

整细胞酶促合成抗 HIV 新药 D-D4FC^{*}

戚 娜 朱利民^{**}

(东华大学生物科学与技术研究所 上海 201620)

摘要 D-D4FC(β -D-2' , 3'-双脱氢双脱氧-5-氟胞嘧啶核苷) 是一种新型抗 HIV 病毒的核苷类药物 , 目前正在美国、法国和德国进行 II 期临床。利用乳酸杆菌提取的粗制 N-脱氧核糖转移酶实现了由 D4T(β -D-2' , 3'-双脱氢双脱氧-胸苷 , 司他夫定) 和 5-FC(5-氟胞嘧啶) 合成 D-D4FC , 转化率达到 25%。现在 , 发现利用乳酸杆菌整细胞也可实现此反应 , 其转化率经过 12.5 h 可达到 50% , 更有利于可能的工业化连续生产。研究了整细胞催化合成 D-D4FC 反应中 , pH 值、缓冲液类型、底物浓度、加菌量、反应时间等条件的影响并进行了优化 , 探讨了反应中乳酸杆菌整细胞催化的可能机理。

关键词 整细胞 酶促 D-D4FC 抗 HIV 合成

中图分类号 : Q814 文献标识码 : A 文章编号 : 0253-2654(2007) 05-0901-04

Enzymatic Synthesis of D-D4FC Using Intact Cells^{*}

QI Na ZHU Li-Min^{**}

(Institute of Biological Sciences and Biotechnology , Donghua University , Shanghai 201620)

Abstract D-D4FC(β -D-2' , 3'-didehydro-2' , 3'-dideoxy-5-fluorocytidine) , a new anti-HIV drug , is on its Phase II clinical trials in America , France and Germany . Our lab has synthesized D-D4FC successfully using N-deoxyribosyltransferase from *Lactobacillus helveticus* catalyzing the ribose transfer from D4T(β -D-2' , 3'-unsaturated thymidine) to 5-FC(5-fluorocytidine) . The yield of D-D4FC reached 25% . We discovered the reaction could also be done by using intact cells . The yield could increase to 50% in 12.5 hours and more convenient to industrial continuous process . In this paper , the conditions including pH , buffer , substrates concentration , cells amount , reaction time and a possible catalytic mechanism were studied and discussed .

Key words : Intact cell , Enzymatic catalysis , D-D4FC , Anti-HIV , Synthesis

D-D4FC 是一种新型的抗 HIV 病毒的核苷类药物 , 以 1 次/d 或 2 次/d 的剂量服用 , 可有效地抑制 HIV 原生菌 , 抗 AZT(齐多夫定 , 3'-脱氧-3'-叠氮胸苷) 菌株和抗 3TC(拉米夫定 , 3'-硫代胞苷) 菌株及抗其它 NRTI(核苷逆转录酶抑制剂) , NNRTI(非核苷逆转录酶抑制剂) , PI(蛋白酶抑制剂) 类药物的 HIV 变异菌株。到 2005 年 7 月为止 , 在服用 D-D4FC 的病人体内尚未发现新的 HIV 变异菌株。非常重要是 , D-D4FC 与除 DD(2' , 3'-双去氧肌苷) 的其它病毒抑制剂联合用药无相互抑制作用 , 且几乎无细胞毒性 , 是一种极具潜力的抗 HIV 药物。目前 , D-D4FC 正在美国、法国和德国进行 II 期临床 , 其 III 期临床也正计划启动^[1,2]。

