

辛伐他汀的生物合成

杨仲毅, 甘春晖

浙江海正药业股份有限公司, 台州 318000

摘要: 辛伐他汀是洛伐他汀的半合成衍生物, 传统的生产工艺是以洛伐他汀为原料, 经化学合成得到辛伐他汀。洛伐他汀的直接甲基化方法已成为目前生产上使用最多的工艺路线。化学合成工艺的不足之处乃在于化学法合成过程中, 反应条件苛刻, 副反应多, 产品分离纯化难度大以及来自环保和劳动保护的壓力。近年来, 随着洛伐他汀生物合成途径研究的深入, 人们已经将更多的注意力转向辛伐他汀的生物合成。就辛伐他汀侧链的化学水解路线和洛伐他汀的生物合成途径的国内外研究结果进行了分析比较, 进一步阐述了辛伐他汀生产中可实现生物催化的反应步骤以及用于辛伐他汀直接发酵生产的基因工程菌构建。

关键词: 辛伐他汀, 生物合成

Biosynthesis of Simvastatin – a mini-review

Zhongyi Yang, and Chunhui Gan

Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd, Taizhou 318000, China

Abstract: Simvastatin, a semisynthetic derivative of lovastatin, is an important drug for the treatment of hypercholesterolemia, and is traditionally prepared by direct alkylation of lovastatin. Chemical reaction conditions are very rigid, and the final product is difficult to purify, also the pressure of labor protection and environment protection is very high. Recently, with the development in the research of lovastatin biosynthesis, more and more attention has been paid to simvastatin biosynthesis. This paper compared the chemical and biological routes in simvastatin production. Simvastatin could be produced by direct fermentation with combinational biosynthesis method, and could also be synthesized from monacolin J with acyltransferase *LovD*.

Keywords: simvastatin, biosynthesis

辛伐他汀(simvastatin)是 Merck 公司研制的降血脂药, 商品名 Zocor, 其药理作用是作为竞争性抑制剂抑制肝脏细胞内羟甲戊二酰辅酶 A 还原酶(HMG-CoA reductase)活力, 限制 HMG-CoA 向甲基二羟戊酸的转化, 从而减少内源总胆固醇的生物合成总量^[1]。与相同剂量的洛伐他汀(lovastatin)、普伐他汀(pravastatin)和氟伐他汀(fluvastatin)等其他 HMG-CoA 还原酶抑制剂相比, 辛伐他汀可以更有效地降低血清中的总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇

(LDL-cholesterol)^[1]。本品自 1992 年在美国上市后, 多年来一直处于畅销药行列的前三名^[2], 随着 2006 年专利到期, Merck 公司 2006 年辛伐他汀的销售额比 2005 年下降了 36%, 为 28 亿美元^[3], 辛伐他汀的工艺技术研究和生产成本已成为产品竞争的重要因素。

从辛伐他汀和洛伐他汀的分子结构看, 两者仅相差一个甲基, 传统的生产工艺是以洛伐他汀为原料经全化学合成得到辛伐他汀^[4,5]。随着分子生物学

和代谢工程研究的深入, 辛伐他汀的生物合成逐渐得到学界和产业界的重视。本文就生物合成辛伐他汀的研究进展及其与化学合成法的比较, 综述如下。

1 辛伐他汀的化学合成路线

辛伐他汀是洛伐他汀的半合成衍生物, 辛伐他汀只是在其 C-8 位丁酸酯侧链的 α -碳原子上比洛伐他汀多一个甲基(图 1)。1984 年, Hoffman 等发表了以洛伐他汀为起始原料, 化学合成辛伐他汀的侧链水解路线^[6], 相关的化学反应主要包括脱酯化、羟基

保护、重新酯化、脱保护四个步骤, 但该路线所需时间长、收率低, 脱酯化反应的副产物较多, 因而给产物分离纯化带来不利影响。有关侧链水解的脱脂反应有多种报道, 一种是在 -30 的四氢呋喃中加入叔丁醇钾与洛伐他汀反应; 或者, 洛伐他汀和 LiOH 在通 N_2 条件下加热回流反应 56 h; 另外, 韩国专利报道了洛伐他汀在氢氧化钾溶液中的油浴回流脱脂化反应。脱脂化反应产物的分离纯化过程使用了二乙基醚、二氯甲烷、乙醚等有机溶剂, 脱脂化水解收率为 75%~98%, 水解之后合成辛伐他汀的收率水平也有差异, 50% 到 80% 不等(图 2)^[7-10]。

