5.2	羟酸	125
4.5.3	在醇类、醛类和酮类化合物生产中的应用	126
4.5.4	内酯制备	127
4.5.5	在甾体化合物生物转化方面的应用	127
4.5.6	其他生产过程中的应用	128
4.6	展望	128
	参考文献	129
第5章	酶工程制药的应用	131
5.1	降血压和降血脂药物	131

5.1.1	血管紧张肽转变酶中性内肽酶抑制剂	131
5.1.2	凝血筋烷 A2 拮抗剂	134
5.1.3	钙离子通道阻断剂	136
5.1.4	钾离子通道激活剂	136
5.2	降血脂、降胆固醇药物	138
5.3	抗心律失常剂	142
5.4	手性药物中间体 R-4-氯-3-羟基丁酸乙酯的酶法合成	143
5.4.1	概述	143
5.4.2	酮基还原酶的克隆表达	144
5.4.3	转化条件优化	148
5.5	青霉素酰化酶在半合成抗生素中的应用	150
5.5.1	概况	150
5.5.2	生产菌株改良	151
5.5.3	培养条件优化	153
5.5.4	酶的提取	155
5.5.5	青霉素酰化酶的固定化	156
5.5.6	青霉素 G 经 PA 水解得到 6-APA	159
5.5.7	固定化青霉素酰化酶生产头孢氨苄	161
	参考文献	163
第 6 章 酶工程制药的发展趋势		165
6.1	科学技术发展的要求	165
6.2	新酶的发现	167
6.3	现有酶的改造	169
6.4	仿生酶的研究	173
	参考文献	180
	中文索引	182
	英文索引	185

第 1 章 绪 论

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，可将酶分为六类：氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和联结酶。酶工程主要研究酶的催化性质、动力学性质、可固定化性质，以及用于实现某种工程目标，如大规模生产一种物质。

酶工程制药可初步定义为利用酶的催化性质、动力学性质、可固定化性质生产一种药物或药物中间体。它是酶学理论与制药技术相结合而形成的一种新技术。酶工程制药的迅速发展主要因为从商业化和环境的角度观察，目前制药工业上使用的各种药物化学合成过程都存在内在的缺点，例如，副反应多，产品产率低，高温和（或）高压导致能耗高、冷却水消耗多，苛刻和危险的工艺过程涉及到高温、高压、酸性或者碱度，需要特别设计的装备和控制系统以致投资增加。无用的副产品处理困难或者处理的成本太高，化学物质的高消耗、能源的高消耗和有毒有害副产品会对环境产生负面影响，手性药物的合成难度高、步骤多，大规模生产更困难，几乎所有这些缺点都能通过使用酶克服，不需要有毒原料，反应条件温和，增加原料中原子的利用率，废物排放减少 10 倍。

利用酶催化来生产药物的组分已成为当今生物技术研究的热点课题。在药物化学合成领域，酶的应用已经获得重要进展，尤其是重要合成反应的立体选择性方面控制，例如醇醛缩合（aldol-condensations）、酮的还原（ketone-reductions）、Baeyer-Villiger 氧化（Baeyer-Villiger oxidations）等。醇醛缩合在药物合成领域占据中心地位。已知酶催化醇醛缩合具有立体选择的能力。发展纯粹芳香化合物和中间体的立体选择性实用酶促醇醛缩合方法能够。在绝大部分情况中，当一个化合物用纯粹的化学方法进行转化（例如一个非活性碳原子中心的立体选择性衍生化或者分子中几个相似官能团中的一个需要立体选择性转化）比较困难时，就需要用酶进行合成。

酶工程制药在市场上已获得成功，酶工程可以合成新型药物或对传统法生产的药物进行改造例如 Allegra[®]（fexofenadine）于 1996 年在美国批准上市治疗过敏反应，它是消旋药物 Seldane[®]（特非那定）的一个对映体；单对映体的 fexofenadine 具有