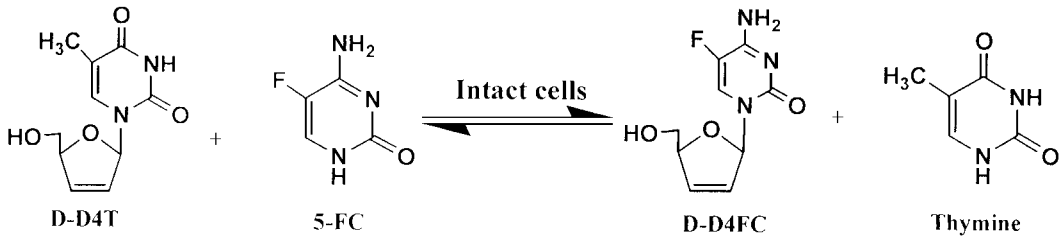
考虑到 D-D4FC 化学合成成本较高 , 且对人体伤害较大 , 所以我们尝试利用酶法合成 D-D4FC。之前 , 我们考虑到 N-脱氧核糖转移酶是胞内酶 , 所以破碎乳酸杆菌细胞得到粗酶后用于催化 , 成功实现了由市场价格较低的 D4T 和 5-FC 合成 D-D4FC , 转化率达到 25% , 且基本无副产物 , 可方便分离得到^[3]。

在酶法合成基础上 , 我们希望能继续提高转化率 , 并使反应更利于工业化生产。我们发现乳酸杆菌整细胞也可催化此反应 , 并且具有更高的转化率 , 经过 12.5 h , 转化率达到 50% , 且副产物较少 , 其反应式如下 :

^{*} 上海市科委浦江人才计划资助项目(No. 05PJ14014)

^{**} 通讯作者 Tel: 021-67792659 , Fax: 021-67792559 , E-mail: lzhu@dhu.edu.cn

收稿日期 : 2006-12-13 , 修回日期 : 2007-01-30



以整细胞作为生物催化剂,可以避免酶提取纯化过程中的能量和时间耗费,从而降低生产费用,而且整细胞可重复利用,更适用于可能的规模化生产。本论文讨论了整细胞合成中 pH 值、缓冲液种类、底物浓度、细胞加入量、反应时间等条件的影响,并尝试探讨了本反应中乳酸杆菌整细胞催化的可能机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 瑞士乳酸杆菌(*Lactobacillus helveticus*) ATCC 8018

1.1.2 培养基^[4] 蛋白胨 20 g, 磷酸二氢钾 2 g, 结晶硫酸钠 8.2 g, 水合硫酸锰 0.038 g, 柠檬酸氨 2 g, 溶解于一定体积水中,调节 pH 为 6.85,定容至 1 L, 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 15 min,葡萄糖 1 g/mL 酵母膏 0.5 g/mL, 0.5×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 10 min。在接种前,将培养基复配为:1 L 溶液中,蛋白胨 20 g,磷酸二氢钾 2 g,结晶硫酸钠 8.2 g,水合硫酸锰 0.038 g,柠檬酸氨 2 g,葡萄糖 20 g,酵母膏 5 g。

1.2 方法

1.2.1 完整细胞制备 200 mL 培养基中加入 3% (V/V) 种子液,40℃,120 r/min,摇瓶培养 40 h。之后,10000 r/min 离心 10 min 得菌体。以 50 mmol/L, pH 6.85 的 NaH_2PO_4 缓冲液振荡洗涤菌体,10000 r/min 离心 10 min,反复 3 次得纯净整细胞。

1.2.2 整细胞催化 D-D4FC 合成 2 mL 50 mmol/L pH = 6.85 的 NaH_2PO_4 缓冲液中,加入 D4T 11.2 mg (25 mmol/L),5-FC 12.8 mg (50 mmol/L),及 60% (湿菌质量/反应液体积) 菌体于 5 mL 的锥形瓶中,以多层纱布封口。在 40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 12.5 h。反应结束,将反应体系 -20℃ 冷冻以终止。样品解冻后以 10000 r/min,15 min 离心去除整细胞,所得清液过滤后,用于 HPLC 检测。

1.2.3 分析方法 采用 Supelco, C18, Φ 4.6 mm \times

150 mm 色谱柱,流速 0.7 mL/min,在 270 nm 处检测。以如下方法分析:4 min,甲醇/水 = 5/95;4 min ~ 10 min,甲醇/水 = 5/95 ~ 25/75;10 min ~ 19 min,甲醇/水 = 25/75;19 min ~ 21 min,甲醇/水 = 25/75 ~ 5/95;22 min ~ 24 min,甲醇/水 = 5/95。D-D4FC、5-FC、D-D4T 及胸腺嘧啶的 tR 参考值分别为 5.498 min、5.798 min、7.848 min 及 17.807 min (见图 1)。