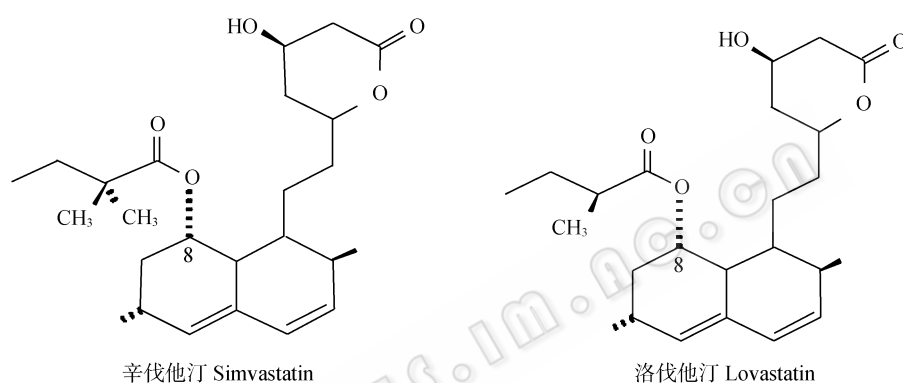


图 1 辛伐他汀和洛伐他汀的结构

Fig. 1 Structure of Simvastatin and Lovastatin

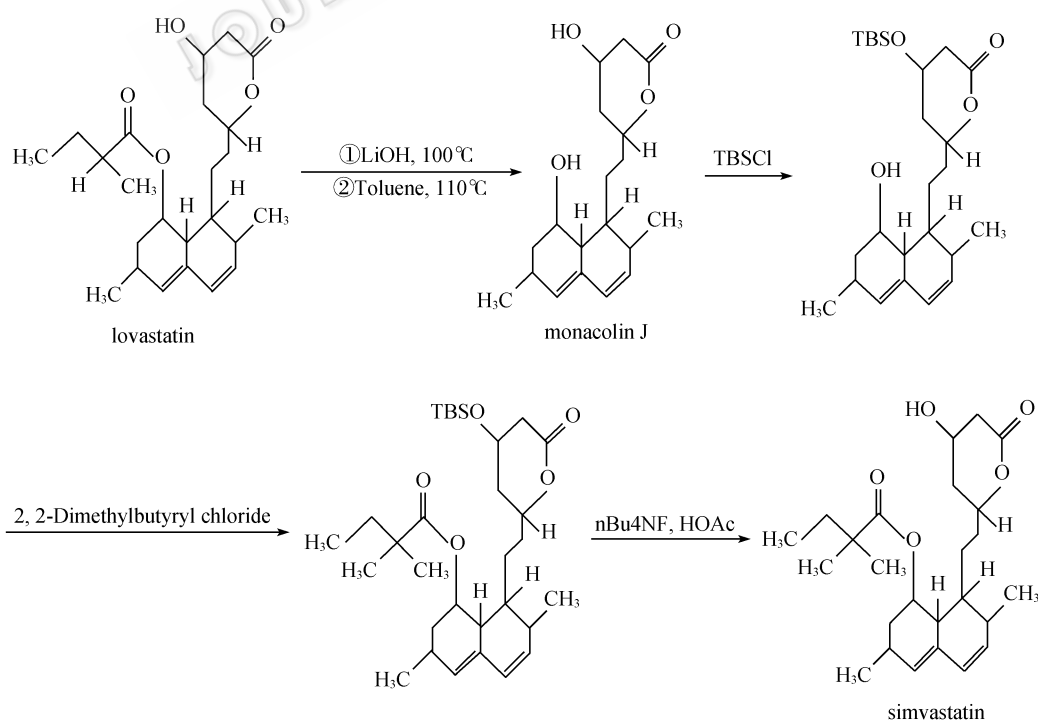


图 2 化学合成辛伐他汀的侧链水解路线

Fig. 2 Side-chain hydrolysis route of Simvastatin chemical synthesis

1986年, Sleiteinger等发表了洛伐他汀的直接甲基化路线^[11], 该路线经 Verhoeven^[4](1989年)、Kumar^[5](1998年)等修改提高, 成为目前生产上使用最多的工艺路线。直接甲基化路线需要多种昂贵的或危险的化学试剂。根据具体技术细节的变化及实验规模, 文献资料上的总体收率水平在60%到80%之间^[4,5,12,13]。鉴于洛伐他汀和辛伐他汀结构上的类似性, 采用甲基化路线合成辛伐他汀需要控制洛伐他汀的残留, 否则在产物中很难将两者分离。

2 洛伐他汀生物合成研究及其与辛伐他汀的相关性

由于化学法合成过程条件苛刻, 副反应多, 产

品分离纯化难度大, 以及环保和劳动保护的壓力, 人们已经将更多的注意力转向辛伐他汀的生物合成。

辛伐他汀的侧链水解路线及洛伐他汀的生物合成途径^[14-18]是生物法合成辛伐他汀的理论基础。在产生菌土曲霉(*Aspergillus terreus*)的洛伐他汀代谢途径中, 乙酸和丙二酸的二碳和三碳单位经 *LovB*、*LovC* 基因编码的聚酮合成酶及 *LovA* 基因编码的P450加氧酶的作用下形成中间体莫那克林J (Monacolin J)。与此同时, *LovF* 基因编码的二酮合成酶则催化乙酸和丙二酸单位缩合为甲基丁酸侧链, 并在 *LovD* 基因编码的酰基转移酶的作用下, 被转移到莫那克林J分子的C-8位羟基上成为最终产物洛伐他汀^[19](图3)。

