



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108220261 B

(45) 授权公告日 2021.05.14

(21) 申请号 201711481250.1

C12P 17/12 (2006.01)

(22) 申请日 2017.12.29

C12R 1/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108220261 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2018.06.29

CN 105567652 A, 2016.05.11

US 2007243594 A1, 2007.10.18

(73) 专利权人 安徽联创生物医药股份有限公司
地址 230601 安徽省合肥市经开区繁华大道工投立恒工业广场B-9幢

US 2011257203 A1, 2011.10.20

CN 103276027 A, 2013.09.04

竺伟等. (S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶的化学-酶法合成.《中国医药工业杂志》.2015,第46卷(第4期),

(72) 发明人 葛德培 吴其华 洪炯 刘涛
王海涛

Morales, L et al.. uncharacterized protein KUCA_T00000094001 [Kuraishia capsulata CBS 1993], NCBI Reference Sequence: XP_022456152.1.《GenBank》.2017, Ning C et al.. Characterization of a novel carbonyl reductase from Kuraishia capsulata, ID: I1V8K5_9ASCO.《EMBL》.2017,

(74) 专利代理机构 合肥市科融知识产权代理事务所(普通合伙) 34126
代理人 陈思聪

审查员 刘宁伟

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

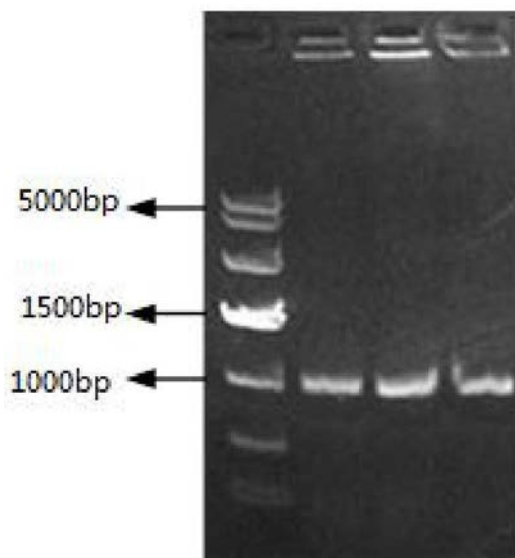
权利要求书1页 说明书4页
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

酮还原酶、核酸、重组表达载体、重组表达菌株及应用

(57) 摘要

本发明提供了一种酮还原酶, 编码所述酮还原酶的核酸, 包含所述核酸的重组表达载体, 包含所述重组表达载体的重组表达菌株及其制备方法, 以及所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用。相对于现有的其它制备方法, 使用本发明的酮还原酶所制备的(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶不仅浓度和光学纯度高, 且反应条件温和, 对环境友好, 操作简便, 易于工业放大, 具有很好的工业应用前景。



1. 一种酮还原酶,其特征在于:所述酮还原酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种编码权利要求1所述酮还原酶的核酸。
3. 一种包含权利要求2所述核酸的重组表达载体。
4. 一种包含权利要求3所述重组表达载体的重组表达菌株。
5. 权利要求4所述重组表达菌株的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

(a) 将权利要求3所述重组表达载体转化到宿主细胞,涂布在含有50 μ g/mL氨苄的LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养后,从中挑选阳性菌落接种到50mL液体LB培养基中进行培养;培养4h后,吸取10mL种子液转入1L新鲜的LB液体培养基;

(b) 当培养液的浓度达到 $OD_{600}=0.6-1.0$ 时,加入终浓度为0.05~1.0mmol/L的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷进行诱导,诱导温度为16-35 $^{\circ}$ C,诱导培养8-16h,诱导培养后通过离心或浓缩得到更高浓度的湿菌体,经过超声波破碎或者高压均质机破碎后离心收集上清液,即为重组表达菌株的粗酶裂解液。

6. 根据权利要求5所述重组表达菌株的制备方法,其特征在于:步骤(a)中所述液体LB培养基成分为:蛋白胨10g/L,酵母膏5g/L,NaCl 10g/L,pH 7.2;所述宿主细胞为大肠杆菌E.coli BL21;步骤(b)中加入终浓度为0.15mmol/L的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷进行诱导,诱导温度为28 $^{\circ}$ C,诱导培养12h。

7. 权利要求1所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其特征在于:在pH 6.0~8.0的缓冲液中,在葡萄糖、葡萄糖脱氢酶和辅酶存在下,所述酮还原酶对前体羰基化合物进行不对称还原反应,形成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

8. 根据权利要求7所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 在烧瓶中加入500mL 50mM的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液pH为6.0-8.0,搅拌;

(2) 再加入所述酮还原酶,葡萄糖脱氢酶和葡萄糖,再加入NAD辅酶以及前体羰基化合物,再用磷酸盐缓冲液定容,在25-35 $^{\circ}$ C温度下反应,用2mol/L的氢氧化钠控制pH,反应16h后用TLC点板检测反应完全;

