



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111378640 A

(43)申请公布日 2020.07.07

(21)申请号 202010171563.2

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2020.03.12

C12P 7/40(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

(71)申请人 东莞市东阳光生物合成药有限公司

地址 523871 广东省东莞市长安镇长安振
安中路368号3号楼114室

(72)发明人 林洁 王小龙 何玉兰 张枝

叶燕全 韦德活 张嘉杰 屈代鑫
胡盛本 麦倩婷

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 肖阳

(51)Int.Cl.

C12N 9/88(2006.01)

C12N 15/60(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

制备右旋酰胺酮洛芬的方法

(57)摘要

本发明提出了一种制备右旋酰胺酮洛芬的方法。该方法包括使氰基酮洛芬在脘水合酶的催化下进行酰胺化反应,以便获得右旋酰胺酮洛芬,所述脘水合酶来源于Rhodococcus。发明人发现,来源于Rhodococcus的脘水合酶对右旋氰基酮洛芬的特异性识别能力更强,使用来源于Rhodococcus的脘水合酶制备右旋酰胺酮洛芬,可大大提高右旋酰胺酮洛芬的转化率,提高右旋酰胺酮洛芬的ee值。

1. 一种用于右旋酮洛芬的合成的酶组合,其特征在于,包括:脞水合酶和酰胺酶,所述脞水合酶来源于Rhodococcus。

2. 根据权利要求1所述的酶组合,其特征在于,所述脞水合酶具有SEQ ID NO:1~3所示的氨基酸序列。

3. 一种制备右旋酰胺酮洛芬的方法,其特征在于,使氰基酮洛芬在脞水合酶的催化下进行酰胺化反应,以便获得右旋酰胺酮洛芬,所述脞水合酶来源于Rhodococcus。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述脞水合酶具有SEQ ID NO:1~3所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述脞水合酶是以脞水合酶发酵菌体的形式提供的。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述脞水合酶发酵菌体是通过如下方式获得的:

将转化有质粒的大肠杆菌菌体进行活化处理,所述质粒中携带表达脞水合酶的核酸序列;

将活化处理后菌液进行基础发酵培养,以便获得OD600为30~35的基础发酵培养菌液;

将所述基础发酵培养菌液进行诱导培养,所述诱导培养是在IPTG和FeCl₂存在的条件下进行的,所述诱导培养的时间为14~16h。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述氰基酮洛芬与脞水合酶发酵菌体的质量比为1:(2~4)。

8. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,进一步包括将所述脞水合酶发酵菌体进行干燥处理,以便获得菌体干粉;

优选地,所述氰基酮洛芬与脞水合酶发酵菌体喷干粉的质量比为(1~3):1。

9. 一种制备右旋酮洛芬的方法,其特征在于,依据权利要求3~8任一项所述的方法制备右旋酰胺酮洛芬;

使所述右旋酰胺酮洛芬在酰胺酶的催化下进行脱氨基反应,以便获得右旋酮洛芬。

制备右旋酰胺酮洛芬的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体地,本发明涉及制备右旋酰胺酮洛芬的方法。

背景技术

[0002] 酮洛芬是2-芳基丙酸类非甾体抗炎药(NSAIDs),此类药物均具有一个手性中心,只有右旋体才具有抗炎抗风湿和镇痛作用,左旋体几乎没有药理活性且毒副作用大。

[0003] 目前,市售(S)-(+)-酮洛芬主要合成方法有传统的化学合成法、手性拆分以及生物酶合成法。

[0004] 化学合成法主要是不对称合成可通过6步反应,由烯丙醇通过sharpless环氧化制备得到(2S,3S)环氧化合物,再加入手性位移试剂,经过对映体选择性氢解后生成二醇,在RuO₄/NaIO₄的催化下,最终得到右旋酮洛芬,ee值达到98%这种方法的产率和对映体选择性较为理想,但是均需要用到传统的化学催化剂以促使反应快速进行,而大部分催化剂毒性较高、易燃且会造成环境污染,还有可能引入有害的副产物。

[0005] 另有手性拆分方法,有专利(专利01,CN101928214A)采用国内廉价易得的(-)-葡辛胺作为拆分剂拆分(RS)-酮洛芬,按一定比例混合后升温回流后降温结晶,对酮洛芬利用率达70%。目前也有采用高分子印迹聚合物、色谱法对酮洛芬对映体进行拆分。也有研究利用微生物酶法进行酮洛芬拆分。也有研究利用紫外诱变得到的微生物菌株在一定条件下进行发酵,利用菌体拆分(RS)-酮洛芬。也有研究利用诺维信脂肪酶435催化酮洛芬酯拆分,该研究中,大肠杆菌表达来自于古细菌的嗜热酯酶,利用菌体催化酮洛芬乙酯反应生成右旋酮洛芬。然而,利用酯酶的缺点在于拆分率和产物ee值都不理想,底物浓度偏低问题也难以解决。

[0006] 生物酶合成法可以一定程度是解决底物浓度和产物ee值偏低的问题。目前已有利用脘水合酶和酰胺酶双酶体系制备光学纯酮洛芬的报道。但现有技术的转化率或光学纯度均较低,仍达不到生产要求。