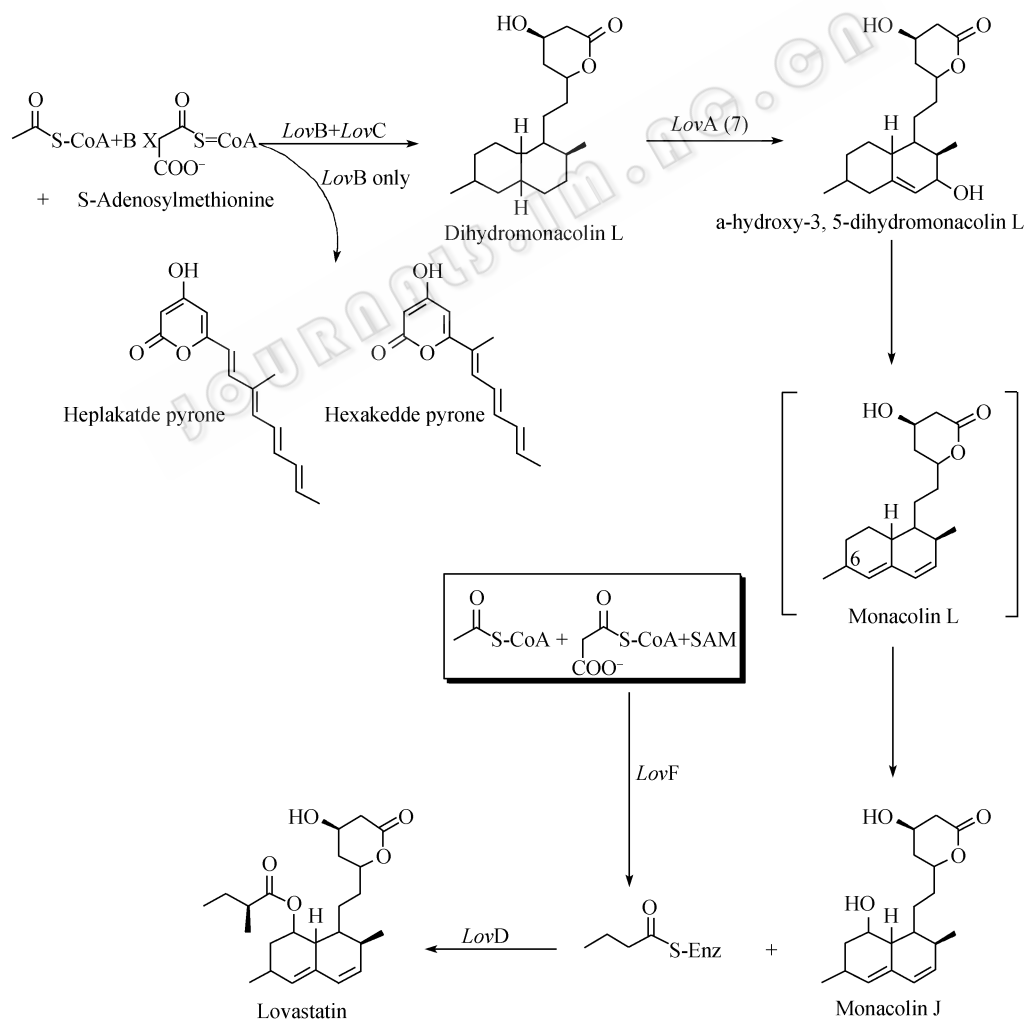


图3 洛伐他汀生物合成途径
Fig. 3 Biosynthesis of Lovastatin

在上述洛伐他汀生物合成过程中,莫那克林 J 既是洛伐他汀合成的前体,又是辛伐他汀化学合成时,侧链水解后形成的中间体。因此,莫那克林 J 也可以直接用于辛伐他汀的合成。

3 生物学方法制备辛伐他汀

分析辛伐他汀的化学合成工艺和洛伐他汀生物合成途径,发现辛伐他汀化学合成中的下述三方面反应可望以分子操作或酶催化的生物学方法所取代:

1. 洛伐他汀到莫那克林 J 的生物转化; 2. 莫那克林 J 到辛伐他汀的生物转化; 3. 辛伐他汀的全生物合成。

3.1 洛伐他汀生物合成的中断和莫那克林 J 的积累

莫那克林 J 可以通过中断洛伐他汀生物合成途径或由洛伐他汀水解得到。

从图 2 的洛伐他汀生物合成途径可以看出,只要将 *LovD* 基因编码的酰基转移酶或 *LovF* 基因编码的二酮合成酶中断后,就可以积累莫那克林 J^[18,20]。

在洛伐他汀生物合成中还有一个调控基因 *LovE*, 增加该基因的拷贝数可以大幅度提高野生型土曲霉的洛伐他汀或莫那克林 J 产量^[17,18], 但这是在野生型菌株上得到的结论,而在实际生产中,生产菌株往往是经过各种诱变筛选而得的高产变种,产量已经在 10 g/L 以上,希望通过这种办法再大幅度提高洛伐他汀产量可能存在一定难度。