

文章编号: 1001-3555 (2007) 02-0168-04

酶促合成 2', 3'-双脱氧双脱氢-5-氟胞嘧啶核苷的研究

戚娜, 傅绍军, 朱利民¹⁾

(东华大学 生物科学与技术研究所, 上海 200051)

摘要: 从瑞士乳酸杆菌 *Lactobacillus helveticus* (ATCC8018) 中提取了 N-脱氧核苷转移酶进行催化合成抗病毒药物 2', 3'-双脱氧双脱氢-5-氟胞嘧啶核苷 (D-D4FC) 的反应. 考察了反应时间、反应液的 pH 值、缓冲液以及反应底物浓度对反应产率的影响.

关键词: N-脱氧核苷转移酶; 2', 3'-不饱和-5-氟胞嘧啶核苷; D-D4FC

中图分类号: O643.32

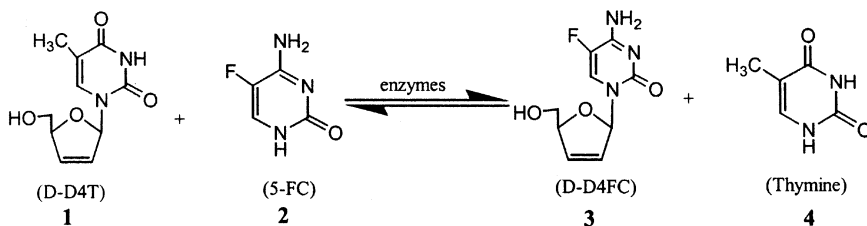
文献标识码: A

β -D-2', 3'-双脱氧双脱氢-5-氟胞嘧啶核苷 (D-D4FC) 3 是第二代对人体线粒体没有毒副作用的核苷类似物^[1]. 据报道, 它能抑制对 AZT, DDC, DDI, D4T 和 3TC 有抗药性的 HIV-1 型病毒, 同时, 对 HBV 也有很强的抑制作用^[2]. 该药已经在美国、德国和法国开始二期临床试验.

到目前为止, D-D4FC 仅有化学合成法的报道^[3-8]. 化学合成路线的收率比较低, 摩尔总收率都在 10% 左右; 化学合成的条件比较苛刻, 需在低温下操作, 工业化难度比较大; 在化学合成的过程

中需要用不可回收的重金属催化剂, 不仅对工人的身体有毒害, 而且对环境也很不友好, 不符合现在倡导的绿色友好化学主题. 利用生物酶催化合成的方法将是今后发展的趋势. 因此, 我们希望能找到一条用生物酶催化合成 3 的途径.

在我们的实验中, 我们应用从瑞士乳酸杆菌 *Lactobacillus helveticus* (ATCC8018) 中提取的 N-脱氧核苷转移酶^[9], 进行催化碱基交换反应, 其反应如图示 1 所示.



Scheme 1

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

试剂: β -D-2', 3'-双脱氧双脱氢胸腺嘧啶核苷 (D-D4T) 1, 99%, 浙江康裕药业有限公司; 5-氟胞嘧啶 (5-FC) 2, 99%, 南通海斯特药业有限公司.

仪器: Waters 5110 型高效液相色谱仪, LGJ-10 型冷冻干燥仪 (北京松源华兴科技发展有限公司), LC-MS (岛津 QP-2010), AV400 核磁共振波谱仪

(布鲁克).

1.2 脱氧核糖转移酶的制备与酶活测定

1.2.1 脱氧核糖转移酶的制备 鉴于许多科研工作中瑞士乳酸杆菌 *Lactobacillus helveticus* (ATCC8018) 优秀的催化性能, 我们选取此菌种作为我们的产酶菌.

菌种 ATCC 8018 以 Cardinaud R. 论文中报道的培养基^[9], 于 250 mL 锥形瓶中, 40 °C, 120 rpm 空气摇床培养 40 h. 发酵液在 4 °C 下离心 (20 000 g,

收稿日期: 2006-02-22; 修回日期: 2006-05-30.