优点是只用底物、产物、水和一种能进行生物降解的蛋白质。Wacker Chemie 公司的一系列药物合成原料是非天然氨基酸，它利用一条细菌合成半胱氨酸的代谢途径生产的。产物之一是 L-胱氨酸，再电解转化为单一的 L-半胱氨酸。这两种氨基酸连同 N-乙酰基半胱氨酸和 S-羧甲基半胱氨酸已经用在药物生产中。生产非天然氨基酸需要向硫化氢解酶的一种无细胞反应混合物中添加其他化合物。如，添加 2-氨基噻唑可以生产 S-噻唑基半胱氨酸，添加 1-氢-1,2,4-三唑能生产三唑-L-丙氨酸。

酶工程可以通过克隆酶的基因、表达酶、用定向进化技术改造酶，研究和开发酶反应过程。加利福尼亚的 Biocatalytics 是生产合成酶的专业公司，该公司已在它的酮还原酶产品库中添加了第七个酮还原酶和第八个酮还原酶，以及一个谷氨酰转移酶。各种酮还原酶，使用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH)，能将酮还原成二级醇的对映体。该公司提供的酶反应试用试剂盒中有辅酶、酶和缓冲液等客户需要进行酶反应的所有试剂。当客户用作商业生产过程时，该公司还能设计一套葡萄糖或者甲酸盐的平行氧化过程进行辅助因子的再生。新发现的谷氨酰转移酶可用于手性胺的拆分。这个酶的一个底物是外消旋的 N-苯乙基-戊二酸单酰胺，产物是 (R)- α -苯乙胺和未反应的 N-(S)- α -苯乙基-戊二酸半酰胺。

尽管还有一部分立体选择性有机合成仍然采用传统方式，利用酶进行合成反应催化日益重要。例如 Glaxo Wellcome 公司治疗艾滋病的药物 Ziagen (abacavir sulfate)，其中的中间体的合成就是通过生物催化 (biocatalysis) 完成的。英国 Chiroscience Group 集团的 ChiroTech，子公司生产的 (-) lactam，是 abacavir 的中间体。消旋化的 lactam 通过 acylase 分解成 (-) lactam 和一个氨基酸。现代的药物活性成分化合物的生产往往需要 10 多个合成步骤。一般认为不对称合成适合单手性中心的化合物，多手性中心的化合物的合成更倾向于利用生物催化。目前，正在研发的药物有高达 70% 是手性，这些手性药物中有一般需要采用生物催化技术生产。目前只有 10% 的手性药物使用生物催化技术。

其他一些比较成功的例子还有 prontosil 发展成磺胺药，从硝苯啶到络活喜，氨基酸氧化酶催化头孢菌素 C 为原料，二步酶法制备 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA)；黄嘌呤氧化酶催化 6-脱氧阿普洛韦氧化成阿昔洛韦，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 型、单纯疱疹病毒 II 型及 E-B 病毒作用等，本书将有详细介绍。

参 考 文 献

- 1 Pratt-W-B, Taylor P. The Basis of Pharmacology, Third Edition. New York; Churchill Livingstone, 1990. 20~23
- 2 Behling R W, Yamane T, Gavon G, Jelinski L W. Conformation of Acetylcholine Bound to the Nicotinic Acetyl-

choline Receptor. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85, 6721

3 Katzung B G. Basic and Clinical Pharmacology. New York: Appleton-Lange, 1998. 1~4

4 Stoelting R K. Pharmacology and Physiology in Anesthetic Practice. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. 1~17

5 Padfield N L. Total Intravenous Anesthesia. Oxford: Butterworth Heinemann, 2000. 13~35

第 2 章 酶工程原理

2.1 酶研究概况

酶是一种蛋白质，由氨基酸通过肽键连接而成。酶存在于所有的活体细胞中，控制着细胞的代谢过程。细胞通过酶把各种营养物质转变成能量和新的细胞组成材料，维持细胞生命的重要机能。此外，酶还参与从简单化合物合成复杂生命高分子物质的过程。某些能够合成抗菌素的酶最初就是在真菌中筛选到的。