鉴于现有菌种的莫那克林 J 发酵水平偏低,因而尚难实现大规模工业化生产的情况下,我们认为采用 *LovD* 或 *LovF* 基因中断与诱变筛选相结合的方法,构建莫那克林 J 高产菌株值得尝试。

此外,莫那克林 J 还可以通过洛伐他汀的酶法水解得到^[21-23]。Komagata 首先报道了 *Emericella unguis* 菌丝体对洛伐他汀的水解作用^[21], 其转化率为 86%; Timothy 等从 *C. compactiuscula* ATCC 38009 菌中分离纯化出 46 kD 的洛伐他汀酯酶,以 10mmol/L 洛伐他汀为底物,2 h 后转化率为 80%,洛伐他汀酯酶对底物选择性较高,可以用于辛伐他汀产品中残留洛伐他汀的去除^[23]。

3.2 以莫那克林 J 为底物,酶促合成辛伐他汀

酰基转移酶(*LovD*)是洛伐他汀生物合成途径中的一个关键酶,该酶对于酰基载体、酰基底物及受体具有较广的底物专一性,可以催化酰基从辅酶 A

硫酯或 N-乙酰半胱氨酸硫酯向莫那克林 J 的转移。当 α -二甲基丁酰基-N-乙酰半胱氨酸硫酯(α -dimethylbutyryl-SNAC)作为酰基供体时,酰基转移酶可分别催化 Monacolin J 和 6-hydroxy-6-desmethylmonacolin J 转化生成辛伐他汀和 huvastatin^[24]。