发明内容

[0007] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。为此,本申请的发明人对脘水合酶进行了筛选,发现在特定菌中的脘水合酶对右旋氨基酮洛芬的特异性识别能力强,右旋酰胺酮洛芬的转化率和ee值高。

[0008] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种用于右旋酮洛芬的合成的酶组合。根据本发明的实施例,所述组合包括:脘水合酶和酰胺酶,所述脘水合酶来源于Rhodococcus。发明人发现,来源于Rhodococcus的脘水合酶对右旋氨基酮洛芬的特异性识别能力更强,使用来源于Rhodococcus的脘水合酶和酰胺酶的双酶体系制备右旋酮洛芬,可大大提高右旋酰胺酮洛芬的转化率,提高右旋酰胺酮洛芬和右旋酮洛芬的ee值。

[0009] 根据本发明的实施例,上述酶组合还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0010] 根据本年发明的实施例,所述脞水合酶具有SEQ ID NO:1~3所示的氨基酸序列。

[0011] MDGVHDLAGVQGFQKVPHTVNADIGPTFHAWEHLPYSLMFAGVAELGAFSVDEVRYVVERMEPRHYM MTPYYERYVIGVAALMVEKGILTQEELESLAGGPFPLSRPSESEGRPARIDTTTFEVGQRVVRVDEYVPGHIRMPA YCRGRVGTIAHRTTERWPFDAIGHGRNDAGEEPTYHVTFAAEELFGSDTDGGSVVVDLFEGLYEPAA (SEQ ID NO:1)。

[0012] MSVTIDHTTENAAPAQAPVSDRAWALFRALDGKGLVPDGYVEGWKKTFEEDFSPRRGAELVARAWTDP DFRQLLLTGTAAVAQYGYLGPQGEYIVAVEDTPTLKNVIVCSLCSCTAWPILGLPPTWYKSFEYRARVVREPRKV LSEMGTEIASDVEIRVYDTTAETRYMVLPRPAGTEGWSQEQLQEIVTKDCLIGVAVPVPTV (SEQ ID NO:2)。

[0013] MVDTRLPVTVLSGFLGAGKTTLLNEILRNREGRRVAVIVNDMSEINIDSAEVEREISLSRSEEKLVEM TNGCICCTLREDLLSEISALAADGRFDYLLIESSGISEPLVAETFTFIDTDGHALADVARLDTMVTVDGNSFLR DYTAGGRVEADAPEDERDIADLLVDQIEFADVILVSKADLVSQQHLVELTAVLRSLNATAAIVPMTLGRIPDLTIL DTGLFSLEKAAQAPGWLQELQGERTPETEEYGIGSVVYRERAPFHPQRLHDFLSSKWTNGKLLRAKGYWYVWVGRFT EIGSISQAGHLIRHGYYVGRWVKFLPRDEWPADDYRRDGILDKWEEPVGDCRQELVFIGQAIDPSRLHRELDACLLT TAEIELGPDVWTTWSDPLGIGYTDQTV (SEQ ID NO:3)。

[0014] 其中,SEQ ID NO:1表示来源于Rhodococcus的脞水合酶的 α 亚基(α subunit)的氨基酸序列,SEQ ID NO:2表示来源于Rhodococcus的脞水合酶的 β 亚基(β subunit)的氨基酸序列,SEQ ID NO:3表示来源于Rhodococcus的脞水合酶的副蛋白(accessory protein)的氨基酸序列。

[0015] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种制备右旋酰胺酮洛芬的方法。根据本发明的实施例,所述方法包括使氰基酮洛芬在脞水合酶的催化下进行酰胺化反应,以便获得右旋酰胺酮洛芬,所述脞水合酶来源于Rhodococcus。

[0016] 发明人发现,来源于Rhodococcus的脞水合酶对右旋氰基酮洛芬的特异性识别能力更强,使用来源于Rhodococcus的脞水合酶制备右旋酰胺酮洛芬,可大大提高右旋酰胺酮洛芬的转化率和ee值。

[0017] 根据本发明的实施例,上述制备右旋酰胺酮洛芬的方法还可以进一步包括如下附加技术特征至少之一:

[0018] 根据本发明的实施例,所述脞水合酶具有SEQ ID NO:1~3所示的氨基酸序列。

[0019] 根据本发明的实施例,所述脞水合酶是以脞水合酶发酵菌体的形式提供的。

[0020] 根据本发明的具体实施例,所述脞水合酶发酵菌体是通过如下方式获得的:将转化有质粒的大肠杆菌菌体进行活化处理,所述质粒中携带表达脞水合酶的核酸序列;将活化处理后菌液进行基础发酵培养,以便获得OD600为30~35的基础发酵培养菌液;将所述基础发酵培养菌液进行诱导培养,所述诱导培养是在IPTG和FeCl₂存在的条件下进行的,所述诱导培养的时间为14~16h。