基金项目: 上海市科委浦江人才计划资助项目 (05PJ14014).

作者简介: 戚娜, 女, 1982 年生, 硕士研究生.

1) 通讯联系人, E-mail: lzhu@dhru.edu.cn.

15 min), 以 pH = 5.9 的 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液洗涤菌体后, 离心收集. 收集的湿菌体用液氮速冻, 融化, 研磨, 再重复进行速冻融化, 并研磨至呈糊状后, 以 1: 3(1g 湿菌种: 3 mL pH = 6.0 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液) 的比例将糊状物悬浮于磷酸缓冲液中, 4 ℃ 下离心(16 000 g, 30 min), 取上层清液即为粗制的脱氧核糖转移酶.

1.2.2 脱氧核糖转移酶的酶活测定 在 3 mL 石英比色皿中加入 1 mL 0.3 mol/L pH = 6.0 的磷酸缓冲液, 0.4 mL 水, 0.5 mL 1 mmol 脱氧肌苷, 0.1 mL 1 mg/mL 的黄嘌呤氧化酶. 2 min 后, 加入 0.5 mL 1 mmol 腺嘌呤及 0.5 mL 脱氧核糖转移酶, 在 290 nm 波长下测定吸光度变化.

酶活定义: 一个酶活单位是在上述条件下, 每分钟生成 1 μmol 次黄嘌呤所需的酶量, 即每分钟变化 4.07 个吸光度单位所需的酶量^[9].

按以上条件, *Lactobacillus helveticus* (ATCC8018) 发酵 40 h 后收集菌体并破碎得到粗制的脱氧核糖转移酶, 测定其酶活可达到 0.9 U/mL.

1.3 D-D4FC 的酶法催化合成

取 112 mg (50 mmol) 底物 **1**, 124 mg (100 mmol) 底物 **2**, 10 mL (pH 6.4) 缓冲液, 4 mL 自制的脱氧核糖转移酶液于 50 mL 的锥形瓶中, 在 40 ℃ 恒温水浴中以 150 rpm 振荡反应 24 h. 之后, 在沸水中煮沸 5 min 以终止反应. 反应液被冷冻干燥, 残留物用 20 mL 甲醇萃取, 减压浓缩得固体混合物. 固体混合物经过硅胶层析柱(10% CH₃OH/CH₂Cl₂, v/v) 纯化, 得 27.5 mg (24.12%) 目标产物 **3**.

1.4 分析方法与分析结果

1.4.1 薄层层析色谱法分析(TLC) 反应过程中定性分析采用 TLC 法. 以活化硅胶 G 板为载体, 二氯甲烷-甲醇-水 (8: 2: 0.25 v/v) 为展开剂, 紫外显色. **1**、**3**、**2** 及胸腺嘧啶 **4** 的 R_f 参考值分别为 0.82、0.61、0.29 及 0.05.

1.4.2 高效液相色谱法分析 1.4.2.1 紫外吸收波长的选择 用紫外分光光度计对甲醇, **1**, **3**, **4**, **2** 进行了波长定性扫描, 从扫描结果得知, 甲醇的截止波长是 205 nm, 而化合物 **1**, **3**, **4**, **2** 最大吸收波长分别为 266 nm, 280 nm, 260 nm, 239 nm; 所以, 本实验采用 270 nm 作为实验的检测波长.

1.4.2.2 HPLC 分析的适宜条件 以 HPLC 分析反应, 得到最佳检测条件如表 1. 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱, Φ4.6 × 150 mm, 以 15% ~ 35% 甲醇/水为

表 1 HPLC 的最佳检测条件	
Table 1 Optimum detecting conditions of HPLC	
Separation conditions	Optimized conditions
Column	C ₁₈
Packing size	5 μm
Mobile phase	15% ~ 30% MeOH/H ₂ O
Elution rate	0.9 mL/min
Temperature	20 ℃
Determinating wavelength	270 nm

流动相进行梯度洗脱, 在 270 nm 波长下检测, 并优化检测条件. 我们发现选用最佳流动相甲醇/水时, 流速和柱温的变化对分离度和峰形几乎没有影响, 只是随着柱温和流速的增大, 保留时间减少, 从而缩短了分析时间.