Xie 等^[24]已从 *A. terreus* 菌克隆获得酰基转移酶的编码基因并在 *E. coli* 中高表达。利用所得工程菌休止细胞可以直接催化莫那克林 J 到辛伐他汀的转化,转化率达到 99%^[25]。相比洛伐他汀的甲基化合成路线,休止细胞催化的反应过程不需要任何的化学保护试剂,关键是找到了已被活化且膜透性的底物 α -dimethylbutyryl-S-methyl-mercaptopyruvate (DMB-S-MMP),该底物是酰基转移酶有效的酰基供体。从反应液纯化目标产物的收率达 90%,产品纯度 98%。

3.3 发酵法制备辛伐他汀

对于抗生素来说,采用传统的筛选方法获得新抗生素的几率越来越低,而组合生物合成(combinational biosynthesis)的出现,为获得新的微生物药物提供了新的来源。近年来,组合生物合成主要应用于聚酮合成酶(polyketide synthase, PKS)基因的改造。洛伐他汀、阿佛菌素、埃博霉素、红霉素等聚酮化合物的合成均是由聚酮合成酶催化的。其中 I 型聚酮合成酶(type I PKSs)是一个多酶体系,由酮合成酶(ketosynthase, KS)、酰基转移酶(acyltransferase, AT)、脱水酶(dehydratase, DH)、烯醇还原酶(enoyl reductase, ER)、酮还原酶(ketoreductase, KR)和酰基载体蛋白(acyl carrier protein, ACP)及硫酯酶(thioesterase TE)等功能域通过共价交联形成。小分子碳单位在聚酮合成酶的催化下缩合及加工,最终形成复杂的聚酮化合物。聚酮合成酶的这种装配线式的工作原理,使得人们可以经过基因工程改造,对聚酮合成酶进行“程序化”设计,增加、减少或使某些功能域或模块失活,从而最终得到目的药物的类似物或新的生物活性物质^[26-28]。

土曲霉 *A. terreus* 中洛伐他汀生物合成的基因簇已经全部分离得到并测序^[17],其中 *Lov F* 基因编码洛伐他汀二酮合成酶(LDKS)。在洛伐他汀侧链的生物合成过程中,LDKS 的酮合成酶(KS)催化起始酸(starter acid)和延伸酸(extension acid)的缩合反应,

起始酸和延伸酸的选择性由酰基转移酶(AT)决定。侧链的 2 位甲基由 LDKS 中的甲基转移酶(methyltransferase, MET)催化。洛伐他汀侧链合成的起始酸和延伸酸分别是乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A。不同物种的 AT 对起始酸的选择性不同, 红霉素聚酮合成酶的 AT 域专一性选择丙酰辅酶 A 作为起始酸, 而阿佛菌素聚酮合成酶则可以以多种酸作为起始酸^[29]。

印度 Ranganathan^[30]将不同来源的聚酮合成酶(PKS)功能域 DNA 序列组合成多种不同的洛伐他汀二酮合成酶基因, 并在土曲霉中表达, 直接发酵产生辛伐他汀。首先是构建了“量身定制基因”(customised gene), 以编码适合于合成辛伐他汀的 2, 2-二甲基丁酸侧链的聚酮合成酶。用来组合的功能域 DNA 分别来源于洛伐他汀 PKS、埃博霉素 PKS、红霉素 PKS、耶尔辛菌素 PKS 等。然后将该质粒转到土曲霉宿主菌中, 所用的宿主菌是洛伐他汀二酮合成酶基因失活的土曲霉突变株, 可以在体内积累莫那克林 J, 但不能合成甲基丁酸侧链, 因此也不能合成洛伐他汀, 而外源的 2, 2-二甲基丁酸侧链合成的聚酮合成酶则可以在体内合成辛伐他汀的侧链, 并在酰基转移酶的作用下与莫那克林 J 合成辛伐他汀。经过发酵后, 不同组合的 2, 2-二甲基丁酸聚酮合成酶工程菌辛伐他汀的产量达到 44~109 单位/L。这一结果证明了直接生物合成辛伐他汀的可能性; 另一方面也间接说明, 得到具有生产应用价值的分子改造菌种需要非常大的运气和努力, 但是一旦突破, 就会产生明显的社会和经济效益。

