

• 综 述 •

疾病治疗及药物制备用酶的研究进展

周蕊, 刘欣, 曾波, 江伟, 张光亚

华侨大学 化工学院 生物工程与技术系, 福建 厦门 361021

周蕊, 刘欣, 曾波, 等. 疾病治疗及药物制备用酶的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(7): 2256-2271.

Zhou R, Liu X, Zeng B, et al. Advances of enzymes in the applications of disease treatment and drug preparation. Chin J Biotech, 2021, 37(7): 2256-2271.

摘 要: 生物技术的发展及对疾病机理的深入研究, 使酶逐步应用于疾病治疗。与此同时, 以酶作为催化剂制备非天然有机化合物具有反应条件温和、催化效率高、特异性高、选择性强、副反应少等优点。因而, 酶也在药物制造方面展现了巨大潜力。此外, 基因工程、酶化学修饰和固定化技术的应用进一步改善了酶的功能。基于此, 文中结合本课题组的相关研究, 综述了近年来酶作为药物用于疾病治疗及作为催化剂用于药物制造的研究进展, 并对其存在的问题提出了相应的解决办法, 最后对酶在医药领域的应用前景进行了展望。

关键词: 生物催化, 药物酶法制备, 新型治疗酶, 医药用酶

Advances of enzymes in the applications of disease treatment and drug preparation

Rui Zhou, Xin Liu, Bo Zeng, Wei Jiang, and Guangya Zhang

Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, Fujian, China

Abstract: The development of biotechnology and the in-depth research on disease mechanisms have led to increased application of enzymes in the treatment of diseases. In addition, enzymes have shown great potential in drug manufacturing, particularly in production of non-natural organic compounds, due to the advantages of mild reaction conditions, high catalytic efficiency, high specificity, high selectivity and few side reactions. Moreover, the application of genetic engineering, chemical modification of enzymes and immobilization technologies have further improved the function of enzymes. This review summarized the advances of using enzymes as drugs for disease treatment or as catalysts for drug manufacturing, followed by discussing challenges, potential solutions and future perspectives on the application of enzymes in the medical and pharmaceutical field.

Keywords: biocatalysis, enzymatic synthesis of drugs, new therapeutic enzymes, pharmaceutical enzymes

Received: July 23, 2020; **Accepted:** September 29, 2020

Supported by: China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (No. DY135-B2-07), Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2017J01065).

Corresponding author: Guangya Zhang. Tel/Fax: +86-592-6162300; E-mail: zhgyghh@hqu.edu.cn

大洋“十三五”“深海生物资源计划”项目 (No. DY-135-B2-07), 福建省自然科学基金 (No. 2017J01065) 资助。

网络出版时间: 2020-10-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201021.1101.006.html>

酶作为生物催化剂,在代谢过程中发挥重要作用。近年来,生物技术的发展及对疾病机理的深入研究,使酶类逐步应用于疾病治疗中。酶制剂主要用于癌症治疗,如 L-天冬酰胺酶、精氨酸酶、精氨酸脱亚胺酶等;用于血栓治疗,如尿激酶、链激酶和组织型纤溶酶原激活剂等;用于消化助剂,如乳糖酶、 α -半乳糖苷酶、胰酶等;用于治疗与生物被膜 (Biofilm, BF) 相关的口腔疾病,如唾液过氧化物酶、葡聚糖酶、虾酶等^[1];其他治疗疾病的酶,如苯丙氨酸解氨酶用于治疗苯丙酮尿症 (Phenylketonuria, PKU)^[2],腺苷脱氨酶用于治疗重症联合免疫缺陷病 (Severe combined immunodeficiency, SCID),胶原蛋白酶用于烧伤、清创术等^[3]。此外,酶与药物联合用于疾病治疗也得到了快速的发展。

另一方面,利用酶催化合成非天然有机化合物具有反应条件温和、催化效率及特异性高、选择性强、副反应少等优点。因此,酶也广泛用于不对称合成,酶法拆分制备手性药物/单一对映体功能药物/药物中间体,如:醛酮还原酶制备他汀类、抗抑郁症等多种药物的关键手性中间体;环氧化物水解酶制备阿托伐他汀侧链、 β -肾上腺素阻断药物阿替洛尔、麻醉剂巴氯芬等药物的关键中间体^[4]。

本文结合笔者课题组的相关研究,较详细地列举了酶作为药物治疗疾病及作为催化剂用于药物制备的例子,并对其存在的问题提出了相应的解决办法,最后对酶在医药领域的前景进行了展望,以期从事相关领域的研究者提供参考。

1 用于疾病治疗的酶

1.1 符合疾病治疗用酶的原则与标准

疾病治疗用酶一般需要符合以下原则:(1)在人体内具有较高的活性和稳定性;(2)对底物亲和力和力较高;(3)在人体内半衰期较长;(4)酶制剂应来自非致病性酶源且纯度较高;(5)酶促反应

不可逆、反应产物无毒且能被人体分解;(6)免疫原性较低且副作用较少等^[5-6]。同时不同酶制剂的生产和使用标准不尽一致,每种酶制剂都需要严格遵循国家标准的具体要求。

1.2 已在临床应用的酶

酶在促进新陈代谢和维持体内化学反应方面起着重要作用。随着生物技术的发展和对疾病机理的深入研究,酶类药物成为生物药物的重要组成部分。截至目前,已有一百种以上的酶类药物广泛用于临床,中国药典收藏了 15 种酶类药物,有 20 多个规格^[7]。酶制剂可应用于抗肿瘤、心血管疾病、消化系统、炎症治疗等方面。表 1 总结了部分用于疾病治疗的酶,其中部分尚未投入市场。

1.2.1 L-天冬酰胺酶

L-天冬酰胺酶 (L-asparaginase, EC 3.5.1.1) 是一种酰胺水解酶,催化 L-天冬酰胺降解为 L-天冬氨酸和氨。健康细胞和肿瘤细胞都需要 L-天冬酰胺,以满足代谢需要。健康细胞利用天冬酰胺合成酶以生成 L-天冬酰胺;肿瘤细胞由于缺乏 L-天冬酰胺合成酶,只能靠 L-天冬酰胺的外源供应以维持其生长繁殖。L-天冬酰胺酶通过水解 L-天冬酰胺形成天冬氨酸和氨,消耗循环中的 L-天冬酰胺,使癌细胞饥饿并最终死亡。近 20 年的临床数据表明,L-天冬酰胺酶是急性淋巴细胞白血病 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) 治疗方案中的重要组成部分^[8],它还可用于治疗急性粒细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、霍奇金病、结肠肉瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌和牛淋巴瘤等^[9]。

L-天冬酰胺酶广泛分布于动物、植物和微生物 (细菌、真菌、藻类) 中,但在人体中不存在^[10]。根据其细胞定位、底物特异性和四级结构,细菌 L-天冬酰胺酶可以分为两种类型,两种类型酶均对 L-天冬酰胺和 L-谷氨酰胺有活性。I 型 L-天冬酰胺酶是一种定位于细胞质中的组成型表达酶,底

表 1 部分用于疾病治疗的酶

Table 1 Some enzymes used for disease treatment

Therapeutic enzymes	Diseases treated	Treatment mechanism	References
Therapeutic enzymes with clear clinical efficacy			
L-asparaginase	ALL and other tumor diseases	Amino acid depletion therapy: deprivation of amino acids of tumor cells growth and metabolism need	[8-10,15]
Arginase and arginine deiminase	HCC and malignant melanoma		
Methionine γ -lyase	Melanoma; prostate cancer; liver cancer		
Urokinase; streptokinase; tissue plasminogen activator	Thrombotic diseases	Activating PLG to convert into PL and then decompose fibrin or fibrinogen	[18-20]
Urokinase-type plasminogen activator	Thrombotic diseases; Pulmonary embolism; acute myocardial infarction; eye clots		
Lactase	Relieve symptoms of lactose intolerance	Hydrolyzing lactose into galactose and glucose	[21]
α -galactosidase enzyme	Relieve gastrointestinal discomfort and promote the absorption of nutrients	Catalyzing the hydrolysis of α -galactoside bonds of anti-nutritional factors α -galactoside	[23]
Pancreatic enzymes	Exocrine pancreatic insufficiency; indigestion	Pancreatic enzyme replacement therapy	[24]
Lipase	Gastrointestinal diseases	Catalyzing the hydrolysis of triacylglycerol and phospholipids	[2]
Phenylalanine ammonia lyase	PKU	Reducing the concentration of Phe in the blood by converting Phe into non-toxic products: trans-cinnamic acid and ammonia	
Adenosine aminohydrolase	SCID	Hydrolyzing cell purine metabolites (adenosine) to reduce its concentration	[29]
Collagenase	Wound debridement; skin ulcers	Removing the necrotic tissue by hydrolyzing the collagen fibers between the necrotic tissue	[3,32]
	Dupuytren's contracture	Dissolving the collagen deposited in the palm	
	LDH	Reducing the protrusions by hydrolyzing the collagen molecules in the disc or around the protrusions	
Serratiopeptidase	Anti-inflammatory; anti-atherosclerosis; enhance the role of antibiotics	Inhibiting the release of pain-inducing amines, such as bradykinin, from inflamed tissue and inducing intense fibrinolytic	[33]
Krill enzymes; papain	Biofilm-related oral diseases	Disrupting bacterial adhesion to oral surfaces or affect cell-cell interactions	[1]
Therapeutic enzymes with clinical potential			
Salivary peroxidases; lysozyme; lactoferrin; bacteriophage lyase	Biofilm-related oral diseases	Limiting bacterial growth	[1,34]
Dextranase; mutanase		Degrading important carbohydrate components of the biofilm matrix	[35-37]
Antioxidases	MS and other nervous system diseases; tumor; COVID-19	Protecting blood-brain barrier integrity and reduce transendothelial migration of leukocytes; inhibiting myelin damage and phagocytosis; preventing ROS-induced oligodendrocyte and axonal damage; regulating the production of cytokines; protecting against oxidative damage and inhibiting the replication of SARS-CoV-2	