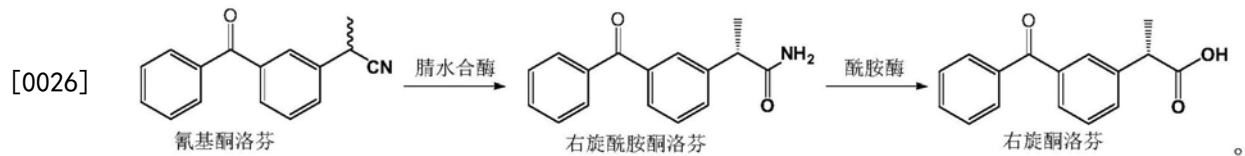
[0021] 根据本发明的实施例,所述氰基酮洛芬与脞水合酶发酵菌体的质量比为1:(2~4),如1:2,1:3,1:4。

[0022] 根据本发明的实施例,进一步包括将所述脞水合酶发酵菌体进行干燥处理,以便获得菌体干粉。

[0023] 根据本发明的实施例,所述氰基酮洛芬与脞水合酶发酵菌体干粉的质量比为(1~3):1,如1:1,2:1,3:1。进而催化反应效率进一步提高。

[0024] 在本发明的第三方面,本发明提出了一种制备右旋酮洛芬的方法。根据本发明的实施例,依据前面所述的方法获得右旋酰胺酮洛芬;使所述右旋酰胺酮洛芬在酰胺酶的催化下进行脱氨基反应,以便获得右旋酮洛芬。

[0025] 根据本发明实施例的上述制备右旋酮洛芬的方法可表示如下:



[0027] 来源于Rhodococcus的腈水合酶对右旋氰基酮洛芬的特异性识别能力更强,使用来源于Rhodococcus的腈水合酶制备右旋酮洛芬,可大大提高右旋酰胺酮洛芬的转化率,提高右旋酮洛芬的ee值。

附图说明

[0028] 图1是根据本发明实施例的蛋白诱导表达的凝胶电泳图;

[0029] 图2是根据本发明实施例5的腈水合酶NH1菌体催化合成右旋酰胺酮洛芬产物样品的HPLC检测结果;以及

[0030] 图3是根据本发明实施例6的腈水合酶NH1喷干酶粉催化合成右旋酰胺酮洛芬产物样品的HPLC检测结果。

具体实施方式

[0031] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0032] 本发明在大肠杆菌中表达腈水合酶NH1,利用大肠杆菌菌体进行酶催化反应,其中:

[0033] 腈水合酶NH1氨基酸序列来源于Rhodococcus。

[0034] 下面将更加详细地描述本发明的实施例。

[0035] 实施例1腈水合酶NH1大肠杆菌表达菌株构建

[0036] 根据Rhodococcus腈水合酶NH1氨基酸序列,其中, α 亚基(α subunit)的氨基酸序列如SEQ ID NO:1表示, β 亚基(β subunit)的氨基酸序列SEQ ID NO:2表示,副蛋白(accessory protein)的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。在每一个亚基前加入RBS位点。基因克隆在pET28a的NcoI和HindIII位点,核酸序列根据大肠杆菌密码子进行优化,优化后的核酸序列如下所示,并交由通用生物系统(安徽)有限公司进行合成。

[0037] ATGGATGGTGTTCATGATCTGGCAGGTGTTGAGGGTTTTGGTAAAGTCCGCATACCGTTAATGCAGATATTGGTCCGACCTTTCATGCAGAATGGGAACATCTGCCGTATAGCCTGATGTTGCAGGTGTTGCAGAACTGGGTGCATTTAGCGTTGATGAAGTTCGTTATGTTGTTGAACGTATGGAACCGCGTCATTATATGATGACCCCGTATTATGAACGTTATGTTATTGGTGTTCAGCACTGATGGTTGAAAAAGGTATTCTGACCCAGGAAGAAGTGGAAAGCCTGGCAGGTGGTCCGTTTCCGCTGAGCCGTCGAGCGAAAGCGAAGGTTCGTCGGGCACGTATTGATACCACCACCTTTGAAGTTGGTCAGCGTTCGTGTTTCGTGATGAATATGTTCCGGGTCATATTCGTATGCCGGCATATTGTCGTGGTCGTGTTGGTACCATTGCACATCGTACCACCGAACGTTGGCCGTTTCCGGATGCAATTGGTTCATGGTCGTAATGATGCAGG