4 辛伐他汀生物合成工艺路线分析

随着辛伐他汀专利的到期, 常规化学法生产工艺既要承受辛伐他汀售价下降的压力, 又要承受环境保护和劳动保护的压力的压力, 寻找更加合理的工艺已经非常迫切。在洛伐他汀水解为莫那可林 J 后, 利用酰基转移酶转化为辛伐他汀确实是目前非常值得关注的工艺路线。如上所述, 莫那可林 J 分子改造需要解决产量下降幅度问题, 而 LiOH 碱性裂解工艺可以确保收率在 70%~98%, 溶剂及反应条件继续优化后 EHS 压力是可以承受的。

如果酰基转移酶固定化转化成功, 辛伐的生产将变成常规水相反应。需要考虑的是生产效率问题, 文

献[24]中的转化反应时间为 17 h, 反应浓度为 1.5 g/L, 反应条件需要继续优化。

另一个需要考虑的因素是辛伐他汀侧链的合成, 生物法辛伐合成的 EHS 压力减轻了, 但相应增加了侧链合成时的 EHS 压力。

综上所述, 在辛伐他汀的化学合成过程中引入生物法, 从技术路线到收率水平都具有了一定的基础, 随着洛伐他汀代谢途径分子操作和酶工程的进展, 生物合成将在他汀类药物生产中发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Plosker GL, McTavish D. Simvastatin: a reappraisal of its pharmacology and therapeutic efficacy in hypercholesterolaemia. *Drugs*, 1995, **50**: 334–363.
- [2] Ying HH, Du DZ, Zhan Y, *et al.* Current situation and prospect of development of lipid-lowering drugs. *Herald of Medicine*, 2005, **24**(6): 503–504.
应黄慧, 杜东征, 詹毅, 等. 降血脂药物的研究现状与前景. *医药导报*, 2005, **24**(6): 503–504.
- [3] Merck Co Inc. Merck Announces 2006 Financial Results that Demonstrate Solid Revenue Growth. Press Release, 2007, January 30.
- [4] Verhoeven TR, Askin D. Process for α -C-alkylation of the 8-acyl group on mevinolin and analogs there of US Patent, 4820850, 1989.
- [5] Kumar Y, Thaper RK, Misra S, *et al.* Process for manufacturing simvastatin from lovastatin or mevinolinic acid US Patent, 5763646, 1998.
- [6] Hoffman WF, Smith RL, Willard AK. Antihypercholesterolemic compounds. US Patent, 4444784, 1984.
- [7] Zhu BL, Ren LH. Synthesis of simvastatin. *Qilu Pharmaceutical Affairs*, 2006, **25**(7): 422–423.
朱宝雷, 任立华. 辛伐他汀的合成. *齐鲁药事*, 2006, **25**(7): 422–423.
- [8] Zhu ZY, Wu TZ, Mou L. Synthesis of simvastatin. *Zhejiang Chemical Industry*, 2002, **33**(1): 49.
朱元元, 吴庭照, 牟玲. 辛伐他汀的合成. *浙江化工* 2002, **33**(1): 49.
- [9] Chen YY. Research on simvastatin. *Fine and specialty chemicals*. 2003, **10**: 16–18.
陈宇瑛. 辛伐他汀的研究. *精细与专用化学品*, 2003, **10**: 16–18.
- [10] Ha Tae Hui (KR). Improved process for preparation of simvastatin. South Korea patent, KR20030060425. 2003-07-16.
- [11] Sleteinger M, Verhoeven T, Volante R. One step process for C-methylation of 2-methylbutyrates. US Patent, 4582915, 1986.