(待续)

(续表 1)

Therapeutic enzymes	Diseases treated	Treatment mechanism	References
β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1	Prevent AD	Inhibiting the formation of A β	[38]
Acid sphingomyelinase inhibitors	AD; PD; major depression	Reducing ASM in neurons , improving the autophagy process, reducing the accumulation of autophagosomes and abnormal proteins (such as A β and cytotoxic proteins)	[39-40]
Phosphodiesterases 4 inhibitors	AD; HD; PD; MS; major depression	Improving and repairing nerve and synaptic plasticity by modulating cAMP-PKA-CREB and other signal pathways, thus enhancing cognitive ability	[41]
Carnitine palmitoyltransferase I inhibitors	Cancer	Producing excessive ceramide and inducing tumor cell apoptosis	[42]
15-LOX-1 activators	Cancer and cancer resistance	Changing cell movement characteristics and membrane dynamics to enhance DOX accumulation	[43]
L-amino acid oxidases	Sarcoma; breast cancer; Ehrlich ascites tumor	Amino acid depletion therapy: deprivation of amino acids of tumor cells growth and metabolism need	[10]
Phenylalanine ammonialyase	Breast adenocarcinoma; Prostate cancer; Fisher lymphadenosis		
Tyrosine phenollyase	Melanoma		
Alginate lyase	Clinical adjuvant treatment of diseases related to mucoid <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection	Inhibiting the formation of BF of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; reducing drug resistance; promoting penetration of antibacterial drugs and enhancing the phagocytosis of human immune cells	[45]
Dopamine beta hydroxylase inhibitors	Hypertension, cardiovascular disease, and cocaine addiction	DBH regulates BP through the SNS through excessive activation of dopamine receptors	[47-48]
Butyrylcholinesterase	Against nerve agent intoxication	Binding rapidly and inactivating nerve agents	[49]
Chondroitinase ABC	Multiple sclerosis and spinal cord injury	Degrading main components of glial scars—CSPGs	[57]

物的特异性较低；II 型 L-天冬酰胺酶是一种周质酶，对 L-天冬酰胺的特异性更高，且具有广泛的底物特异性，所以 II 型 L-天冬酰胺酶显示出精准的抗肿瘤活性，并广泛用于 ALL 治疗中^[10]。来自大肠杆菌、菊欧文氏菌及聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 修饰的天冬酰胺酶 (来自大肠杆菌) 制剂已被批准治疗 ALL^[11]。

1.2.2 精氨酸酶和精氨酸脱亚胺酶

精氨酸酶 (Arginase, EC 3.5.3.1) 催化水解 L-精氨酸生成尿素。由中国香港生物癌症治疗国际有限公司生产的聚乙二醇化的精氨酸酶 1 (ARG1): BCT-100, 在体内外通过诱导凋亡或阻滞细胞周期, 在肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC)、急性髓细胞性白血病、黑素瘤和间皮瘤中均显示出抗癌活性, 并于 2012 年获得美国食品和

药物管理局 (FDA) 新药临床试验审批^[12]。

与精氨酸酶相比, 精氨酸脱亚胺酶 (Arginine deiminase, ADI, EC 3.5.3.6) 在生理 pH 和温度下不产生尿素并具有较高的酶活性。精氨酸脱亚胺酶是一种精氨酸分解酶, 可将精氨酸转化为瓜氨酸和氨。精氨酸属于人体非必需氨基酸, 正常细胞经瓜氨酸, 通过尿素循环中的精氨琥珀酸合成酶 (Argininosuccinate synthase, ASS) 和精氨琥珀酸裂解酶 (Argininosuccinatelyase, ASL) 合成; 而肿瘤细胞因缺乏精氨琥珀酸合成酶, 只能从外部获取以维持其生长和繁殖。ADI 通过分解精氨酸, 抑制精氨酸营养依赖型肿瘤细胞的生长, 阻止细胞循环, 最后使其凋亡; ADI 的降解作用还可抑制脂多糖诱导的一氧化氮 (NO) 合成, 一氧化氮在血管生成过程中可以调节血管内皮生长因

子、碱性成纤维细胞生长因子以及基质金属蛋白酶的活性^[13]。因此, ADI 通过耗尽肿瘤细胞必需生长因子(精氨酸)的供应及抗血管生成作用(抑制 NO 产生), 协同抑制体内实体肿瘤的生长^[14]。

ADI 存在于恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*、精氨酸支原体 *Mycoplasma arginini*、假单胞菌、乳酸菌等微生物中, 并广泛用于临床研究中, 在体内可以显著抑制 HCC 细胞、黑素瘤细胞、白血病细胞、前列腺癌细胞、胰腺癌细胞、肾癌细胞等多种癌细胞的生长^[15]; 此外, 在乳腺癌治疗(依赖 ADI 的抗血管生成活性)和抗病毒^[16]方面也有较好的应用前景。聚乙二醇(PEG)修饰的 ADI 降低了免疫原性并延长了体内半衰期。目前, ADI-PEG-20 (ADI 与相对分子质量 20 000 的 PEG 的结合) 用于治疗 HCC 和恶性黑素瘤已被 FDA 批准, 欧洲药品管理局(EMA)也批准其用于治疗 HCC。

1.2.3 尿激酶、链激酶、t-PA 和 u-PA

尿激酶(Urokinase, UK, EC 3.4.21.73)、链激酶(Streptokinase, SK, EC 3.4.21.38)和组织型纤溶酶原激活剂(Tissue plasminogen activator, t-PA)能激活纤溶酶原(Plasminogen, PLG)转换成纤溶酶(Plasmin, PL), 进而分解纤维蛋白或纤维蛋白原以达到抗凝血或溶解血栓的目的, 广泛用于血栓治疗中。尿激酶型纤溶酶原激活剂(Urokinase-type plasminogen activator, u-PA)是一种丝氨酸蛋白酶, 可将纤溶酶原转化为纤溶酶, 从而促进纤维蛋白溶解; 此外, u-PA 所激发的纤溶系统在肿瘤转移中也有重要作用^[17]。u-PA 作为一种血栓溶解剂, 已被用于治疗肺栓塞、急性心肌梗塞、眼凝块和血栓等^[18], 并于 1987 年获得了美国食品和药物管理局(FDA)批准; 尿激酶目前以 KinlyticTM形式作为溶栓药物销售^[19]。

SK 是一种单链多肽细菌胞外酶, 激活纤溶酶后可迅速降解纤维蛋白原, 阻止生成纤维蛋白

(血凝块的主要结构成分), SK 也可直接降解纤维蛋白进行溶栓。患者发生心肌梗塞后, 立即用 SK 静脉内给药, 可以减少对心肌的损害^[19]。

t-PA 是一种单链丝氨酸蛋白酶, 可选择性激活血栓中的纤溶酶原, 进而使纤溶酶溶解血栓; 在纤维蛋白存在下 t-PA 活性显著增强, 对纤维蛋白的特异性使其成为治疗血栓性疾病的基础。t-PA 作为第二代溶栓类药物, 相对于链激酶和尿激酶而言, 具有溶栓效果好、不易引起抗原反应、对纤维蛋白特异性高、对全身纤溶系统影响小等优势^[20]。

