

УДК 577.15.02

## СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ ПРОЦЕССОВ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В.И. Тишков, Е.А. Зайцева

(кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

**Рассмотрены характерные особенности проведения биокаталитических процессов синтеза оптически активных соединений и их современные тенденции развития. Отмечается, что процессы проводятся с участием как минимум двух ферментов, в них широко используются целые клетки рекомбинантных штаммов, экспрессирующих полный набор целевых ферментов.**

Синтез оптически активных соединений является одной из наиболее быстро прогрессирующих областей современной химии. Актуальность данной области связана с тем, что большое количество лекарственных средств содержат в своем составе хиральные центры. Как правило, положительный лечебный эффект обусловлен только одним из оптических изомеров. Присутствие второго изомера может приводить к серьезным побочным эффектам (как это произошло в случае талидомида) или к быстрому привыканию организма (антиастматические препараты на основе агонистов  $\beta_2$ -рецепторов). В связи с этим, начиная с 1999 г., согласно требованиям Администрации за контролем качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (*Food and Drug Administration of the USA*) оптическая чистота лекарственных средств, содержащих хиральный(ые) центр(ы), должна составлять не менее 99%.

Нобелевская премия 2001 г. по химии была присуждена именно за развитие процессов химического синтеза и хиральных соединений. Однако методы “классической” органической химии синтеза таких соединений имеют ряд существенных недостатков, которые не позволяют широко их использовать на практике. В качестве наиболее серьезных недостатков можно отметить следующие:

1) отсутствие высокой энантиселективности (обычно в результате реакции образуется рацемическая смесь, а в большинстве других случаев доля одного из изомеров незначительно превышает содержание второго);

2) отсутствие высокой региоселективности (при наличии в молекуле двух одинаковых по структуре и реакционной способности групп, например двух кетогрупп, в большинстве случаев невозможно добиться селективного преобразования одной из групп без протекания аналогичной реакции на соседней);

3) низкая общая селективность процесса (как правило, в “классической” органической химии возможно протекание сразу нескольких альтернативных реакций; в результате получают побочные продукты, очистка от которых приводит к удорожанию процесса получения целевого соединения);

4) низкие выходы целевого продукта (синтез второго изомера и образование побочных продуктов приводят к тому, что выход требуемого изомера редко превышает 60–70%);

5) проведение процессов в условиях, сильно отличающихся от нормальных (как правило, многие реакции в “классической” органической химии проводятся при повышенных давлениях и температурах и требуют использования органических растворителей).

Все перечисленные факторы при проведении процессов требуют повышенных мер безопасности и дополнительных затрат по очистке и удалению (регенерации) органических растворителей. Недостатки “классической” органической химии могут быть легко устранены применением ферментов в качестве биокатализаторов для получения оптически активных соединений. Ферменты обладают исключительно высокой регио- и энантиселективностью, катализируют реакции без образования побочных продуктов, а сами процессы проводятся в водных растворах при температуре 25–35°C. Целевые продукты получают с выходом более 85–90% (очень часто 95–99%) и имеют оптическую чистоту 99% и более. В результате стоимость очистки составляет очень небольшую часть от общей стоимости процесса.

Все биокаталитические процессы получения хиральных соединений можно разделить на две основные группы. В первую группу входят ферментативные реакции, основанные на селективном химическом изменении одного из оптических изомеров в рацемической смеси. Этот подход является одним из пер-

вых. Он используется тогда, когда получение смеси рацематов с помощью обычного химического синтеза является достаточно дешевым и простым методом по сравнению с методами получения соединений, являющихся исходными при проведении процессов с образованием хирального центра (см. ниже). Химическое превращение одного из рацематов может протекать как с сохранением, так и без сохранения хирального центра. В качестве примера для первого варианта протекания процесса можно привести реакции с участием гидролаз, которые могут специфически катализировать образование или гидролиз сложных эфиров или амидов одного из изомеров. В качестве примера для второго варианта можно привести реакции с участием оксидаз (аминооксидазы, оксидаз D- или L-аминокислот). Очевидно, что при получении требуемого изомера из рацемической смеси максимальный выход не превышает 50%. В случае оксидаз D- или L-аминокислот образующиеся в качестве побочного продукта  $\alpha$ -кетокислоты также являются ценными соединениями, поскольку их получение с помощью классической органической химии представляет собой непростую задачу.