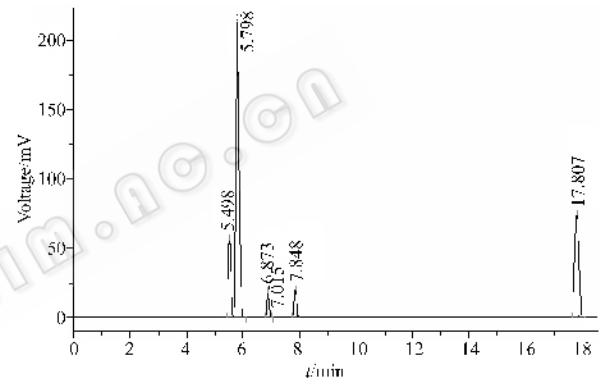


图 1 整细胞合成 D-D4FC 的 HPLC 结果

HPLC 测得的 D-D4FC 和 D4T 摩尔含量用于计算 D-D4FC 转化率: D-D4FC 转化率 = D-D4FC 摩尔含量 / (D-D4FC 摩尔含量 + D4T 摩尔含量)。

2 结果

2.1 pH 值的选择

本实验室在之前的研究中已经确定瑞士乳酸杆菌(*Lactobacillus helveticus*) ATCC 8018 的最佳生长条件 pH = 6.85,其所含 N-脱氧核糖转移酶催化的最佳条件 pH = 6.35。所以在选择 pH 值时,我们主要考察 pH 值为 6.35 和 6.85 两个点,结果如表 1 所示。由表 1 数据可以看出:在 pH = 6.85 下,D-D4FC 的转化率更高,这可能是因为此条件对菌种生长更有利。所以我们选定 pH = 6.85 作为反应条件。

2.2 缓冲液类型的选择

我们检测了几种不同缓冲液中的反应情况,得到表 2 数据,可以看出:在 NaH_2PO_4 和 KH_2PO_4 缓冲

液中反应转化率都较好 ,NaH₂PO₄ 缓冲液中转化率更高 ;而在柠檬酸胺缓冲液中 ,转化率非常低 ,且 HPLC 检测发现在此缓冲液中副产物显著增加。所以我们选择了 50 mmol/L pH6.85 NaH₂PO₄ 缓冲液作为反应体系。

表 1 不同 pH 对反应转化率的影响

pH	D-D4FC 产率
6.85	37.86%
6.35	32.81%

注 :条件 :1 mL NaH₂PO₄ 缓冲液中 ,D4T 5.6 mg(25 mmol/L) ,5-FC 6.4mg(50mmol/L) ,湿菌 50% 40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 20 h 。

表 2 不同缓冲液对 D-D4FC 转化率的影响

缓冲液 类型	50 mmol/L NaH ₂ PO ₄	50 mmol/L KH ₂ PO ₄	50 mmol/L 柠檬酸胺	50 mmol/L Tris
D-D4FC 转化率(%)	24.48	19.50	< 10%	17.06

注 :条件 :1 mL pH6.85 缓冲液中 ,D4T 5.6 mg(25 mmol/L) ,5-FC 6.4 mg (50 mmol/L) ,湿菌(以同种缓冲液洗涤)30% ,40℃ 空气摇床中以 120r/min 振荡反应 20 h

2.3 底物浓度的选择

由于 5-FC 价格比较低 ,所以我们选择 D4T 与 5-FC 的比例为 1:2 进行反应 ,并在此基础上考察了不同浓度下 D-D4FC 的转化率 ,得到表 3 中数据。由表 3 可以看出 :在 D4T 浓度为 25 mmol/L 5-FC 为 50 mmol/L 的条件下 ,反应转化率最高 ,故选择此条件作为最佳反应浓度。