1.2.4 乳糖酶、 α -半乳糖苷酶和胰蛋白酶

肠胃健康很重要, 消化酶不足往往会导致消化不良, 引起腹部不适, 不利于营养物质的吸收, 有害人体健康。许多酶已经被用来治疗胃肠疾病: 对于乳糖不耐受的患者, 即体内缺乏足够乳糖酶(Lactase, 又称为 β -D-半乳糖苷酶, β -D-galactosidase, EC 3.2.1.23) 消化乳糖, 食用含乳糖的食物时(如牛奶和含乳糖的乳制品)就会出现腹胀、腹泻等症状。对于这类患者, 除了去乳糖饮食, 还可以通过食用含乳糖补充剂(乳糖酶)的乳制品减轻乳糖不耐受症状^[21]。

α -半乳糖苷酶(α -galactosidase enzyme, EC 3.2.1.22)属于外切糖苷酶, 催化 α -半乳糖苷键水解。豆类食品、芸薹属(*Brassica vegetables*)蔬菜(如大头菜、芥菜、油菜)等食物^[22]含有低聚糖类的抗营养因子, 肠道菌群利用这些低聚糖发酵可以产生气体(如 H_2 、 CO_2 等)引起胃胀、腹痛、腹泻等症状且不利于营养的吸收^[23]。 α -半乳糖苷酶可以用作食品添加剂或补充剂缓解肠胃不适, 促进营养物质的吸收。

胰蛋白酶(Trypsin, pancreas enzyme, EC 3.4.4.4)分泌不足会导致营养消化吸收不良, 慢性胰腺炎和囊性纤维化是引起外分泌型胰腺功能不全的常见原因, 通过胰酶(Pancreatic enzymes)进行替代治疗(当前使用的胰酶补充剂是蛋白酶、脂肪酶和淀粉酶的混合物^[19]), 可以显著改善脂肪和氮

的吸收系数及临床症状^[24]。此外,胰酶也可用作消化不良、便秘和腹胀的补充剂。除上述酶外,脂肪酶(Lipases)也是较早用于治疗胃肠功能紊乱和消化不良的酶制剂之一。

1.2.5 苯丙氨酸解氨酶(PAL)

苯丙酮尿症(PKU)是一种遗传性疾病,患者由于缺乏苯丙氨酸羟化酶(PAH),导致苯丙氨酸及其代谢产物的浓度显著增加。高浓度苯丙氨酸具有神经毒性,会使患者出现严重的智力障碍、自闭症行为、癫痫发作等神经学表现^[2]。治疗PKU的传统饮食疗法是通过长期严格控制低苯丙氨酸(Phe)含量饮食,降低血液中的苯丙氨酸浓度至无神经毒性范围内,但这种治疗方式很难坚持且容易出现新生儿营养不良等问题。因此寻找非饮食疗法的酶替代疗法(Enzyme replacement therapy, ERT)尤为关键。

苯丙氨酸解氨酶(PAL, EC 4.3.1.24)有望成为控制PKU中Phe水平的酶替代疗法。它可将Phe转化为无毒产物反式肉桂酸和氨;反式肉桂酸再被转化为苯甲酸,在肝脏中与甘氨酸结合并作为马尿酸排泄;而氨通过尿素循环形成尿素排出体外。

PAL广泛存在于高等植物中,在一些真菌、链霉菌和少数蓝细菌中也有发现^[25]。Aydas等^[26]研究了蓝细菌分离株,他们发现集胞藻*Synechocystis* sp. BASO444和BASO673分离株显示出高水平的PAL活性和强抗氧化活性,该分离株可以用作PAL的候选来源,为PKU患者生产富含PAL的药物。由于PAL为非哺乳动物蛋白,为降低其免疫原性和保护PAL免受消化酶的蛋白水解降解,常采用定点诱变技术和PEG化学修饰^[27]。2018年5月,美国FDA批准了PalynziqTM(Pegvaliase-pqp3)作为PKU的酶疗法;同年3月,欧洲药品管理局(EMA)接受了BioMarin公司提交的Pegvaliase上市许可申请^[2]。近年来,研究人

员开发了一些新的PAL传感器和检测系统,以定量苯丙氨酸的水平,以便及时治疗PKU^[28]。

1.2.6 腺苷脱氨酶(ADA)

腺苷脱氨酶(Adenosine aminohydrolase, ADA, EC 3.5.4.4)属于水解酶类,催化腺苷水解脱氨转化成肌苷;在腺苷及2-脱氧腺苷的代谢以及免疫系统的维持中起关键作用。ADA缺陷会导致细胞嘌呤代谢产物(腺苷)的积累,产生细胞毒性,影响胸腺发育。由腺苷脱氨酶缺陷所致的腺苷脱氨酶缺陷型严重联合免疫缺陷病(ADA-SCID),占有严重联合免疫缺陷病的10%–20%^[29]。PEG-ADA(Adagen: pegadamase bovine)已经用于治疗SCID,酶经聚乙二醇修饰后,半衰期延长且免疫原性降低。此外,StrimvelisTM利用 γ -RV载体对ADA-SCID患儿进行基因治疗,获得了EMA的上市批准^[30]。除了用于SCID的替代疗法,ADA同工酶在疾病的临床诊断中也有重要应用。

1.2.7 胶原蛋白酶

胶原蛋白酶(又称胶原酶, Collagenase, EC 3.4.21.49)催化水解胶原蛋白,广泛存在于各种生命有机体中(植物、动物、微生物),但主要研究对象为基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase, MMP)和微生物胶原酶。本课题组从深海细菌-太平洋火色杆菌*Flammeovirga pacifica*的基因组中也找到了一段疑似胶原蛋白酶的序列,经Pfam在线网站分析,该序列属于Peptidase_U32家族,而此前报道的该家族的胶原蛋白酶多来源于致病菌,给其应用造成了一定障碍^[31]。使用穿线法I-TASSER对其建模(由于该酶序列在PDB无法找到相似性大于25%的模板蛋白,无法使用同源建模法构建3D结构),并用SAVES v5.0(<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>)在线网站评估后,所得胶原蛋白酶的三级结构如图1所示,其预测结构与已知U32家族的酶相差较大,相关的理化性质正在研究中。

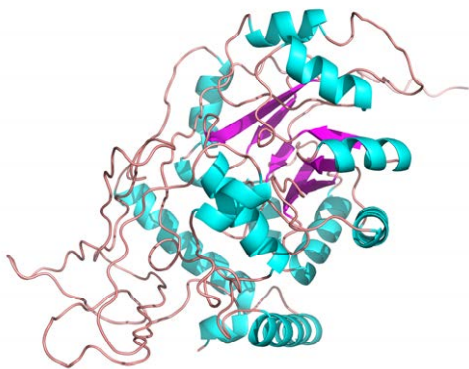


图1 源自太平洋火色杆菌胶原蛋白酶的三级结构

Fig. 1 Tertiary structure of collagenase from *Flammeovirga pacifica*.

随着对其研究的日渐深入,胶原酶广泛应用于疾病治疗中:胶原酶软膏适用于烧伤创面的酶学清创并且能促进创面愈合^[31];溶组织梭状芽胞杆菌 *Clostridium histolyticum* 分泌产生的胶原酶可以代替筋膜切开术,通过溶解手掌中胶原蛋白沉积导致的掌指和/或近端指间关节挛缩以治疗杜普伊特伦挛缩症(又称掌腱膜挛缩症, Dupuytren's contracture),并被FDA批准;臭氧与胶原酶(水解椎间盘内或突出物周围的胶原分子,从而减小突出物)联合注射治疗腰椎间盘突出症(Lumber disc herniation, LDH)能有效缓解疼痛并改善功能,且无严重并发症发生;此外,胶原酶化学核裂解术治疗椎间孔外腰椎间盘突出症具有立即缓解术中疼痛、降低住院费用、操作简单等优点^[32]。由于胶原蛋白与诸多疾病的生理过程(如肿瘤的转移)密切相关,胶原蛋白和胶原蛋白酶基础研究的进步,将有助于阐明疾病机理并推进疾病治疗。

1.2.8 沙雷菌蛋白酶

沙雷菌蛋白酶(又称为舍雷肽酶, Serratopeptidase/Serrapeptase/Serralyisin, EC 3.4.24.40)是一种蛋白水解酶,因其抗炎、抗水肿和镇痛作用(抑制发炎组织中的疼痛诱导胺,如缓激肽的释放),在外科、骨科、耳鼻喉科、妇科和牙科等