TGAAGAACCGACCTATCATGTTACCTTTGCAGCAGAAGAAGCTGTTTGGTAGCGATACCGATGGTGGTAGCGTTGTT
GTTGATCTGTTTGAAGGTTATCTGGAACCGGCAGCATGAAAGGAGATATAGATATGAGCGTTACCATTGATCATA
CACCGAAAATGCAGCACCGGCACAGGCACCGGTTAGCGATCGTGCATGGGCACTGTTTCGTGCACTGGATGGTAAA
GGTCTGGTTCCGGATGGTTATGTTGAAGGTTGGAAAAAGACCTTTGAAGAAGATTTTAGCCCGCGTCGTGGTGCAG
AACTGGTTGCACGTGCATGGACCGATCCGGATTTTCGTGACGTGCTGCTGACCGATGGTACCGCAGCAGTTGCACA
GTATGGTTATCTGGGTCCGCAGGGTGAATATATTGTTGCAGTTGAAGATACCCCGACCCTGAAAAATGTTATTGTT
TGTAGCCTGTGTAGCTGTACCGCATGGCCGATTCTGGGTCTGCCCGACCTGGTATAAAAGTTTTGAATATCGTG
CACGTGTTGTTTCGTGAACCGCGTAAAGTTCTGAGCGAAATGGGTACCGAAAATTGCAAGCGATGTTGAAATTCGTGT
TTATGATACCACCGCAGAAAACCGTTATATGGTTCTGCCGAGCGTCCGGCAGGTACCGAAGGTTGGAGCCAGGAA
CAGCTGCAGGAAATTGTTACCAAAGATTGTCTGATTGGTGTTCAGTTCCGCAGGTTCCGACCGTTTGAAGGAGT
ACTAGATATGGTTGATACCGTCTGCCGTTACCGTTCTGAGCGGTTTTCTGGGTGCAGTAAAACCACCCTGCTG
AATGAAATTCTGCGTAATCGTGAAGTCTGCTGTTGCAGTTATTGTTAATGATATGAGCGAAATTAATATTGATA
GCGCCGAAGTTGAACGTGAAATTAGCCTGAGCCGTAGCGAAGAAAACTGGTTGAAATGACCAATGGTTGTATTTG
TTGTACCCTGCGTGAAGATTTACTGAGCGAAATTAGCGCACTGGCAGCAGATGGTCGTTTTGATTATCTGCTGATT
GAAAGCAGCGGTATTAGCGAACCGTCCCGTTGCAGAAAACCTTTACCTTTATTGATACCGATGGTCATGCACTGG
CAGATGTTGCACGTCTGGATAACAATGGTTACCGTTGTTGATGGTAATAGCTTTCTGCGTGATTATACCGCAGGTGG
TCGTGTTGAAGCAGATGCACCGGAAGATGAACGTGATATTGCAGATTTACTGGTTGATCAGATTGAATTTGCAGAT
GTTATTCTGGTTAGCAAAGCAGATTTAGTTAGCCAGCAGCATCTGGTTGAACTGACCGCAGTTCTGCGTAGCCTGA
ATGCAACCGCAGCAATTGTTCCGATGACCCTGGGTGCTATTCCGCTGGATAACCATCTGGATAACCGGTCTGTTTAG
CCTGGAAAAAGCAGCACAGGCACCGGTTGGCTGCAGGAACTGCAGGGTGAACGTACCCCGAAAACCGAAGAATAT
GGTATTGGTAGCGTTGTTTATCGTGAACGTGCACCGTTTCATCCGCAGCGTCTGCATGATTTTCTGAGCAGCAAAT
GGACCAATGGTAAACTGCTGCGTGCAAAGGTTATTATTGGAATGCAGGTCGTTTTACCGAAATTGGTAGCATTAG
CCAGGCAGGTCATCTGATTCGTGATGGTTATGTTGGTTCGTTGGTGGAAATTTCTGCCGCGTGATGAATGGCCGGCA
GATGATTATCGTCGTGATGGTATTCTGGATAAATGGGAAGAACCGGTTGGTGATTGTCGTCAGGAACTGGTTTTTA
TTGGTCAGGCAATTGATCCGAGCCGTCTGCATCGTGAACCTGGATGCATGTCTGCTGACCACCGCAGAAATTGAACT
GGGTCCGGATGTTTGGACCACCTGGAGCGATCCGCTGGGTATTGGTTATACCGATCAGACCGTTTGA (SEQ ID
NO:4)。

[0038] SEQ ID NO:4所示核酸序列导入大肠杆菌中,可在大肠杆菌中表达SEQ ID NO:1~3所示的脲水合酶NH1的 α 亚基、 β 亚基以及副蛋白。

[0039] 合成得到的质粒干粉分别加入50 μ l蒸馏水溶解,取1 μ l转化BL21 (DE3)感受态细胞,转化液涂布LB+Kan平板(10g/L蛋白胨,5g/L酵母粉,10g/L氯化钠,50 μ g/mL卡那霉素,15g/L琼脂粉),37 $^{\circ}$ C过夜培养。

[0040] 实施例2脲水合酶NH1的摇瓶诱导表达

[0041] 分别挑取转化平板上的单菌落至5mL LB+Kan液体培养基(10g/L蛋白胨,5g/L酵母粉,10g/L氯化钠,50 μ g/mL卡那霉素),37 $^{\circ}$ C 250rpm/min条件下过夜培养,约12h。

[0042] 取过夜活化好的菌液,2mL转接至新鲜的200mL LB+Kan液体培养基,37 $^{\circ}$ C 250rpm/min条件下培养直至OD达到0.5-0.8。

[0043] 取培养好的NH1菌液,加入终浓度为1mM的IPTG以及终浓度为1mM的FeCl₂,30 $^{\circ}$ C 250rpm/min条件下培养5h。

[0044] 诱导结束后,收集全部菌液在8000rpm/min、4摄氏度条件下离心收集菌体。取适当菌体进行超声波破壁处理,10000rpm/min、4℃离心10min,取上清液检测蛋白表达情况。