Вторая группа процессов предполагает получение оптически активных соединений из исходных веществ, не содержащих хиральных атомов. Очевидно, что в этом случае максимальная величина выхода требуемого изомера составляет 100%.

Отметим три типа основных реакций, используемых в такого типа процессах.

**I. Восстановление различных групп с помощью дегидрогеназ и оксидоредуктаз.** Дегидрогеназы являются одними из наиболее «стереоселективных» ферментов. Например, широко известная алкогольдегидрогеназа из пекарских дрожжей делает всего одну «стереохимическую» ошибку (синтез второго, нецелевого оптического изомера) на **7 миллиардов** каталитических циклов. Другая дегидрогеназа – лактатдегидрогеназа, хоть и уступает по стереоселективности алкогольдегидрогеназе (одна «стереохимическая» ошибка на **7 миллионов** каталитических циклов), однако все равно позволяет получать препараты, которые по своей оптической чистоте на несколько порядков выше, чем существующая в настоящее время норма в 99%.

Недостатком реакций с участием дегидрогеназ и редуктаз является необходимость использования восстановленной формы кофермента никотинамидадениндинуклеотида или никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADH и NADPH соответственно). Эти соеди-

нения очень дороги. Себестоимость получения одного килограмма NADH и NADPH составляет около 5 000 и 100 000 долларов США. Поэтому для снижения себестоимости в систему вводят второй фермент, который катализирует восстановление образующегося в основной реакции окисленной формы кофермента  $\text{NAD(P)}^+$  обратно в NADH и NADPH. Ферменты, используемые для регенерации  $\text{NAD(P)H}$ , должны иметь широкий pH-оптимум активности, использовать дешевые субстраты, а катализируемые ими реакции должны быть необратимыми, что позволяет осуществлять «термодинамическое» давление на равновесие основной реакции и проводить конверсию в целевом процессе на 100%. Кроме того, субстрат и продукт второй реакции не должны ингибировать основной фермент и легко удаляться при очистке конечного целевого продукта. В принципе вторую реакцию может катализировать и основной фермент (например, алкогольдегидрогеназа с изпропаноглом), однако после многочисленных экспериментов было показано, что более целесообразно использовать второй, «специализированный» фермент. Наилучшие результаты показали два фермента, получившие широкое распространение, – формиатдегидрогеназа и глюкозодегидрогеназа. Первый фермент превосходит глюкозодегидрогеназу почти по всем параметрам. Особенно отметим, что «энергетическая» емкость формиата в несколько раз выше таковой для глюкозы, а продукт окисления формиата ( $\text{CO}_2$ ) легко удаляется из реакционной смеси, в то время как очистка от продукта окисления глюкозы требует дополнительных усилий. Недостатком формиатдегидрогеназы является более низкая удельная активность по сравнению с глюкозодегидрогеназой (примерно в 10 раз). Однако каждый из этих ферментов нашел свое собственное применение.

Среди процессов второй группы реакции, катализируемые дегидрогеназами и редуктазами, наиболее широко используются для синтеза оптически активных соединений. В настоящее время эффективность регенерации  $\text{NAD(P)H}$  достигает одного миллиона циклов, в результате чего стоимость использования кофермента в общей себестоимости получения целевого продукта составляет менее 1–2%. Основной проблемой является стабильность коферментов (особенно  $\text{NADP}^+$  и NADPH) в ходе реакции. Для компенсации убыли коферментов за счет деградации приходится вводить дополнительные порции свежего кофермента. Фирмой «Дегусса» в середине 90-х годов был реализован процесс получения *tert*-L-лей-

цина с помощью лейциндегидрогеназы в качестве основного фермента и формиатдегидрогеназы в качестве фермента для регенерации NADH. Реакция проводится в каскаде из двух проточных мембранных реакторов, а для удержания коферментов в зоне реакторов используется NAD<sup>+</sup>, иммобилизованный на полиэтиленгликоле. До сих пор этот процесс является самым крупнотоннажным процессом хирального синтеза (десятки тысяч тонн в год) с использованием ферментов.