各种专业中作为处方药品;此外,因其对纤维蛋白、酪蛋白有溶解能力,有一定的抗动脉粥样硬化作用^[33];连续使用沙雷菌蛋白酶还能促进青霉素、氨苄青霉素等抗生素的组织穿透能力,增强抗生素的作用。尽管沙雷菌蛋白酶被广泛使用,但其在临床实践中的实用性、有效性和安全性还需要进一步评估。

1.3 具有临床应用潜力的酶

1.3.1 治疗与生物被膜相关口腔疾病的酶

随着酶类药物的研究和开发,新型治疗酶不断出现。近年来,口腔疾病严重危害人体健康,口腔中的微生物群落多以生物被膜形式行使其功能,当口腔生态系失衡时,可引发多种口腔疾病,如龋齿、牙周炎、牙菌斑等。除使用抗菌剂(如纳米银)外,近年来酶在口腔疾病的治疗和预防中发挥了重要作用。氧化酶类如唾液过氧化物酶(Salivary peroxidases)、溶菌酶(Lysozyme)、乳铁蛋白(Lactoferrin)的协同作用可以杀死或限制口腔细菌的生长,并缓解口腔症状;葡聚糖水解酶类包括葡聚糖酶(Dextranase)、变聚糖酶(Mutanase)通过降解与生物膜结合的细胞外基质成分或干扰细菌的蔗糖依赖性黏附来破坏生物被膜的形成,从而阻碍牙菌斑的积累;一些蛋白酶如虾酶(Krill Enzymes, Krillase[®])、木瓜蛋白酶(Papain)经临床研究证实可以通过破坏细菌对口腔表面的黏附或影响细胞间的相互作用来防止生物膜形成,以减少牙菌斑的形成^[1]。最近研究发现,噬菌体裂解酶ClyR在龋齿等口腔疾病的预防及治疗中发挥显著作用。ClyR能选择性杀灭导致龋齿的细菌,如变形链球菌 *Streptococcus mutans*、茸毛链球菌 *Streptococcus sobrinus* 以及导致根尖周牙髓感染的粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*,而对常见的口腔共生菌如口腔链球菌 *Streptococcus oralis* 等无害^[34]。

1.3.2 抗氧化酶

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)诱导

的氧化应激与多发性硬化症 (Multiple sclerosis, MS) 等神经系统疾病的发生密切相关。抗氧化酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、血红素加氧酶、谷胱甘肽过氧化物酶和抗氧化蛋白 (Peroxioredoxins, Prdx) 等内源抗氧化剂在清除活性氧并保护神经元不受损伤方面发挥重要作用; 抗氧化酶表达的增加可以: 1) 保护血脑屏障的完整性并减少白细胞的跨内皮迁移; 2) 抑制髓磷脂的损伤和吞噬作用; 3) 防止 ROS 引起的少突胶质细胞和轴突损伤, 从而减少 MS 的发生^[35]。血红素加氧酶同时具有抗氧化和抗炎特性, 而抗氧化蛋白家族除维持细胞内的过氧化氢水平平衡、调节细胞代谢、增殖、凋亡和免疫反应外, 还在肿瘤预防和治疗中发挥重要作用。Prdx1 和/或 Prdx1 调节的 ROS 依赖性信号通路在乳腺癌、食道癌和肺癌的发生和转移中起重要作用; 此外, Chen 等^[36]发现, Prdx1 是食管鳞状细胞癌 (Esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 细胞中初级纤毛形成的新型调节剂, 在 ESCC 的治疗中具有指导意义。

值得一提的是, 过氧化氢酶 (Catalase, CAT, EC.1.11.1.6) 作为抗氧化酶还可以用于治疗新冠肺炎病毒 COVID-19。有研究表明, 细胞因子风暴综合征及 SARS-CoV-2 引起的过度炎症反应可能是影响患者疾病严重程度和死亡的主要原因。Qin 等^[37]通过原位聚合将过氧化氢酶包裹在聚合物薄壳中, 形成 n (CAT) 的纳米胶囊并作用于人白细胞、肺泡上皮细胞, 结果表明过氧化氢酶有助于调节细胞因子的产生, 保护氧化损伤并抑制 SARS-CoV-2 的复制, 这种新型治疗剂 (n (CAT)) 成本低、毒性小且可中试规模生产, 是一种颇具前景的治疗药物。

1.3.3 神经系统疾病治疗的酶

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种神经系统退行性疾病, 致病因素尚未确定, 目前 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, A β) 假说得到研究人员的一致认同, 即由于脑内 A β 的聚

集和沉积形成老年斑 (Senile plaques, SP), 产生神经毒性, 影响神经元突触功能, 最终神经元变性死亡导致了 AD 的发生^[38]。 β -淀粉样蛋白前体蛋白裂解酶 1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme1, BACE1, EC 3.4.23.46) 是生成 β -淀粉样蛋白 (Amyloid β -protein, A β) 的限速酶, 可抑制 A β 的形成, 对 AD 的研究和存在 AD 发病风险 (处于 A β 积累早期阶段) 的患者具有重要意义。

有研究表明, 酸性鞘磷脂酶 (Acid sphingomyelinase, ASM, EC 3.1.4.12) 可能成为 AD 潜在治疗靶点。ASM 是一种重要的鞘脂代谢酶, 可以将鞘磷脂转化为神经酰胺和磷酸胆碱; 此外, ASM 参与包括细胞存活、通透性、增殖和分化等信号传导过程, 并在介导衰老、凋亡和自噬方面发挥重要作用^[39]。ASM 抑制剂通过减少神经元中的 ASM, 改善了自噬过程并减少了自噬体和异常蛋白 (如 A β 和细胞毒性蛋白) 的积累, 降低了 AD 的发病几率; ASM 抑制剂还可通过减少神经酰胺的浓度, 在其他神经退行性疾病如帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 和重度抑郁症的治疗方面发挥重要作用^[40]。

此外, 磷酸二酯酶 4 (Phosphodiesterases 4, PDE-4) 也被认为是治疗神经系统疾病的潜在靶标。PDE 水解环腺苷单磷酸 (Cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 和环鸟苷单磷酸 (Cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 并降低这些第二信使的水平, 而 cAMP 可通过调节 cAMP-PKA-CREB 等信号通路改善和修复神经及突触可塑性, 增强认知能力。因此, 有望通过 PDE4 抑制剂治疗 PD、亨廷顿氏病 (Huntington's disease, HD)、AD (cAMP 可通过控制内质网和高尔基体中不成熟的 N-糖基化淀粉样前体蛋白 (Amyloid precursor protein, APP) 转化为成熟的 N-O-糖基化蛋白, 从而影响 A β 的产生)、抑郁症和 MS (注: 1.3.2 所述内源抗氧化酶也可用于治疗 MS)^[41]。

1.3.4 癌症治疗的酶

近年来,脂肪酸代谢在癌症中的作用日渐受到研究人员的关注,参与脂肪酸代谢基因的异常表达与恶性表型相关,如耐药性、转移潜能和复发^[42]。

肉碱棕榈酰转移酶 I (Carnitine palmitoyltransferase I, CPT1, EC 2.3.1.21) 是脂肪酸氧化 (Fatty acid oxidation, FAO) 的限速酶,分为 A、B、C 三个亚型,其中 CPT1A 是催化酰基辅酶 A 转化为酰基肉碱的限速步骤,促进长链脂肪酸的氧化。CPT1A 可通过氧化长链脂肪酸调节脂肪酸的含量,避免过量的神经酰胺产生,从而一定程度上避免了肿瘤细胞的凋亡^[42]。因此, CPT1A 可能是一种有效的癌症治疗靶点。

脂加氧酶 (Lipoxygenases, LOXs, EC 1.13.11.12) 是一类氧化多不饱和脂肪酸并产生具有生物活性脂质介体的酶。15-脂氧合酶-1 (15-LOX-1) 作为其家族成员,负责代谢花生四烯酸和亚油酸;通过调节蛋白质-脂质相互作用,改变细胞内氧化还原状态以及产生与炎症诱导和消退有关的脂质代谢产物来影响生理和病理事件。有研究表明,通过调控 15-LOX-1 的表达水平,可以抑制肿瘤细胞的生长。此外, Kazan 等^[43]首次发现 15-LOX-1 在 MCF7 和 HeLa 癌细胞系中对阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 耐药性具有重要意义,即 15-LOX-1 的过表达可通过激活 PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma) 诱导 MCF7 DOX 细胞凋亡,并通过改变细胞运动特性和膜动力学来增强耐药 MCF7 细胞中 DOX 的积累;虽然在 HeLa DOX 细胞未显示上述现象,但经 15-LOX-1 代谢产物 13-S-HODE 处理后很容易死亡。这些结果显示 15-LOX-1 在癌症治疗及耐药性中的重要意义,并为克服癌症耐药性提供了新思路。