1.4.2.3 HPLC 谱图分析 以反应的甲醇萃取液进行 HPLC 检测, 在上述最优条件下, 得到图 1: **3**、**2**、**1** 及 **4** 的 tR 参考值分别为 5.19 min、3.85 min、

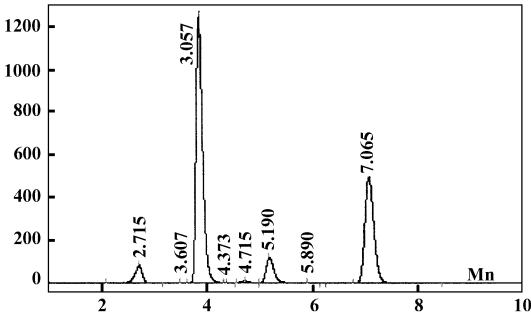


图 1 反应产物的 HPLC 检测图谱
Fig. 1 Elution profile of the HPLC determination of the reaction products

7.06 min 及 2.71 min. 反应产率如下计算得到: 反应产率 = 产物 **3** 峰面积 / (产物 **3** 峰面积 + 原料 **1** 峰面积).

1.4.3 ¹H NMR, ¹⁹F NMR 和 MS 谱图分析数据如下
¹H NMR (DMSO-d₆): δ8.04 (d, J = 7.6Hz, 1H, H-6), 7.77 (bs, 1H, NH), 7.64 (bs, 1H, NH), 6.82 (bs, 1H, H-1'), 6.39 (d, J = 7.6Hz, 1H, H-3'), 5.83 (d, J = 6.0Hz, 1H, H-2'), 5.11 (t, J = 6.0Hz, 1H, OH), 4.77 (bs, 1H, H-4'), 3.41-3.59 (m, 2H, H-5'). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆): δ171.36. ESI mass calcd for C₉H₁₁FN₃O₃ (M + H⁺): 228.0784, found: 228.08.

2 实验结果与讨论

2.1 反应时间与反应温度对反应平衡转化率的影响 反应温度对酶催化反应速度的影响很大. 在一

定的温度范围内, 温度升高, 反应速度加快, 但是, 当温度超过一定范围, 使得酶蛋白发生变性, 反应速度会下降. Carson 等的研究表明, 该酶在催化合成脱氧核糖核苷的反应中, 在 50 ℃ 时的反应速率比在 40 ℃ 时的快 40%. 但是, 在 50 ℃ 时, 该酶只能稳定 2 h, 而在 40 ℃ 时, 该酶至少可在 48 h 内保持酶活, 因而, 反应的平衡转化率在 50 ℃ 比 40 ℃ 低 50% 左右^[9,10]. 为此, 我们的反应温度选择为 40 ℃.

反应时间对 **3** 的产率影响如图 2 所示, 反应在 24 h 后基本达到平衡.

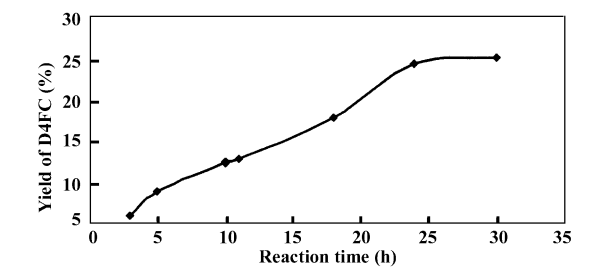


图 2 反应时间对产率的影响

Fig. 2 Effect of reaction time on the yield of D4FC

* Reaction conditions: 100 mmol donor and 50 mmol acceptor were incubated, stirring in citrate buffer (0.25 mmol, pH 6.4)