- [12] Ren SM, Xu J, Sun KM. Semi-synthesis of simvastatin. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2003, **13**(1): 38–39.
任素梅, 徐杰, 孙明昆. 辛伐他汀的半合成. *中国药物化学杂志*, 2003, **13**(1): 38–39.
- [13] Jiang JR, Jin HR. Development in synthesis of simvastatin. *Zhejiang Chemical Industry*, 2006, **37**(2): 20–22.
蒋军荣, 金红日. 辛伐他汀合成进展. *浙江化工*, 2006, **37**(2): 20–22.
- [14] Gao L, Li HM. Advances in the studies of lovastatin biosynthesis and its related genes. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2005, **12**(3): 201–206.
高蓝, 李浩明. 洛伐他汀生物合成及其相关基因研究进展. *药物生物技术*, 2005, **12**(3): 201–206.
- [15] Manzoni M, Rollini M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**(5): 555–564.
- [16] Hendrickson L, Davis CR, Roach C, *et al.* Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: Characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol*, 1999, **6**: 429–439.
- [17] Kenndy J, Auclair K, Kendrew SG, *et al.* Modulation of polyketides synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*, 1999, **284**: 136.
- [18] Park C, Hutchinson CR, Kennedy J. Method of producing antihypercholesterolemic agents. US Patent, 2004033570, 2004-02-19.
- [19] John LS, Karine A, Jonathan K, *et al.* Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the lovA and lovC genes. *Org Biomol Chem*, 2003, **1**: 50–59.
- [20] Hutchinson CR, Kennedy J, Park C. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, **78**(3-4): 287–295.
- [21] Komagata D, Yamashita H, Endo A. Microbial conversion of compactin (ML-236B) to ML-236A. *J Antibiot*, 1986, **39**: 1574–1577.
- [22] Komagata D, Shimada H, Murakawa S, *et al.* Biosynthesis of monacolins: conversion of monacolin L to monacolin J by a monooxygenase of *Monascus ruber*. *J Antibiot* (Tokyo). 1989, **42**(3): 407–412.
- [23] Schimmel TG, Borneman WS, Conder MJ. Purification and characterization of a lovastatin esterase from *clonostachys compactuscula*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 1307–1311.
- [24] Xie X, Watanabe K, Wojcicki WA, Wang CC, Tang Y. Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase. *Chem Biol*, 2006, **13**(11): 1161–1169.
- [25] Xie X, Tang Y. Efficient Synthesis of Simvastatin Using Whole-Cell Biocatalysis. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(7): 2054–2060.
- [26] McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C, *et al.* Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel “unnatural” natural products. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**(5): 1846–1851.
- [27] Ranganathan A, Timoney M, Bycroft M, *et al.* Knowledge-based design of bimodular and trimodular polyketide synthases based on domain and module swaps: a route to simple statin analogues. *Chem Biol*, 1999, **6**(10): 731–741.
- [28] Gokhale RS, Tsuji SY, Cane DE, *et al.* Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science*, 1999, **284**(5413): 482–485.
- [29] Dutton CJ, Gibson SP, Goudie AC. Novel avermectins produced by mutational biosynthesis. *J Antibiot* (Tokyo), 1991, **44**(3): 357–365.
- [30] Ranganathan A. Process for the preparation of simvastatin. WO Patent, 03010324. 2003-02-06.

《生物工程学报》2008年新网页、新系统正式开通

伴随着新年的钟声,《生物工程学报》以崭新的面貌迎来2008年。继我刊改为月刊之后,2008年1月1日又将更新网页,开通新的稿件处理系统,新网址为 <http://journals.im.ac.cn/cjbcn>, 欢迎广大作者、读者和审稿专家登陆浏览。

为保证新旧系统的平稳过渡,我们将保留原系统一段时间,在新址首页设置“旧版入口”,作者和审稿专家若需要查询或审阅2007年12月29日之前投来的稿件(即编号带有gc2007-前缀的稿件),请从这里点击进入。相信新的系统将使稿件处理更加方便快捷,但因为使用初期有一个磨合的过程,可能会给您带来一些不便,对此我们深表歉意。

您在使用过程中有任何问题,或者有任何建议和意见,欢迎随时与编辑部联系。

电话: 010-64807509; E-mail: cjb@im.ac.cn。

《生物工程学报》编辑部