除上述两种参与脂质代谢的酶外, L-氨基酸氧化酶 (LAAO, EC 1.4.3.2)、蛋氨酸 γ -裂解酶 (MGL, EC 4.4.1.11)、苯丙氨酸解氨酶 (PAL, EC 4.3.1.24)、酪氨酸酚裂解酶 (TLP, EC 4.1.99.2)

等氨基酸分解酶在氨基酸耗竭疗法治疗癌症方面发挥重要作用^[10]。除 MGL 处于临床阶段研究外,其余几种酶仍处于体内试验阶段中。

1.3.5 其他颇具潜力的治疗酶

海藻酸盐裂解酶 (Alginate lyase, AlgL, EC 4.2.2.3) 催化海藻酸盐的降解,广泛存在于海洋藻类、海洋无脊椎动物以及海洋和陆地微生物中^[44]。有研究表明,海藻酸盐裂解酶可以用于临床辅助治疗与粘液性铜绿假单胞菌感染有关的疾病,可与抗生素联合用于治疗囊性纤维化^[45];这是因为 AlgL 能抑制粘液型铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 生物被膜的形成,从而降低耐药性、促进抗菌药渗透并增强人体免疫细胞对铜绿假单胞菌的吞噬作用^[46];此外,裂解产物-海藻多糖具有多种生物活性和药用功能,如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎等,引起了研究人员对海洋生物寡糖开发利用的关注。

多巴胺 β 羟化酶 (Dopamine beta hydroxylase, DBH, EC 1.14.17.1) 是一种铜依赖性单加氧酶,可以将多巴胺转化为去甲肾上腺素 (进而生成肾上腺素),在儿茶酚胺 (包括去甲肾上腺素、肾上腺素和多巴胺) 生物合成途径中发挥关键作用,且儿茶酚胺水平的变化与多种神经和心血管疾病相关。DBH 通过多巴胺受体的过度激活从而通过交感神经系统 (Sympathetic nervous system, SNS) 调节血压 (Blood pressure, BP)^[47]。关于 DBH 抑制剂的研究较多, DBH 抑制剂可以对抗高血压、心血管疾病及可卡因成瘾等疾病,其中 Disulfiram 已被 FDA 批准用于药物治疗酒精依赖和可卡因成瘾,其余 DBH 抑制剂仍处于临床试验阶段^[48]; DBH 活性降低而导致去甲肾上腺素缺乏症与多动症 (Attention-deficit hyperactivity disorder, ADHD)、抑郁症和低血压等疾病直接相关,但关于 DBH 酶激活剂研究较少,因此急需发现 DBH 酶激活剂^[48]。

丁酰胆碱酯酶 (Butyrylcholinesterase, BuChE,

EC 3.1.1.8), 是人血清胆碱酯酶的主要组成部分, 广泛存在于血浆、神经胶质细胞、肝脏等组织器官中。Cerasoli 等^[49]发现其在有机磷 (OP) 中毒中发挥重要作用, 他们在豚鼠中研究了人丁酰胆碱酯酶对有机磷神经毒剂保护作用的化学计量性质, 向动物的血管或肌肉施用人丁酰胆碱酯酶 (26.15 mg/kg \approx 308 nmol/kg), 随后按照阶段适应性剂量设计给动物施用梭曼 (Soman) 或 VX 毒剂, 以估计治疗动物的改良半数致死量 (Median lethal dose, LD₅₀)。结果发现, 人丁酰胆碱酯酶 (308 nmol/kg) 增加了 Soman 和 VX 的平均致死剂量 (分别从 154 nmol/kg 增加到 770 nmol/kg 及从 30 nmol/kg 增加到 312 nmol/kg); 并且通过计算试剂分子与酶活性部位的摩尔比, 得出 Soman 的化学计量保护比为 2:1。因此, BuChE 有望成为针对神经性毒剂中毒的立体定向体内生物清除剂。

1.4 疾病治疗用酶的来源

虽然疾病治疗用酶广泛来源于动物、植物及微生物中, 但随着生物工程技术的日渐成熟, 经济效益和规模化制备的需求, 微生物来源的酶制剂应用日渐广泛。大部分医药用酶都是通过合适的微生物菌株在严格控制的条件下发酵产生的。微生物具有种类丰富、来源广泛、生长繁殖快、易于扩大培养、菌株易诱变、酶易提取等优点。已经开发了多种微生物用于酶的生产, 如细菌 (大肠杆菌和枯草芽孢杆菌)、酵母菌 (酿酒酵母、假丝酵母、毕赤酵母)、霉菌 (黑曲霉、米曲霉、红曲霉) 等。酶生产菌种的选择是工业生产中的重要因素。理想情况下, 选择产生胞外酶的菌株, 往往方便下游过程的处理, 如酶纯化及酶活性的恢复。此外, 不同微生物对发酵适应性也不相同, 在选择时需认真考虑。目前, 研究人员正扩大范围 (如深海) 寻找新的稳定微生物菌株, 以生产具有工业前景的酶。

利用微生物发酵生产医药用酶主要通过两种发酵技术实现, 即液态深层发酵法 (Submerged

fermentation, SmF) 和固态发酵法 (Solid-state fermentation, SSF)。这两种技术各有优缺点, 除少数应用和特定行业中使用固态发酵法外, 大部分工业过程都使用液态发酵法进行生产^[50]。

1.5 酶治疗存在的问题及解决途径与方法

酶治疗虽然具有特异性高、疗效显著等优势, 但也存在有效性和安全性等问题, 引起了研究人员的广泛关注。对于有效性而言, 酶制剂存在易被降解、热稳定性和 pH 稳定性低、半衰期短、耐药性强等问题; 对于安全性而言, 由于治疗酶制剂为异源大分子, 往往会存在免疫原性较高、易产生过敏反应、具有一定的毒副作用等问题。近年来, 寻找新酶源 (特别是开发极端环境下的新酶种)、重组 DNA 技术和酶分子设计 (定点突变、定向进化、酶的化学修饰、酶的固定化等) 等方法的应用为上述问题提供了解决途径。下面将主要以 L-天冬酰胺酶为例进行阐明。

如上文 1.2.1 所述, L-天冬酰胺酶在肿瘤治疗中发挥重要作用, 但也会引起某些副作用和过敏反应, 例如水肿、皮疹、发烧、肝功能不全、糖尿病、白细胞减少症、胰腺炎、神经性癫痫发作和出血等症状^[51-52]。有研究表明, L-天冬酰胺酶的副作用是由其谷氨酰胺酶活性引起的。为了克服此缺陷, 需要寻找无谷氨酰胺酶活性的新微生物来源的天冬酰胺酶。Radha 等^[53]发现来自霍乱弧菌的 L-天冬酰胺酶没有谷氨酰胺酶活性, 且该酶对底物亲和力较高, 具有较好的热稳定性和半衰期。由于霍乱弧菌是致病菌, 因此, 从非致病微生物中寻找合适的 L-天冬酰胺酶尤为重要。海洋环境的复杂多变性可能赋予微生物嗜盐、嗜压、嗜热、嗜冷等性质, 如深海细菌——太平洋火色杆菌 *Flammeovirga pacifica* 能在 0-5% NaCl (最佳 3%)、温度为 42 °C (最佳 32 °C) 的条件下生长; 菌株最适 pH 范围为 7.0-9.0, 并对多种抗生素敏感^[54]。近期, 我们从 *F. pacifica* 的基因组中找到了一段疑似 L-天冬酰胺酶的序列, 它

与 N(4)-(beta-N-acetylglucosaminy)-L-asparaginase (PBD: 1P4K) 的序列相似性为 65.52%，分析并预测了其可能的活性位点，如图 2 所示，该酶相关的理化特性表明其有潜在的应用价值。此外，固定化技术的应用大大降低了免疫原性问题，即蛋白表面的修饰阻碍了巨噬细胞识别抗原并传递给 T-辅助细胞，从而降低免疫原性。PEG 修饰 L-天冬酰胺酶是有效方法之一，聚乙二醇修饰的菊欧文氏菌的 L-天冬酰胺酶与游离酶相比，其免疫原性降低，对血浆胰蛋白酶和类胰蛋白酶的抗性更高，在高温下稳定性更高^[55]。其他固定化方法，如将 L-天冬酰胺酶固定在壳聚糖微球、尼龙管、纳米颗粒、硅胶、水凝胶等载体中，不同程度上改善了酶的活性、底物亲和力、热稳定性、免疫原性、半衰期等特性^[56]。