人们对酶的利用起源于 4 千多年前，其主要表现形式是我国劳动人民的酿造活动，象酿酒、造醋等。早在公元前 800 年，希腊作家荷马(Homer)就已经写到酶。世界各地的人民在日常生活的发面、烤面包、蒸馒头、酿酒和制造奶酪的过程中已经广泛熟悉了发酵过程。然而直到 19 世纪，科学家才首次获得实质性发现。在 1833 科学家 Payen 和 Persoz 从麦芽中出制备了一种有酶活的提取物，并命名为淀粉酶。法国的生物化学家和微生物学家巴斯德 (Pasteur) 于 1857 年在研究酒精发酵时提出了“酵素”的概念，应该说这是人们对酶的真正认识的开始。瑞典化学家 Berzelius 最早把酶称作“催化剂”。1876 年 William Kühn 提出酶 (enzyme) 的名词，起源于希腊语，En 表示 in, zyme 的意思是酵母 (yeast)。1926 年科学家詹姆斯 (James Sumner) 证明酶是一蛋白质。1941 年首次出现商业化的工业酶-胰蛋白酶，是从胰脏中提取的。1952 年第一次用发酵工艺生产酶。发酵工艺的使用有助于酶的规模化生产。1974 年开始生产葡萄糖异构酶用于制造果糖糖浆。1985 年首次用基因工程技术生产工业酶。1991 年开始借助于计算机化学研制酶。关于酶的研究持续了整个 20 世纪。第二次世界大战以后，大规模生产酶在技术上已经可行。酶学的迅速发展起始于上个世纪初，一方面大量生物酶被发现和命名，另一方面酶的应用领域逐渐扩大，在制药方面的应用便是其中之一。根据其在制药过程中的用途可分为有治疗作用的药用酶和起催化作用的酶，以及起预处理作用的酶。

与酪蛋白、卵清蛋白、明胶或者大豆蛋白等食用蛋白质不同，酶是能行使催化作

用的物质。这意味着酶仅仅存在，在过程中不被消耗，就能加速化学反应过程。没有酶的存在，这些化学反应过程即使能够进行，也非常缓慢。一个反应循环完成后，酶被释放出来能够参与下一个循环的反应。原则上能够永远持续。但是实际上，绝大部分催化剂的稳定性有限，他们的催化活性迟早会变得低下，以至于不再具有使用的价值。酶特别不稳定，绝大部分酶常常只能使用一次就被丢弃。

实际上，酶是自然的工具，对生物材料进行剪切和粘贴，启动重要的生物过程。酶反应的条件温和，反应的专一性高，反应速度非常快，能够用许多不同作用的酶催化一个复杂的反应过程。工业用酶最初都来源于生物体系。利用可再生资源进行微生物发酵，再提取分离，是一个可持续的发展过程。此外，即使工业大规模进行化学反应，酶的用量也很少。反应条件温和能够使用简单的通用设备，反应条件容易控制，反应进行到一定程度后也更容易终止。酶的使用能够减少化学物质和能源的消耗，以及随后产生的废物排放对环境的冲击。遗传工程和蛋白质工程的发展可以进一步提高工业酶的稳定性、经济性、专一性和总体的应用潜力。

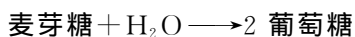
2.2 酶催化反应的特点

总体来说，酶工程制药中，大多数的酶是以粗酶的形式在使用，因而价格相对较低，外加的生产成本也较低。在这些酶制剂中，通常只有1%~30%的酶蛋白，其他是非酶蛋白，稳定剂，缓冲盐等。酶工程制药中所用酶的主要来源包括：动物、植物、微生物、基因重组酶。

酶是球形蛋白质分子的特殊生物催化剂，其催化特性有别于一般的催化剂。在运用酶的过程中，或者是利用整个细胞、或者是细胞组织，或者是离体的酶。一般地说，酶促反应特点可以归纳为：酶促化学反应条件温和、反应高度专一、反应速度非常快、不同的酶针对不同的反应任务。

酶法制药与其他化学制药相比，具有以下优点。

(1) 酶催化化学反应条件温和 作为所有动物、植物和微生物的细胞，只有在一个相当狭窄的温度范围才能最好的存活和行使生物功能。因此，酶催化化学反应的条件非常温和，可以用一个在很多机体中都存在的化学反应为例进行说明。麦芽糖水解为葡萄糖在 pH 为 7.0 的条件下进行。



在没有酶存在的条件下，为了使这个反应能够进行需要对麦芽糖溶液加热，以增加麦芽糖和水分子的内能，并增加他们碰撞速度和反应的机会。加热能够克服一个称之为活化能的障碍，从而引发化学反应。相比之下，在 25 °C 下，麦芽糖酶能降低反