[0045] 蛋白诱导情况见图1。

[0046] 实施例3脲水合酶NH1的50L罐上发酵

[0047] 取实施例2中过夜活化好的菌液,1mL转接至新鲜的1000mL LB+Kan液体培养基,37℃ 250rpm/min条件下培养约10h后接种50L发酵罐(发酵培养基:一水葡萄糖121g,酵母浸粉500g,酵母蛋白胨250g,NaCl100g,Na₂HPO₄ 25g,MgSO₄·7H₂O 20g,KH₂PO₄ 100g,(NH₄)₂SO₄ 50g,一水柠檬酸55g,NaOH 75g,GPE消泡剂25mL。118℃灭菌30min,消后体积25L)。

[0048] 基础培养阶段:控制培养温度37.0℃,通气量1:1vvm,通过搅拌和通气调节发酵液溶氧水平高于50%,罐压40~70Kpa。

[0049] 补葡萄糖阶段:发酵液pH值反弹至7.15时开始补加葡萄糖溶液,初始补糖速率6.6g/L.h,每0.5h提升0.7g/L.h,葡萄糖补加速率提升至10.0g/L.h,维持此速率补加至诱导阶段。补葡萄糖阶段培养温度34.0℃,通气量1:1.3vvm,通过搅拌和通气调节发酵液溶氧水平高于30%。

[0050] 诱导阶段:发酵液OD₆₀₀值在30~35时,开始进行诱导,诱导时一次性打入终浓度1mMIPTG溶液和终浓度1mM FeCl₂溶液。诱导前降低培养温度至30℃,诱导后葡萄糖补加速率3.3~3.6g/L.h,发酵液溶氧水平20%~50%。维持该速率直至发酵结束,诱导约15h。发酵结束后离心发酵液收集菌体,菌体置于-20℃保存。

[0051] 实施例4脲水合酶NH1的酶粉制备

[0052] 喷干酶粉的制备:利用实施例3中获得的脲水合酶NH1发酵液,量取500mL发酵液,于喷雾干燥箱(设置参数为进口温度170℃、出口温度80℃、进料流量700mL/h)中进行喷干,获得脲水合酶NH1喷干酶粉。喷干酶粉置于4℃保存。

[0053] 冻干酶粉的制备:利用实施例3中获得的脲水合酶NH1发酵液,量取500mL发酵液样品离心,将菌体用生理盐水洗涤菌体后移去多余生理盐水,加入5%蔗糖溶液作保护剂。重悬菌体并置于冷冻舱里的隔板上,在超低温冰箱(-70℃)中预冷12h。随后在冷冻干燥机中冷冻干燥48h即得冻干酶粉。冻干酶粉置于4℃保存。

[0054] 实施例5脲水合酶NH1菌体催化合成右旋酰胺酮洛芬

[0055] 取实施例3中18g脲水合酶NH1菌体均匀分散到100mL 0.1M pH=7.0磷酸钠缓冲液中,30℃下温浴10min,再将6g氰基酮洛芬底物溶于10mL乙酸乙酯滴加入反应瓶,保温反应。反应24h取样2mL,加4mL二氯甲烷萃取,取萃取相50uL,干燥,HPLC检测各组分含量。

[0056] 样品处理:采用乙腈溶解,配制成1mg/ml。

[0057] 检测条件:采用HPLC正相,色谱柱(Welch Topsil 5u C18 100A,4.6×150mm),检测波长:250nm,柱温:25℃,进样量5uL,流动相:磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾68.0g,加水溶解并稀释至1000ml,用磷酸调节pH值至3.5±0.1)-乙腈-水(2:43:55),洗脱条件:等度洗脱,运行时间:25min。

[0058] $e.e = (\text{右旋KPA含量} - \text{左旋KPA含量}) / (\text{右旋KPA含量} + \text{左旋KPA含量})$

[0059] 转化率 = 右旋KPA含量 / 初始KPN含量

[0060] KPN为底物氰基酮洛芬,KPA为产物酰胺酮洛芬。

[0061] 结果如图2所示,产物右旋KPA的e.e值为98.6%,转化率为48.4%。

[0062] 实施例6脞水合酶NH1喷干酶粉催化合成右旋酰胺酮洛芬

[0063] 取实施例4中3g脞水合酶NH1喷干酶粉均匀分散到100mL 0.1M pH=7.0磷酸钠缓冲液中,30℃下温浴10min,再将6g氨基酮洛芬底物溶于10mL乙酸乙酯滴加入反应瓶,保温反应。反应20h取样2mL,加4mL二氯甲烷萃取,取萃取相50uL,干燥,HPLC检测各组分含量。样品处理以及检测方法同实施例5。样品处理以及检测方法同实施例5。

[0064] HPLC图见附图3,产物右旋KPA的e.e值为98.5%,转化率为48.5%。

[0065] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0066] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

SEQUENCE LISTING

<110> 东莞市东阳光生物合成药有限公司

<120> 制备右旋酰胺酮洛芬的方法

<130> PIDC4190300

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 来源于Rhodococcus的脲水合酶的 α 亚基(α subunit)的氨基酸序列