固定化技术在其他酶上也得到了广泛的应用，如硫酸软骨素酶 ABC I (Chondroitinase ABC, ChABC, EC 4.2.2.20) 能降解由于中枢神经系统受损产生的胶质瘢痕的主要成分——硫酸软骨素蛋白聚糖 (CSPGs)，可促进中枢神经系统 (CNS) 损伤后的轴突可塑性、轴突再生和髓鞘再

生 (受损神经再生)。Rezaei 等^[57]通过将 ChABC 固定在多孔硅纳米颗粒 (ChABC@PSi) 上克服了 ChABC 迅速热失活，需要重复注射的缺点。动物治疗两周后，ChABC@PSi 不仅减少了 CSPG 的量，ChABC@PSi 对 CSPG 的消化还减少了脱髓鞘区域和星形胶质细胞的变性。此外，ChABC@PSi 处理增加了新生成的少突胶质细胞谱系细胞的数量，增强了髓鞘的修复。结果表明，ChABC@PSi 对临床治疗多发性硬化症和脊髓损伤等疾病具有重要意义。

本课题组发现并自行设计了一种基于类弹性蛋白多肽 (Elastin-like polypeptides, ELPs) 快速仿生矿化 (SiO_2) 的高效自固定化酶技术，将酶自固定化于 SiO_2 载体上，并发现自固定化于二氧化硅载体上的木聚糖酶经 10 次循环后仍具有 70% 的剩余活性^[58]。除了有载体的固定化方法，无载体自固定化中的环境响应型自固定化法是一种新兴的且有重要应用前景的固定化技术。本课题组使用自行设计的新型 ELPs 作为纯化标签，仅通过相变和离心实现了酶的自组装固定化，所得固定化木聚糖酶的 pH 稳定性、热稳定性与游离酶相比显著提高^[59]。由于 ELPs 具有良好的生物相容性、低脱靶细胞毒性 (Off-target cytotoxicity)、良好的稳定性和溶解性、在体内可自行降解且降解副产物无毒等优势，在药物动力学、药物半衰期方面有很大改善并提高了生物利用度，因此广泛应用于药物载体研究中^[60]。因此，基于这两种固定化方法可能会显著改善酶活性、热稳定性、免疫原性以增强疗效；此外，基于 ELPs 非色谱法纯化高效廉价的优势及 ELPs 自固定化技术和快速仿生矿化的结合，有望用于高效制备固定化酶，以满足其工业需求并改善酶的特性。

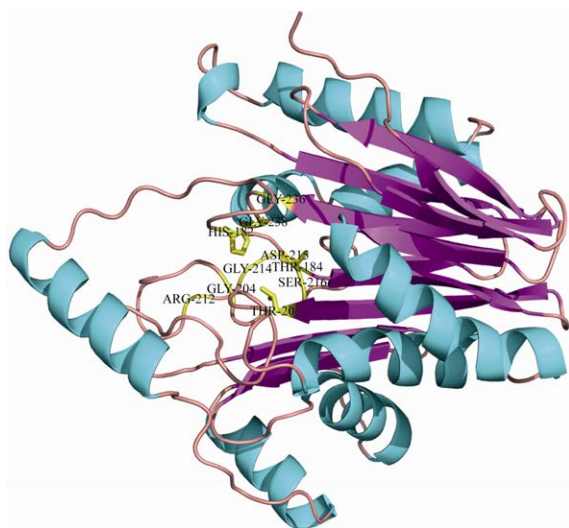


图 2 源自太平洋火色杆菌 L-天冬酰胺酶的三级结构及预测的活性位点

Fig. 2 Tertiary structure and the predicted active sites of L-asparaginase from *Flammeovirga pacifica*.

2 用于药物制备的酶

近年来，利用生物催化/转化技术合成药物 (特别是制备手性药物) 应用广泛。生物转化是利

用酶或微生物细胞作为生物催化剂,催化非天然有机化合物,与化学催化相比,具有反应条件温和、催化效率高、选择性强、副反应少等优点。以下将简要介绍利用生物催化技术制备药物中间体的几个例子。

2.1 醛酮还原酶合成药物中间体

心血管疾病严重威胁人体健康,他汀类药物作为 HMG-CoA 还原酶 (3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶, HMGR) 天然底物的类似物,竞争性抑制 HMG-CoA 的还原,减少了内源性胆固醇的生成,从而减少了心血管疾病的发生。R-4-氯-3-羟基丁酸乙酯 (R-CHBE) 是他汀类等多种药物的关键手性中间体,可由醛酮还原酶 (AKR) 不对称还原 4-氯乙酰乙酸乙酯 (COBE) 制备。醛酮还原酶 (AKR) 是还原型辅酶 I 或辅酶 II (NAD(P)H) 依赖性酶,属于氧化还原酶家族,具有催化前手性酮反应形成手性醇的能力。本课题组^[61]前期研究发现并异源表达了一种来自巨大芽胞杆菌 *Bacillus megaterium* 的新型 AKR (AKR7-2-1)。AKR7-2-1 具有良好的热稳定、pH 稳定性及出色的耐有机溶剂性 (在 10% (V/V) 有机溶剂中反应 10 h 仍保留 60% 的酶活性); AKR7-2-1 可以催化 N,N-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩基)-1-丙胺 (N,N-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine, DKTP) 还原为 (S)-N, N-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩基)-1-丙胺 ((S)-N,N-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine, DHTP), 后者为抗抑郁药盐酸度洛西汀的中间体。Ni 等^[62]共表达羰基还原酶和葡萄糖脱氢酶的基因,所得重组大肠杆菌菌株具有出色的催化活性,通过不对称还原生成 (R)-2-羟基-4-苯基丁酸乙酯 ((R)-HPBE)。(R)-HPBE 是合成血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制剂的重要手性中间体,参与普利类系列药物 (ACEI) 如贝那普利、西拉普利等的合成。普利类系列药物是常见的降血压药物,也可以用作冠心病等心脏疾病的二级预防用药。这些均表

明 AKR 在生物医学领域具有广阔的应用前景。

2.2 环氧化物水解酶合成药物中间体

环氧化物水解酶 (Epoxide hydrolase, EH, EC 3.3.2.3) 对底物具有较高的立体选择性,可有效用于外消旋环氧化物的对映选择性水解拆分,广泛用于手性环氧化物和邻二醇等手性药物中间体合成^[63]。如手性环氧氯丙烷 (ECH) 是调节血脂和预防心血管疾病的阿托伐他汀侧链关键中间体 (S)-4-氯-3-羟基丁酸乙酯、 β -肾上腺素阻断药物阿替洛尔、麻醉剂巴氯芬、减肥药左旋肉碱等药物的关键中间体^[4];此外, Furstoss 等利用黑曲霉菌 *Aspergillus niger* 环氧化物水解酶拆分 α -甲基-异丁基乙烯氧化物,得到光学活性的环氧化物,开环后可用于制备止痛药 (S)-布洛芬^[4]。

2.3 5'-磷酸吡哆醛依赖型酶合成药物

5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 依赖型酶根据其结构差异,可以分为 7 种不同的折叠类型,广泛应用于药物制备中,如转氨酶 (TAMs) 属于折叠 I 和 IV 型 PLP 依赖酶,可以不对称合成手性胺。手性胺类化合物是重要的药物/药物中间体,在制药行业发挥重要作用。(R)-amines 可以生产抗糖尿病药西他列汀;此外,在自然界中,(S)-选择性 TAMs 比 (R)-选择性 TAMs 丰富,只能通过 (S)-选择性 TAMs 来产生 (R)-amines,但最大产量仅有 50%,故而亟需寻找更多 (R)-选择性 TAMs^[64]。

苏氨酸醛缩酶 (Threonine aldolase, TA, EC 2.1.2.1) 属于折叠 I 型 (L-TA) 和 III 型 (D-TA) PLP 依赖酶,可从甘氨酸和醛生产多种 β -羟基- α -氨基酸 (β -hydroxy- α -amino acids, HAAs); HAAs 是抗生素、免疫抑制剂和抗帕金森氏病药物 L-苏式-3,4-二羟基苯基丝氨酸 (L-threo-DOPS) 等几种药物的核心组成部分^[64]。L-酪氨酸苯酚裂解酶 (L-tyrosine phenol-lyase, TPL, EC 4.1.99.2) 属于折叠 I 型 PLP 依赖酶,可以催化邻苯二酚、丙酮酸和氨生成左旋多巴 (3,4-二羟基苯基-L-丙氨酸, L-DOPA), 后者是治疗帕金森氏病的首选药物^[65]。