表 3 底物浓度对 D-D4FC 转化率的影响

D4T(mmol/L):			
5-FC(mmol/L)	12.5:25	25:50	50:100
D-D4FC 转化率 %	27.16	37.86	34.46

注 :条件 :1mL NaH₂PO₄ 缓冲液中 ,D4T 5-FC = 1 2 ,湿菌 50% 40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 12.5 h

2.4 加菌量的确定

从图 2 可以看到加菌量为 60% 时 ,D-D4FC 转化率可达到最高。随着反应体系中 ,细胞量继续增加而转化率开始降低。这可能是由于加菌量增加后 ,体系粘稠度较大 ,不利于反应产物及时扩散 ,从而阻碍了反应向 D-D4FC 生成方向移动。

2.5 反应时间的确定

在测定反应转化率随时间的变化时发现很有

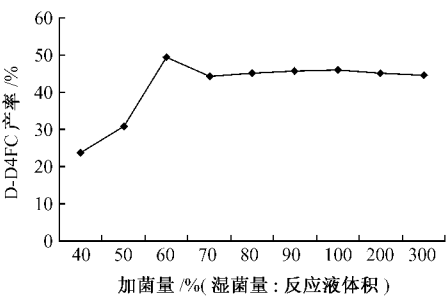


图 2 加菌量对 D-D4FC 转化率的影响

条件 :1 mL pH= 6.85 NaH₂PO₄ 缓冲液中 ,D4T 5.6 mg(25 mmol/L) , 5-FC 6.4 mg(50 mmol/L) ,加入不同质量湿菌 ,40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 12.5 h

趣的现象 ,如图 3 :在 12.5 h ,反应转化率达到一个很高的水平 ,为 49.40% 40h 时 ,又降低为 20.98% ;而后转化率随时间又不断上升。这一现象正好与我们以前测定的此菌种的生长曲线相契合 :在 0h ~ 8h 这一时期 ,瑞士乳酸杆菌处于生长的延滞期 ;在 8h ~ 40h 乳酸杆菌处于对数生长期 ,活菌数迅速提高 ;在 40h ~ 64h 瑞士乳酸杆菌处于生长稳定期^[4]。对比整细胞催化反应与细胞的生长曲线 ,可以发现 ,达到最高转变点 12.5h 正是乳酸杆菌刚刚进入对数生长期 ,曲线的最低转变点 40h 正是菌体生长达到稳定的时间。

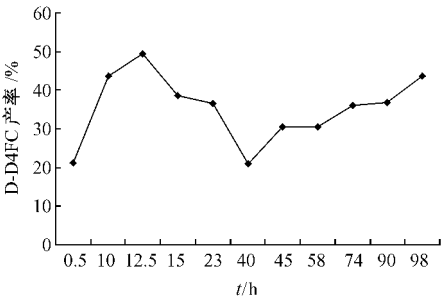


图 3 D-D4FC 转化率随时间变化曲线*

* 条件 :1 mL pH = 6.85 NaH₂PO₄ 缓冲液中 ,D4T 5.6 mg (25mmol/L) 5-FC 6.4 mg (50 mmol/L) ,湿菌 60% ,40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 ,不同时间点取样测定

我们知道 ,*Lactobacilli* 依据其生长是否需要脱氧核苷可分为两类 ,*Lactobacillu* 这类含有 N-脱氧核糖转移酶和脱氧核糖激酶的菌种 ,需要脱氧核苷 ,嘌呤 ,嘧啶以完成其 DNA 的复制 ,并且可以吸收外源核苷^[5]。本实验所用菌株 *Lactobacillus helveticus* 正属于 *Lactobacillu*。本实验所用底物 D4T 和 5-FC 是天然核苷类似物 ,都可作为抗病毒药物 ,在人体内被病毒不可识别地用于其 DNA 或 RNA 链的合成

中,引起病毒 DNA 或 RNA 链合成终止而达到抗病毒的效果^[6]。N-脱氧核糖转移酶是胞内酶,胞内酶催化反应有两种机理,一是细胞吸收反应物,反应在细胞体内由酶催化完成,之后将产物通过代谢排出体外;另一种情况是,随着细胞死亡,细胞壁自融,细胞体内的酶扩散到胞外反应体系中催化反应。