<400> 1

```

Met Asp Gly Val His Asp Leu Ala Gly Val Gln Gly Phe Gly Lys Val
1           5           10           15
Pro His Thr Val Asn Ala Asp Ile Gly Pro Thr Phe His Ala Glu Trp
           20           25           30
Glu His Leu Pro Tyr Ser Leu Met Phe Ala Gly Val Ala Glu Leu Gly
           35           40           45
Ala Phe Ser Val Asp Glu Val Arg Tyr Val Val Glu Arg Met Glu Pro
           50           55           60
Arg His Tyr Met Met Thr Pro Tyr Tyr Glu Arg Tyr Val Ile Gly Val
65           70           75           80
Ala Ala Leu Met Val Glu Lys Gly Ile Leu Thr Gln Glu Glu Leu Glu
           85           90           95
Ser Leu Ala Gly Gly Pro Phe Pro Leu Ser Arg Pro Ser Glu Ser Glu
           100          105          110
Gly Arg Pro Ala Arg Ile Asp Thr Thr Thr Phe Glu Val Gly Gln Arg
           115          120          125
Val Arg Val Arg Asp Glu Tyr Val Pro Gly His Ile Arg Met Pro Ala
           130          135          140
Tyr Cys Arg Gly Arg Val Gly Thr Ile Ala His Arg Thr Thr Glu Arg
145          150          155          160
Trp Pro Phe Pro Asp Ala Ile Gly His Gly Arg Asn Asp Ala Gly Glu
           165          170          175
Glu Pro Thr Tyr His Val Thr Phe Ala Ala Glu Glu Leu Phe Gly Ser
           180          185          190
Asp Thr Asp Gly Gly Ser Val Val Val Asp Leu Phe Glu Gly Tyr Leu

```

195	200	205
Glu Pro Ala Ala		
210		
<210> 2		
<211> 207		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> 来源于Rhodococcus的脲水合酶的β亚基(? subunit)的氨基酸序列		
<400> 2		
Met Ser Val Thr Ile Asp His Thr Thr Glu Asn Ala Ala Pro Ala Gln		
1	5	10
Ala Pro Val Ser Asp Arg Ala Trp Ala Leu Phe Arg Ala Leu Asp Gly		
	20	25
Lys Gly Leu Val Pro Asp Gly Tyr Val Glu Gly Trp Lys Lys Thr Phe		
	35	40
Glu Glu Asp Phe Ser Pro Arg Arg Gly Ala Glu Leu Val Ala Arg Ala		
	50	55
Trp Thr Asp Pro Asp Phe Arg Gln Leu Leu Leu Thr Asp Gly Thr Ala		
65	70	75
Ala Val Ala Gln Tyr Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Gly Glu Tyr Ile Val		
	85	90
Ala Val Glu Asp Thr Pro Thr Leu Lys Asn Val Ile Val Cys Ser Leu		
	100	105
Cys Ser Cys Thr Ala Trp Pro Ile Leu Gly Leu Pro Pro Thr Trp Tyr		
	115	120
Lys Ser Phe Glu Tyr Arg Ala Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Lys Val		
	130	135
Leu Ser Glu Met Gly Thr Glu Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Arg Val		
145	150	155
Tyr Asp Thr Thr Ala Glu Thr Arg Tyr Met Val Leu Pro Gln Arg Pro		
	165	170
Ala Gly Thr Glu Gly Trp Ser Gln Glu Gln Leu Gln Glu Ile Val Thr		
	180	185
Lys Asp Cys Leu Ile Gly Val Ala Val Pro Gln Val Pro Thr Val		
	195	200
<210> 3		
<211> 399		
<212> PRT		

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 来源于Rhodococcus的脲水合酶的副蛋白(accessory protein)的氨基酸序列

<400> 3

```

Met Val Asp Thr Arg Leu Pro Val Thr Val Leu Ser Gly Phe Leu Gly
1           5           10           15
Ala Gly Lys Thr Thr Leu Leu Asn Glu Ile Leu Arg Asn Arg Glu Gly
           20           25           30
Arg Arg Val Ala Val Ile Val Asn Asp Met Ser Glu Ile Asn Ile Asp
           35           40           45
Ser Ala Glu Val Glu Arg Glu Ile Ser Leu Ser Arg Ser Glu Glu Lys
           50           55           60
Leu Val Glu Met Thr Asn Gly Cys Ile Cys Cys Thr Leu Arg Glu Asp
65           70           75           80
Leu Leu Ser Glu Ile Ser Ala Leu Ala Ala Asp Gly Arg Phe Asp Tyr
           85           90           95
Leu Leu Ile Glu Ser Ser Gly Ile Ser Glu Pro Leu Pro Val Ala Glu
           100          105          110
Thr Phe Thr Phe Ile Asp Thr Asp Gly His Ala Leu Ala Asp Val Ala
           115          120          125
Arg Leu Asp Thr Met Val Thr Val Val Asp Gly Asn Ser Phe Leu Arg
           130          135          140
Asp Tyr Thr Ala Gly Gly Arg Val Glu Ala Asp Ala Pro Glu Asp Glu
           145          150          155          160
Arg Asp Ile Ala Asp Leu Leu Val Asp Gln Ile Glu Phe Ala Asp Val
           165          170          175
Ile Leu Val Ser Lys Ala Asp Leu Val Ser Gln Gln His Leu Val Glu
           180          185          190
Leu Thr Ala Val Leu Arg Ser Leu Asn Ala Thr Ala Ala Ile Val Pro
           195          200          205
Met Thr Leu Gly Arg Ile Pro Leu Asp Thr Ile Leu Asp Thr Gly Leu
           210          215          220
Phe Ser Leu Glu Lys Ala Ala Gln Ala Pro Gly Trp Leu Gln Glu Leu
           225          230          235          240
Gln Gly Glu Arg Thr Pro Glu Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Gly Ser Val
           245          250          255
Val Tyr Arg Glu Arg Ala Pro Phe His Pro Gln Arg Leu His Asp Phe
           260          265          270