胱硫醚 β -裂解酶 (Cystathionine β -lyase, CBL, EC 4.4.1.8) 属于折叠 I 型 PLP 依赖酶, 除催化 β -半胱氨酸的碳硫键裂解, 释放 L-同型半胱氨酸、丙酮酸和氨外, 还能合成 D-氨基酸, 并参与 D-和 L-丝氨酸的代谢, 所以 CBL 在制药行业具有巨大潜力。

除上述酶用于制备药物/药物中间体, (R)-醇腈酶、脂肪酶、腈水解酶、青霉素 G 酰基转移酶、氧化还原酶等也广泛用于制药行业。相信随着手性药物在制药工业上需求的增加, 生物转化和生物拆分技术在药物制备中发挥越来越重要的作用。

2.4 酶法制备药物存在的问题及解决途径

虽然生物催化作为环境友好型方法广泛用于制备药物和/或药物中间体, 但仍存在如下问题:

1) 生物催化操作的范围有限, 温度升高、pH 值剧烈变化、盐浓度的改变等均可能导致酶失活; 2) 酶在水中催化活性最高, 而在有机溶剂中的催化活性受限; 3) 部分酶进行催化反应时需要价格昂贵的辅因子参与; 4) 底物和/或产物的抑制作用, 较高的底物和/或产物浓度会抑制某些酶的反应速率^[66]。此外, 酶法制备药物也存在不易规模化、原料利用度不高及部分副产物去除困难等缺点。

对于以上问题, 解决的方法如下: 1) 固定化技术: 固定化技术的应用不仅显著改善游离酶的特性 (如温度和 pH 稳定性); 一些固定化技术, 如 1.5 所述本课题组自行设计的基于 ELPs 的自固定化技术 (仅通过相变和离心实现了酶的自组装固定化) 还简化了下游的分离过程; 此外, 固定化技术的应用还能增加酶的循环使用次数从而降低生产成本。2) 酶在非水介质中的生物催化: 酶在非水介质中的生物催化的应用, 将影响酶的立体选择性, 因此对酶法制备手性药物/中间体具有重要指导意义。3) 辅因子循环系统/辅酶再生: 对于需要结合辅因子的酶来说, 辅因子的回收或循环利用将在很大程度上减少经济成本, 因此需要

建立相应的辅因子循环系统 (或辅酶再生系统)。如还原性氨酶 (Reductive aminase) 的辅因子 NADPH 可以通过谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase, GDH) 实现 NADPH 和 NADP^+ 的循环。此外, 使用全细胞生物催化剂代替游离酶也可以解决辅酶再生问题。4) 酶催化反应与分离的耦合可以一定程度上解决底物和/或产物的抑制作用; 连续添加底物, 并保持较低的底物浓度也可以减轻底物的抑制作用; 产物的抑制作用也可通过使用膜反应器得到改善。

除上述解决方法外, 多酶级联反应和多酶共固定化技术的应用也具有重要意义, 该方法不仅能减少反应过程、底物的输送和反应时间、减少由于扩散引起的中间损失, 还具有产生较少的副产物和污染物、降低生产成本并提高催化效率等优点^[67]。其次, 使用立体互补酶催化的多级联反应, 可以催化镜像底物的立体互补性差向异构化, 对动态动力学拆分制备光学活性的手性药物/药物中间体具有指导意义^[66]。

3 展望

虽然酶类药物广泛用于疾病治疗中, 但天然酶存在的问题依旧限制了其应用与发展。酶的化学修饰、固定化技术、重组 DNA 技术的应用很大程度上克服了酶的某些缺点。寻找新的合适酶种也至关重要, 海洋作为生命的发源地, 生物种类丰富; 此外, 海洋独特的环境赋予了生物多样性和代谢多样性等特点; 特别是对极端环境中微生物的筛选, 可能会赋予酶嗜压、嗜热、嗜盐等新功能。但我国对海洋酶的研究和应用还十分有限, 需进一步挖掘并充分利用海洋酶资源。而酶法制备药物 (或药物前体) 也存在操作范围有限、底物和/或产物的抑制作用、不易规模化、原料利用度不高及部分副产物去除困难等缺点, 相信随着生物技术的进步和科研人员的不断努力, 医药用酶将会发挥越来越重要的作用。

REFERENCES

- [1] Pleszczyńska M, Wiater A, Bachanek T, et al. Enzymes in therapy of biofilm-related oral diseases. *Biotechnol Appl Biochem*, 2016, 64(3): 337-346.
- [2] Levy HL, Sarkissian CN, Scriver CR. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): from discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria. *Mol Genet Metab*, 2018, 124(4): 223-229.
- [3] Salehi HS, Momeni M, Vahdani M, et al. Clinical value of debridging enzymes as an adjunct to standard early surgical excision in human burns: a systematic review. *J Burn Care Res*, 2020: iraa074. DOI: 10.1093/jbcr/iraa074.
- [4] 吴群, 邹树平, 郑裕国. 环氧化物水解酶在手性药物中间体合成中的应用. *精细与专用化学品*, 2015, 23(6): 23-29.
Wu Q, Zou SP, Zheng YG. Applications of epoxide hydrolase in the synthesis of chiral drug intermediates. *Fine Specialty Chem*, 2015, 23(6): 23-29 (in Chinese).
- [5] 喻致祥. 药用酶的研制与应用进展. *中国生化药物杂志*, 1992, 1: 60-62.
Yu ZX. Development and application of medicinal enzymes. *Chin J Biochem Pharm*, 1992, 1: 60-62 (in Chinese).
- [6] Gurung N, Ray S, Bose S, et al. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int*, 2013(3): 329121.
- [7] 徐寒梅, 周长林, 郑珩, 等. 治疗酶的研究进展. *生物工程学报*, 2009, 25(12): 1852-1862.
Xu HM, Zhou CL, Zheng H, et al. Progress in the research of therapeutic enzyme. *Chin J Biotech*, 2009, 25(12): 1852-1862 (in Chinese).
- [8] Singh Y, Srivastava SK. Screening and characterization of microorganisms capable of producing antineoplastic drug, L-asparaginase. *J Int Boil Med Res*, 2012, 3(4): 2548-2554.
- [9] Abd El Baky HH, El Baroty GS. Optimization of growth conditions for purification and production of L-asparaginase by *Spirulina maxima*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016: 1785938.
- [10] Pokrovsky VS, Chepikova OE, Davydov DZ, et al. Amino acid degrading enzymes and their application in cancer therapy. *Curr Med Chem*, 2019, 26(3): 446-464.
- [11] Narayana KJP, Kumar KG, Vijayalakshmi M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J Microbiol*, 2008, 48(3): 331-336.
- [12] Lam SK, Yan S, Xu S, et al. Endogenous arginase 2 as a potential biomarker for PEGylated arginase 1 treatment in xenograft models of squamous cell lung carcinoma. *Oncogenesis*, 2019, 8(3): 18.
- [13] Jeon JK, Seo H, Park J, et al. Conceptual study for tissue-regenerative biodegradable magnesium implant integrated with nitric oxide-releasing nanofibers. *Met Mater Int*, 2019, 25(4): 1098-1107.
- [14] Garcia-Bermudez J, Williams RT, Guarecuco R, et al. Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. *Mol Metab*, 2020, 33: 67-82.
- [15] 张媛媛. 精氨酸脱亚胺酶的研究进展. *中国酿造*, 2012, 31(6): 14-18.
Zhang YY. Research progress of arginine deiminase. *China Brew*, 2012, 31(6): 14-18 (in Chinese).
- [16] Criscitiello MF, Kraev I, Lange S. Post-translational protein deimination signatures in serum and serum-extracellular vesicles of *Bos taurus* reveal immune, anti-pathogenic, anti-viral, metabolic and cancer-related pathways for deimination. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2861.
- [17] Jaiswal RK, Varshney AK, Yadava PK. Diversity and functional evolution of the plasminogen activator system. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 886-898.
- [18] Schwab M. *Encyclopedia of cancer*. 3th ed. Berlin, Heidelberg: Springer, 2012: 3705.
- [19] UmaMaheswari T, Hemalatha T, Sankaranarayanan P, et al. Enzyme therapy: current perspectives. *Indian J Exp Biol*, 2016, 54(1): 7-16.
- [20] Delude C. Clot-Busters!!-Discovery of thrombolytic therapy for treating heart attack & stroke. *FASEB J*, 2005, 19(6): 1-19.
- [21] Coulston A, Boushey C, Ferruzzi M, et al. *Nutrition in the prevention and treatment of disease*. 4th ed. New York, NY: Elsevier, 2017: 875-892.
- [22] Caballero B, Finglas FP, Toldrá F. *Encyclopedia of food and health*. Oxford: Academic Press, 2016: 43-48.
- [23] Shang QH, Ma XK, Li M, et al. Effects of α -galactosidase supplementation on nutrient