2.2 不同的缓冲液对反应转化率的影响

在脱氧核糖的转移催化中, 缓冲液的类型对酶的催化效率有很大的影响. 我们比较了在柠檬酸缓冲液和磷酸盐缓冲液里的反应转化率(表 2), 在表 2 不同缓冲液对反应转化率的影响比较

Table 2 Comparison of synthesis of D4FC with different buffers

Buffer	Molar yield of reaction at			
	4 h(%)	10 h(%)	24 h(%)	30 h(%)
Citrate buffer	7.4	12.4	24.32	25.12
Phosphate buffer	3.65	9.1	24.57	25.40

* Reaction conditions: 100 mmol donor and 50 mmol acceptor were incubated with NdRT, stirring at 40 ℃ in potassium phosphate buffer (50 mmol, pH 6.4) or citrate buffer (0.25 mmol, pH 6.4). Results were expressed as the molar yield of transferglycosyl from D4T to 5-FC

种缓冲液中, 当反应达到平衡时, 其转化率基本上没有大的差异; 但是, 在柠檬酸缓冲液的初始反应转化率比在磷酸盐缓冲液中要快一倍左右. 其原因可能是由于溶液的离子强度的不同引起酶的微环境不同, 从而影响了酶的活性场.

2.3 不同的底物初始浓度对反应转化率的影响

在酶催化合成反应中, 一般采用尽可能高的底物浓度, 以推动反应向合成方向进行, 但是底物浓度过高, 往往会对酶产生抑制作用. 在保证两底物浓度比(2: 1)不变的前提下, 考察了底物浓度的变化对 D-D4FC 产率的影响. 如表 3 所示, 当底物浓

表 3 不同的底物初始浓度对反应转化率的影响

Table 3. Effect of the initial concentrations of substrate

Buffer	Substrate (mM)		Product (%)
	5-FC	D4T	D4FC
Phosphate buffer	33.4	16.7	16.75
	50	25	24.32
	100	50	24.48
Citrate buffer	50	25	24.30
	100	50	24.57

* Reaction conditions: Donor and acceptor were incubated for 24 h, stirring in potassium phosphate buffer (50 mmol, pH 6.4) or citrate buffer (0.25 mmol, pH 6.4). Results were expressed as the molar yield of D4FC after 24 h of reaction

度较低时, 底物浓度增加, 反应产率增加; 当底物浓度增加到一定值时, 底物浓度对产率的影响就变得不明显.

2.4 水溶液的不同 pH 值对反应平衡转化率的影响

酶是两性化合物, 分子中存在着许多羧基和氨基等酸性和碱性基团, pH 值的改变会影响他们的电离状态, 从而改变酶的空间构象, 造成酶活性的变化. 对可逆反应而言, 水相 H⁺ 离子浓度会影响反应的平衡常数, 从而影响最终产率. 该酶的酶学性质显示, 该酶在 pH 值为 6.5 时最稳定, 在 pH 值为 5.8 时, 有最佳酶活^[11], 图 3 示出了我们对酶在

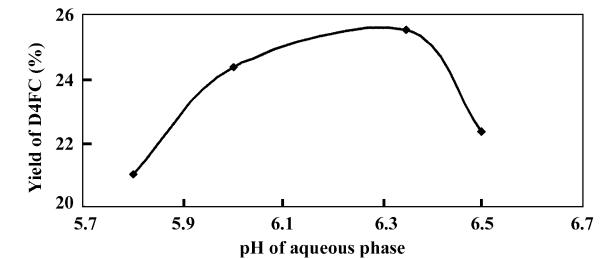


图 3 不同 pH 值对反应平衡转化率的影响

Fig. 3 Effect of pH on the yield of D4FC

* Reaction conditions: 100 mmol donor and 50 mmol acceptor were incubated with NdRT, stirring at 40 ℃ in the presence of potassium phosphate buffer (50 mmol). Results were expressed as the molar yield of transferglycosyl from D4T to 5-FC

pH 值 5.8 ~ 6.7 之间的水溶液中的最佳反应活性的考察. 实验结果说明在水相中脱氧核糖转移酶的最佳反应 pH 值在 6.4.