```

Leu Ser Ser Lys Trp Thr Asn Gly Lys Leu Leu Arg Ala Lys Gly Tyr
 275 280 285
 Tyr Trp Asn Ala Gly Arg Phe Thr Glu Ile Gly Ser Ile Ser Gln Ala
 290 295 300
 Gly His Leu Ile Arg His Gly Tyr Val Gly Arg Trp Trp Lys Phe Leu
 305 310 315 320
 Pro Arg Asp Glu Trp Pro Ala Asp Asp Tyr Arg Arg Asp Gly Ile Leu
 325 330 335
 Asp Lys Trp Glu Glu Pro Val Gly Asp Cys Arg Gln Glu Leu Val Phe
 340 345 350
 Ile Gly Gln Ala Ile Asp Pro Ser Arg Leu His Arg Glu Leu Asp Ala
 355 360 365
 Cys Leu Leu Thr Thr Ala Glu Ile Glu Leu Gly Pro Asp Val Trp Thr
 370 375 380
 Thr Trp Ser Asp Pro Leu Gly Ile Gly Tyr Thr Asp Gln Thr Val
 385 390 395

<210> 4

<211> 2491

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 可在大肠杆菌中表达SEQ ID

NO:1~3所示的脞水合酶NH1的 α 亚基、 β 亚基以及副蛋白的核酸的核苷酸序列

<400> 4

atggatggtg ttcatgatct ggcaggtggt cagggttttg gtaaagttcc gcataccggt 60
 aatgcagata ttggtccgac ctttcatgca gaatgggaac atctgccgta tagcctgatg 120
 tttgcaggtg ttgcagaact ggggtgcattt agcgttgatg aagttcgta tgttgttgaa 180
 cgtatggaac cgcgtcatta tatgatgacc ccgtattatg aacgttatgt tattggtggt 240
 gcagcactga tggttgaaaa aggtattctg acccaggaag aactggaaag cctggcaggt 300
 ggtccgtttc cgctgagccg tccgagcgaa agcgaaggtc gtccggcacg tattgatacc 360
 accacctttg aagttggtca gcgtgttcgt gttcgtgatg aatatgttcc gggatcatatt 420
 cgtatgccgg catattgtcg tggcgtggtt ggtaccattg cacatcgtac caccgaacgt 480
 tggccgtttc cggatgcaat tggatcatggt cgtaatgatg caggtgaaga accgacctat 540
 catgttacct ttgcagcaga agaactgttt ggtagcgata ccgatggtgg tagcgttggt 600
 gttgatctgt ttgaaggta tctggaaccg gcagcatgaa aggagatata gatatgagcg 660
 ttaccattga tcataccacc gaaaatgcag caccggcaca ggcaccggtt agcgatcgtg 720
 catgggcact gtttcgtgca ctggatggtg aaggtctggt tccgatggt tatgttgaag 780
 gttggaaaaa gacctttgaa gaagatttta gcccgcgtcg tggatgcagaa ctggttgac 840