据以上所述理论,我们推测,本反应很可能在最初的 12.5 h 内,由于乳酸杆菌快速生长需要核苷完成其 DNA 复制,所以反应底物 D4T 和 5FC 被细胞不识别地吸收,在胞内被 N-脱氧核糖转移酶催化生成 D-D4FC,而后 D-D4FC 被排出细胞体,从而 D-D4FC 不断积累而达到 50% 转化率。这一过程应包含正逆两个方向的反应,即 D4T 转化为 D-D4FC 以及 D-D4FC 转化为 D4T。由于在开始的 12.5 h 内 D4T 浓度高,所以反应向生成 D-D4FC 方向转移。从 12.5 h 直到 40 h, D-D4FC 的转化率又持续下降,可能在这段时间内,细胞更倾向于吸收 D-D4FC 而催化其转化为 D4T,但仍无法解释 12.5h~40h 这段曲线。40 h 之后,可能由于细胞达到稳定期和衰退期,细胞死亡伴随着胞内酶的持续释放而使 D-D4FC 重新生成。但 HPLC 结果显示,随着反应时间的加长,副产物增加的速度大于 D-D4FC 增加的速度,所以反应总时间控制在 12.5 h 较好。

由于以上的假设不能完全解释图 3 所得结果,所以我们也考虑到另一因素的影响。由于本研究中所用底物 D4T、5-FC 是天然核苷类似物,细胞可以无识别地吸收,但这些物质一旦在细胞体内参与其 DNA 的复制过程,将引起其 DNA 链的终断而导致细胞中毒死亡。所以,有可能在最初的 12.5h,细胞由于快速生长的需要,吸收 D4T、5-FC 进入体内, D-D4FC 被迅速合成,转化率迅速达到约 50%,而后,由于 D4T、5-FC 引起细胞 DNA 复制中断而使其

大量死亡,所以,在 12.5h~40h 出现异常, D-D4FC 转化率降低。随着时间的增加,细胞逐渐对 D4T、5-FC 产生抗体,所以继续吸收并在体内合成使其转化率再次增加,副产物的增加也可能与此情况有关。当然,此体系中细胞催化的真实情况,还有待于对乳酸杆菌在此反应体系中的生长情况及特性做进一步的研究。

3 讨论

本实验用乳酸杆菌整细胞代替 N-脱氧核糖转移酶粗品催化 D4T 和 5FC 转化为 D-D4FC,取得了一些成果,使反应转化率由粗酶催化的 25% 达到了约 50%,时间由粗酶催化的 24 h 减少为 12.5 h。我们得到的优化条件为:1 mL pH6.85 NaH_2PO_4 缓冲液中, D4T 5.6 mg (25 mmol/L), 5-FC 6.4mg (50mmol/L),湿菌量 60%,40℃ 空气摇床中以 120 r/min 振荡反应 12.5h。在此条件下,副产物含量较少。整细胞可回收再利用,以整细胞作为催化剂节约能源和时间,有利于可能的工业化生产。但整细胞催化的问题在于副产物较粗酶催化稍多,若能通过菌株的筛选使乳酸杆菌体富产 N-脱氧核糖转移酶,减弱其它酶的影响,将对反应更加有利。

参考文献

- [1] Schinazi R F, Mellors J. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 **46**(5): 1394~1401.
- [2] Cohen C, Katlama C. 3th IAS Conference 2005, Rio de Janeiro, Brazil. (Aavailable at: <http://www.thebody.com/confs/ias2005/wainberg3.html>)
- [3] Fu S J, Zhu L M. *Biocatal and Biotransform* 2006 **24**(4): 253~256.
- [4] 傅绍军,朱利民. *药物生物技术* 2005 **12**(6): 361~365.
- [5] Kaminski P A. *J Biol Chem* 2002 **277**(17): 14400~14407.
- [6] De Clercq E. *Biochim Biophys Acta* 2002 **1587**: 258~275.