3 结 论

我们研究了水相体系中以 5-FC 和 D-D4T 为底物, 用 N-脱氧核糖转移酶催化合成抗 HIV-1 和 HBV 新药 D-D4FC 的反应. 确定了该酶促反应体系的最优反应条件: 反应底物的初始浓度为 5-FC 100 mmol, D4T 50 mmol; 反应在 30 mL 柠檬酸缓冲液或磷酸盐缓冲液 (pH = 6.4) 中进行; 反应时间为 24 h. 同时对 D-D4FC 的分析条件进行了探索: TLC 检测以二氯甲烷-甲醇-水 (8: 2: 0.25 v/v) 为展开剂, 紫外显色, D-D4FC 的 R_f 值为 0.61; HPLC 检测 (色谱柱 Diamonsil C₁₈) 以 15 ~ 35% 甲醇/水为流动相梯度洗脱, 在 270 nm 波长下检测, D-D4FC 的参考 t_R 值为 5.19 min; 并且我们也得到了 D-D4FC 的 ¹H NMR, ¹⁹F NMR 和 MS 谱图, 确定了谱图中各个峰的归属.

虽然, 我们的实验得到了 25% 左右的产率, 较其它合成方法约 10% 的产率有了很大的提高, 但是我们仍然期望在此基础上进一步提高 D-D4FC 的产率. 为此, 我们设想在原来的反应体系中, 加入一种协同酶, 使反应中产生的胸腺嘧啶 **4** 可以在生成后立即转化, 从而促使整个反应不断向合成目标方向进行, 以提高反应转化率. 目前, 此工作还在进

一步研究中.

参考文献:

- [1] Schinazi R, Ma L, Shi J, *et al.* 12th world AIDS conf [C], 1998, 174
- [2] Hammond J, Schinazi R, Schlueter-Wirtz S, *et al.* 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections [C], 1999, 180
- [3] Beach W B, Kim H O, Jeong L K, *et al.* *J. Org. Chem.* [J], 1992, **57**(14): 3 887 ~ 3 897
- [4] Shi J X, Jeffrey M, Wirtz S S, *et al.* *J. Med. Chem.* [J], 1999, **42**(5): 859 ~ 867
- [5] Chen S H, Lin S, King I, *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* [J], 1998, **8**(22): 3 245 ~ 3 250
- [6] Schinazi R F, Liotta D C. [5-carboxamide or 5-fluoro]-[2', 3'-unsaturated or 3'-modified]-pyrimidine nucleosides[P]. US, WO: 9622778. 1996
- [7] Lin T S, Yang J H, Gao Y S. *Nucleosides & Nucleotides* [J], 1990, **9**(1): 97 ~ 108
- [8] Chu C K. Method for the preparation of 2', 3'-dideoxy and 2', 3'-dideoxydide-hydro nucleosides[P]. USP: 5455339. 1995
- [9] Cardinaud R. *Meth. Enzymol.* [J], 1978, **51**: 446 ~ 455
- [10] Carson D A, Wasson D B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [J], 1988, **155**(2): 829 ~ 834
- [11] Allan H R, Robert F B. *J. Biol. Chem.* [J], 1958, **233**(2): 261 ~ 266

Enzymatic Synthesis of β -D-2', 3'-unsaturated-5-fluorocytidine

QI Na, FU Shao-jun, ZHU Li-min¹⁾

(Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 200051, China)

Abstract: Catalytic synthesis of anti-virus drug (β -D-2', 3'-didehydro-2', 3'-dideoxy-5-fluorocytidine (D-D4FC) carried out by N-deoxyribosyltransferase made from *Lactobacillus helveticus*. The effects of reaction time, pH value, different buffers, substrate concentration on the production of D-D4FC were investigated.

Key words: N-deoxyribosyl transferase; 2', 3'-unsaturated-5-fluorocytidine; D-D4FC