**II. Окислительные реакции.** Эти реакции катализируются различными гидроксилазами (например, цитохромами P450) и монооксигеназами. Реакции стереохимического окислительного гидроксирования широко распространены в природе. Именно с помощью таких реакций получают различные стероиды. Цикломонооксигеназы катализируют реакцию увеличения размера цикла на один атом за счет встраивания в него кислорода. В органической химии эта реакция известна как реакция Байера–Виллигера. В 2006 г. было отпраздновано 100-летие с дня ее открытия. Процессы с участием гидроксилаз и оксигеназ также требуют восстановленного кофермента NAD(P)H и к ним в полной мере относится все то, что было сказано выше по поводу регенерации коферментов. Реакции с участием ферментов этой группы, как правило (более 98% случаев), в качестве кофермента требуют использования NADPH.

Природные формиатдегидрогеназы отличаются высокой специфичностью к NAD<sup>+</sup> и очень низкой (или отсутствием вообще) активностью с NADP<sup>+</sup>. В связи с этим процессы с участием гидроксилаз и монооксигеназ не получили должного развития по сравнению с NAD<sup>+</sup>-специфичными дегидрогеназами и редуктазами. И лишь создание мутантной NADP<sup>+</sup>-специфичной формиатдегидрогеназы из бактерий *Pseudomonas* sp.101 позволило начать активные работы в этой области.

**III. Стереохимическая конденсация цианид-иона с кетонами и альдегидами.** Реакция катализируется специальными ферментами нитрилазами. Она получила распространение совсем недавно, однако в силу простоты протекания (при наличии фермента с требуемой субстратной и стереоспецифичностью) и отсутствия необходимости использования других субстратов ей уделяется большое внимание.

Характеризуя современные тенденции в развитии процессов биокаталитического получения оптически активных соединений, можно отметить следующее:

1. Проводится поиск новых биокатализаторов, совершенствование их каталитических свойств и стабильности. Высокая субстратная, регио- и стереоспецифичность ферментов в какой-то мере является и их недостатком, поскольку такой высокоспецифичный биокатализатор для одного процесса нельзя использовать для другого. В настоящее время для поиска новых ферментов широко используются методы генетической инженерии и биоинформатики. Секвенирование большого количества геномов и развитие биоинформационных подходов по аннотации новых ферментов позволяет исследователям целенаправленно (можно сказать “на кончике пера”) искать в известных геномах ферменты с заданной каталитической активностью. Еще большее разнообразие представляют геномы организмов, имеющих в природе, особенно некультивируемых микроорганизмов из глубоководных морских источников, вулканов, соленых озер и т.д. В этом случае используются подходы метагеномного скрининга, которые не требуют выделения “чистых” культур. В качестве источников используются как пробы морской воды в Арктике и Антарктике (так была открыта широко известная липаза из *Candida antarctica*), так и из рубца коровы или кишечника простых червей.

Следующим этапом является “доводка” каталитических свойств и стабильности найденного фермента. Для этого широко используются методы направленного (*rational design*) и неупорядоченного (“направленная” эволюция, “экспериментальная” эволюция, “геномная мозаика” и т.д.) поиска. Для получения уже готовых биокатализаторов используют специально сконструированные рекомбинантные высокопродуктивные штаммы.