gtgcatggac cgatccggat tttcgtcagc tgctgctgac cgatggtacc gcagcagttg 900
cacagtatgg ttatctgggt ccgcagggtg aatatattgt tgcagttgaa gataccccga 960
ccctgaaaaa tgttattggt tgtagcctgt gtagctgtac cgcatggccg attctgggtc 1020
tgccgccgac ctggtataaa agttttgaat atcgtgcacg tgttgttcgt gaaccgcgta 1080
aagttctgag cgaaatgggt accgaaattg caagcgaatg tgaattcgt gtttatgata 1140
ccaccgcaga aacccttat atggttctgc cgcagcgtcc ggcaggtacc gaaggttga 1200
gccaggaaca gctgcaggaa attgttacca aagattgtct gattggtgtt gcagttccgc 1260
aggttccgac cgttttaaag gactactaga tatggttgat acccgtctgc cggttaccgt 1320
tctgagcggg tttctgggtg caggtaaaac caccctgctg aatgaaattc tgcgtaatcg 1380
tgaaggtcgt cgtgttgacg ttattgttaa tgatatgagc gaaattaata ttgatagcgc 1440
cgaagttgaa cgtgaaatta gctgagccg tagcgaagaa aaactggttg aatgacca 1500
tggttgattt tgttgtaacc tgcgtgaaga tttactgagc gaaattagcg cactggcagc 1560
agatggtcgt tttgattatc tgetgattga aagcagcggg attagcgaac cgctgccggg 1620
tgcagaaacc tttacctta ttgataccga tggatcatga ctggcagatg ttgcacgtct 1680
ggatacaatg gttaccgttg ttgatggtaa tagctttctg cgtgattata ccgcaggtgg 1740
tcgtgttgaa gcagatgcac cggaagatga acgtgatatt gcagatttac tggttgatca 1800
gattgaaatt gcagatgta ttctggttag caaagcagat ttagttagcc agcagcatct 1860
ggttgaactg accgcagttc tgcgtagcct gaatgcaacc gcagcaattg ttccgatgac 1920
cctgggtcgt attccgctgg ataccattct ggataccggg ctgtttagcc tggaaaaagc 1980
agcacaggca ccgggttggc tgcaggaact gcagggtgaa cgtaccccgg aaaccgaaga 2040
atatggtatt ggtagcgttg tttatcgtga acgtgcaccg tttcatccgc agcgtctgca 2100
tgatcttctg agcagcaaat ggaccaatgg taaactgctg cgtgcaaaag gttattattg 2160
gaatgcaggt cgttttaccg aaattggtag cattagccag gcaggtcatc tgattcgtca 2220
tggttatggt ggtcgttggg ggaaatttct gccgcgtgat gaatggccgg cagatgatta 2280
tcgtcgtgat ggtattctgg ataaatggga agaaccggtt ggtgattgtc gtcaggaact 2340
ggtttttatt ggtcaggcaa ttgatccgag ccgtctgcat cgtgaactgg atgcatgtct 2400
gctgaccacc gcagaaattg aactgggtcc ggatgtttgg accacctgga gcgatccgct 2460
gggtattggt tataccgatc agaccgttg a 2491

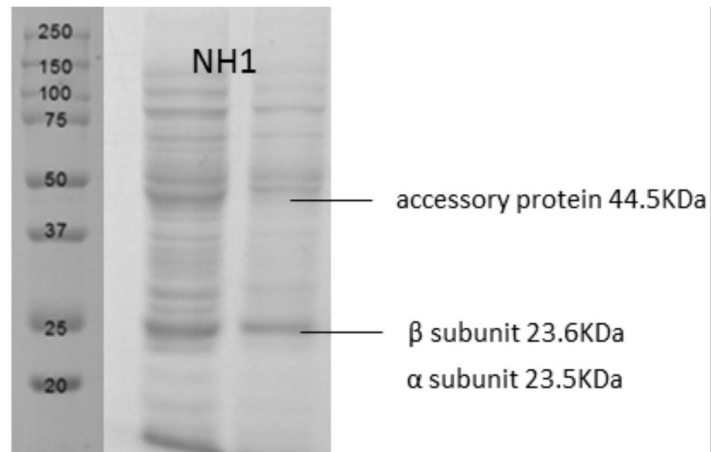


图1

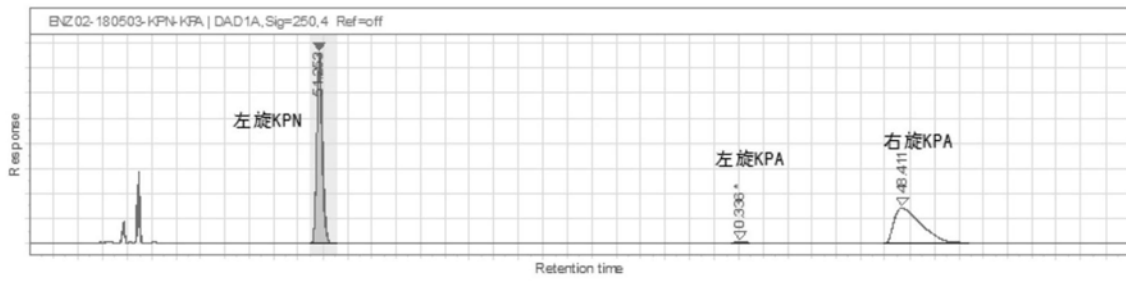


图2

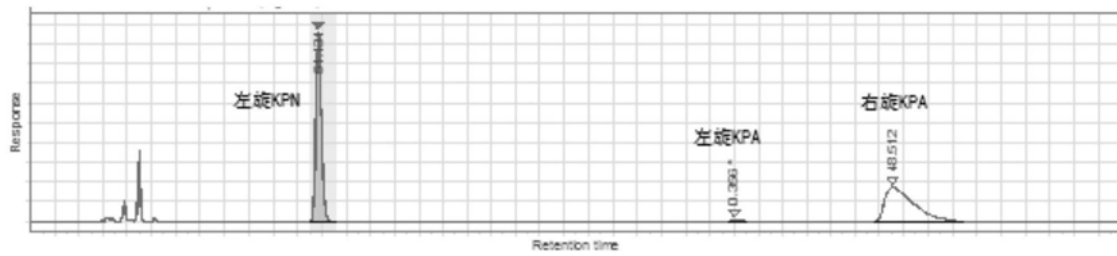


图3