- digestibility, growth performance, intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. *Anim Feed Sci Technol*, 2018, 236: 48-56.
- [24] Nakajima K, Oshida H, Muneyuki T, et al. Pancrelipase: an evidence-based review of its use for treating pancreatic exocrine insufficiency. *Core Evid*, 2012, 7: 77-91.
- [25] Cui JD, Qiu JQ, Fan XW, et al. Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, 34(3): 258-268.
- [26] Aydaş SB, Ozturk S, Aslım B. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) enzyme activity and antioxidant properties of some cyanobacteria isolates. *Food Chem*, 2013, 136(1): 164-169.
- [27] Bell SM, Wendt DJ, Zhang YH, et al. Formulation and PEGylation optimization of the therapeutic PEGylated phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *PLoS ONE*, 2017, 12(3): e0173269.
- [28] Lin C, Jair YC, Chou YC, et al. Transcription factor-based biosensor for detection of phenylalanine and tyrosine in urine for diagnosis of phenylketonuria. *Anal Chim Acta*, 2018, 1041: 108-113.
- [29] Carbonaro DA, Zhang L, Jin XY, et al. Preclinical demonstration of lentiviral vector-mediated correction of immunological and metabolic abnormalities in models of adenosine deaminase deficiency. *Mol Ther*, 2014, 22(3): 607-622.
- [30] Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(6): 737-740.
- [31] Zhang YZ, Ran LY, Li CY, et al. Diversity, structures, and collagen-degrading mechanisms of bacterial collagenolytic proteases. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(18): 6098-6107.
- [32] Zhang Y, Yin Q, Zhu MY, et al. Collagenase chemonucleolysis versus percutaneous endoscopic discectomy for extraforaminal lumbar disc herniations. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(5): 8610-8619.
- [33] Bhagat S, Agarwal M, Roy V. Serratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *Int J Surg*, 2013, 11(3): 209-217.
- [34] Xu JJ, Yang H, Bi YL, et al. Activity of the chimeric lysin ClyR against common gram-positive oral microbes and its anticaries efficacy in rat models. *Viruses*, 2018, 10(7): 380.
- [35] Schreibelt G, Van Horssen J, Rossum SV, et al. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. *Brain Res Rev*, 2008, 56(2): 322-330.
- [36] Chen QZ, Li JM, Yang XN, et al. Prdx1 promotes the loss of primary cilia in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2020, 20: 372.
- [37] Qin M, Zheng C, Jing W, et al. An antioxidant enzyme therapeutic for COVID-19. *Adv Mater*, 2020, 32(43): 2004901.
- [38] Paroni G, Bisceglia P, Seripa D. Understanding the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(2): 493-510.
- [39] Lee JK, Jin HK, Park MH, et al. Acid sphingomyelinase modulates the autophagic process by controlling lysosomal biogenesis in Alzheimer's disease. *J Exp Med*, 2014, 211(8): 1551-1570.
- [40] Park MH, Jin HK, Bae J. Potential therapeutic target for aging and age-related neurodegenerative diseases: the role of acid sphingomyelinase. *Exp Mol Med*, 2020, 52: 380-389.
- [41] Bhat A, Ray B, Mahalakshmi AM, et al. Phosphodiesterase-4 enzyme as a therapeutic target in neurological disorders. *Pharmacol Res*, 2020: 105078.
- [42] Schlaepfer IR, Molishree J. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential. *Endocrinology*, 2020, 161(2), bqz046.
- [43] Kazan HH, Urfali-Mamatoglu C, Yalcin GD, et al. 15-LOX-1 has diverse roles in the resensitization of resistant cancer cell lines to doxorubicin. *J Cell Physiol*, 2019, 235(5): 4965-4978.
- [44] Wang YN, Chen XH, Bi XL, et al. Characterization of an alkaline alginate lyase with pH-stable and thermo-tolerance property. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): 308.
- [45] Daboor SM, Raudonis R, Cohen A, et al. Marine bacteria, a source for alginolytic enzyme to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mar Drugs*, 2019, 17(5): 307.
- [46] Blanco-Cabra N, Paetzold B, Ferrar T, et al.

- Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Sci Rep, 2020, 10: 9390.
- [47] Dey SK, Saini M, Prabhakar P, et al. Dopamine β hydroxylase as a potential drug target to combat hypertension. Expert Opin Inv Drug, 2020, DOI: 10.1080/13543784.2020.1795830.
- [48] Singh DB, Tripathi T. Frontiers in protein structure, function, and dynamics. 1st ed. Springer Singapore, 2020: 339-357.
- [49] Cerasoli DM, Armstrong SJ, Reeves TE, et al. Butyrylcholinesterase, a stereospecific *in vivo* bioscavenger against nerve agent intoxication. Biochem Pharmacol, 2020, 171: 113670.
- [50] Pandey A. Solid-state fermentation. Biochem Eng J, 2003, 13(2/3): 81-84.
- [51] El-Naggar EA, El-Ewasy SM, El-Shweihy NM. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. Int J Pharmacol, 2014, 10(4): 182-199.
- [52] Figueiredo L, Cole PD, Drachtman RA. Asparaginase *Erwinia chrysanthemi* as a component of a multi-agent chemotherapeutic regimen for the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia who have developed hypersensitivity to *E. coli*-derived asparaginase. Expert Rev Hematol, 2016, 9(3): 227-234.
- [53] Radha R, Arumugam N, Gummadi SN. Glutaminase free L-asparaginase from *Vibrio cholerae*: heterologous expression, purification and biochemical characterization. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 129-138.
- [54] Xu H, Fu YY, Y N, et al. *Flammeovirga pacifica* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Micr, 2012, 62(4): 937-941.
- [55] Melik-Nubarov NS, Grozdova ID, Lomakina GY, et al. PEGylated recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: production, properties, and potential applications. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2017, 53(2): 164-172.
- [56] Ulu A, Ates B. Immobilization of L-asparaginase on carrier Materials: a comprehensive review. Bioconjugate Chem, 2017, 28(6): 1598-1610.
- [57] Rezaei S, Dabirmanesh B, Zare L, et al. Enhancing myelin repair in experimental model of multiple sclerosis using immobilized chondroitinase ABC I on porous silicon nanoparticles. Int J Biol Macromol, 2020, 146: 162-170.
- [58] 林源清, 李夏兰, 张光亚. 酶自固定化方法研究进展. 化工进展, 2018, 37(12): 4523-4532.
Lin YQ, Li XL, Zhang GY. Recent research progress of enzyme self-immobilization methods. Prog Chem, 2018, 37(12): 4523-4532 (in Chinese).
- [59] Li CC, Zhang GY. The fusions of elastin-like polypeptides and xylanase self-assembled into insoluble active xylanase particles. J Biotechnol, 2014, 177: 60-66.
- [60] Varanko AK, Su JC, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides for biomedical applications. Annu Rev Biomed Eng, 2020, 22: 343-369.
- [61] Jiang W, Pei R, Wu WL, et al. Catalytic site analysis and characterization of a solvent-tolerant aldo-keto reductase. Bio Pharm Int, 2019, 32(7): 34-40.
- [62] Ni Y, Su YN, Li HD, et al. Scalable biocatalytic synthesis of optically pure ethyl (*R*)-2-hydroxy-4-phenylbutyrate using a recombinant *E. coli* with high catalyst yield. J Biotechnol, 2013, 168(4): 493-498.
- [63] Kamble MP, Yadav GD. Biocatalytic resolution of (*R,S*)-styrene oxide using a novel epoxide hydrolase from red mung beans. Catal Today, 2018, 309: 236-241.
- [64] Rocha JF, Pina AF, Sousa SF, et al. PLP-dependent enzymes as important biocatalysts for the pharmaceutical, chemical and food industries: a structural and mechanistic perspective. Catal Sci Technol, 2019, 9(18): 4864-4876.
- [65] Li T, Li X. Comprehensive mass analysis for chemical processes, a case study on L-Dopa manufacture. Green Chem, 2014, 16(9): 4241-4256.
- [66] Faber K. Biotransformations in organic chemistry. 6th ed, Berlin: Springer-Verlag, 2011: 1-10.
- [67] Ren SZ, Li CH, Jiao XB, et al. Recent progress in multienzymes co-immobilization and multienzyme system applications. Chem Eng J, 2019, 373: 1254-1278.

(本文责编 郝丽芳)