2. Реализуется комплексный подход, основанный на применении нескольких ферментов. Как уже отмечалось выше, выход целевого оптического изомера и рацемической смеси не может быть больше 50%. При крупнотоннажном производстве (десятки тонн и выше) такое количество отходов неминуемо потребует разработки специальных процессов по их утилизации, что скажется на общей себестоимости продукта. Более целесообразно было бы разработать дополнительные процессы не по утилизации, а по переработке отходов в целевой продукт. Реализуются два подхода. Если целевым соединением является продукт ферментативной реакции, то оставшийся оптический изомер обрабатывают специальным ферментом рацемазой и из полученной рацемической смеси по основной реакции получают нуж-

ный продукт. Если ненужный изомер удаляется из рацемической смеси, то с помощью второй ферментативной реакции можно его конвертировать в целевой продукт.

3. В качестве биокатализаторов используют целые, а не отдельные клетки. Получение и очистка фермента являются довольно дорогими процессами. Поэтому в последнее десятилетие все более широко стали использовать в качестве биокатализаторов целые клетки рекомбинантных штаммов – продуцентов нужных ферментов. В этом случае отсутствие стадий очистки фермента позволяет снизить стоимость процесса. При использовании для биотрансформации дегидрогеназ, редуктаз, гидроксилаз и оксигеназ нет необходимости вводить в реакционную среду коферменты. В этом случае достаточно тех количеств, которые имеются в клетке. Кроме того, биосинтез коферментов самой клеткой позволяет компенсировать их убыль за счет деградации. В случае использования целых клеток для регенерации NADH и особенно NADPH широко используется глюкозодегидрогеназа, поскольку продукт окисления глюкозы используется далее клеткой для поддержания своей жизнедеятельности. Формиатдегидрогеназа также широко используется для регенерации NADH в клетках, поскольку в этом случае имеется дополнительная независимая от существующих метаболических путей реакция получения NADH, который используется как в процессе биотрансформации, так и в процессе жизнедеятельности клетки без участия дополнительных метаболитов.

Использование рекомбинантных штаммов – продуцентов биокатализаторов – имеет дополнительное преимущество по сравнению с исходными природными штаммами. В этом случае в одной клетке можно

экспрессировать сразу весь необходимый набор ферментов в заданной пропорции. В рекомбинантных штаммах с помощью методов генетической инженерии можно выключить “лишние” метаболические ферменты, в результате чего промежуточные метаболиты целенаправленно используются только для синтеза необходимого продукта, предотвращается образование побочных продуктов и неспецифическая утилизация нужного соединения. В качестве примера можно привести использование штаммов рода *Rhodococcus* для получения акриламида из акрилонитрила. Конечный продукт представляет собой 40%-й водный раствор акриламида, который при минимальной очистке (а в довольно большом количестве случае и без) может быть использован по прямому назначению.

Для рекомбинантных штаммов (продуцентов) также разработаны процессы получения культур высокой плотности (*high density culture*) с выходом до 70–100 г сырых клеток с литра среды, что недостижимо для природных штаммов. Для культивирования рекомбинантных штаммов используются дешевые синтетические среды, что позволяет с высокой воспроизводимостью достигать высоких выходов клеток. В случае природных штаммов вариации в компонентах питательных сред приводят к дополнительным затратам по оптимизации процесса культивирования при смене поставщика этих компонентов. Себестоимость получения биокатализаторов на основе рекомбинантных штаммов как минимум на один-два порядка ниже по сравнению с природными штаммами. В результате отпадает необходимость в многократном использовании биокатализатора. Именно по такому пути сейчас идут большинство компаний (“*Degussa*”, “*DSM*”, “*Dow Chemicals*” и др.).

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 05-04-49073а).

## MODERN TRENDS IN BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF CHIRAL COMPOUNDS

V.I. Tishkov, E.A. Zaitseva

(Division of Chemical Enzymology)

**Characteristic features and modern trends in biocatalytic synthesis of chiral compounds have been discussed. New processes of biocatalytic synthesis of optically active compounds use at least two enzymes. Whole cells of recombinant strains are utilized as biocatalysts and full set of enzymes can be expressed in single cell.**