(3) 将反应体系升温至70 $^{\circ}$ C加热2h,加入硅藻土过滤除蛋白,用等体积乙酸乙酯萃取水相和洗涤滤饼;

(4) 萃取两次后合并有机相,用无水硫酸钠干燥后减压旋蒸得油状物粗品,即得(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

9. 根据权利要求8所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其中,步骤(2)中所述NAD辅酶为 NAD^{+} 或 $NADP^{+}$,所述NAD辅酶的用量为0.01~0.1g/L;所述前体羰基化合物为N-Boc-3-哌啶酮,所述N-Boc-3-哌啶酮在反应液中的浓度为10-200g/L;所述酮还原酶的用量为100~1000U/L;所述葡萄糖的用量为20~200g/L,所述葡萄糖脱氢酶的用量为100~2000U/L,所述葡萄糖的浓度为所述前体羰基化合物的1.2-1.5当量。

10. 根据权利要求8-9任意一项所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其特征在于:步骤(1)中所述磷酸盐缓冲液pH为7.0,步骤(2)中在30 $^{\circ}$ C温度下反应。

酮还原酶、核酸、重组表达载体、重组表达菌株及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,特别是涉及一种酮还原酶、核酸、重组表达载体、重组表达菌株及酮还原酶在不对称合成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用。

背景技术

[0002] (S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶是一种重要的医药中间体,在镇痛,抗精神病、抗肿瘤等药物中广泛应用,如依鲁替尼。

[0003] (S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶可通过化学或者拆分获得,但是化学法或者拆分法的局限在于收率比较低,拆分法理论上最高收率50%。

[0004] 在生物学上,手性羟基化合物可通过酶催化合成,其反应条件温和,能够使产物对应选择性达到99%。目前,越来越多的药物或者中间体是通过生物催化的方式来合成的。生物催化法是通过前体N-Boc-3-哌啶酮不对称还原成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

[0005] 专利CN201310173088.2公开了一种利用重组酮还原酶(KRED)酶粉来不对称还原N-Boc-3-哌啶酮,但是并没有公开酮还原酶(KRED)的基因序列或者氨基酸序列。专利CN201310054684.9公开了一种利用醇脱氢酶PAR来不对称合成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶,但是利用了有机试剂异丙醇来进行辅酶循环,有机试剂对酶活力有较大幅度的损害,且有明显的抑制作用。专利CN201610132936.9公开了一种利用羰基还原酶ReCR酶液体来不对称还原酮还原酶(KRED),但是该酶液需要经过Ni-NTA纯化,且是用仲辛醇-水两相反应,不利于放大生产或生产成本比较高。

发明内容

[0006] 针对已报道的不对称还原反应制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶反应中收率低、反应条件不友善、以及成本比较高的问题,本发明的目的在于提供一种催化活性高、对映选择性强、收率比较高的酮还原酶,还提供了编码该酮还原酶的核酸,含有该核酸的重组表达载体、包含所述重组表达载体的重组表达菌株及其制备方法,以及该酮还原酶在不对称合成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 一种酮还原酶,是如下(a)、(b)或(c)的蛋白质:

[0009] (a)由SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列组成的多肽;

[0010] (b)在(a)所述多肽的基础上经过突变、缺失或添加一个或几个氨基酸的具有酮还原酶性质的多肽;所述突变是在所述多肽的基础上进行1-10个氨基酸的突变,即经过突变后的多肽仍然具有酮还原酶的性质,几个是指在1-30个的氨基酸,比如增加His Tag标签或添加一段分泌表达的信号肽;

[0011] (c)与(a)所述多肽具有至少90%同一性且具有酮还原酶活性的多肽。

[0012] 一种编码本发明所述酮还原酶的核酸。

[0013] 一种包含本发明所述核酸的重组表达载体。

[0014] 一种包含本发明所述重组表达载体的重组表达菌株。

[0015] 本发明所述重组表达菌株的制备方法,包括以下步骤:

[0016] (a) 将所述重组表达载体转化到宿主细胞,涂布在含有50 μ g/mL氨苄的LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养后,从中挑选阳性菌落接种到50mL液体LB培养基中进行培养;培养4h后,吸取10ml种子液转入1L新鲜的LB液体培养基;

[0017] (b) 当培养液的浓度达到 $OD_{600}=0.6-1.0$ 时,加入终浓度为0.05~1.0mmol/L的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行诱导,诱导温度为16-35 $^{\circ}$ C,诱导培养8-16h,诱导培养后通过离心或浓缩得到更高浓度的湿菌体,经过超声波破碎或者高压均质机破碎后离心收集上清液,即为重组表达菌株的粗酶裂解液。

[0018] 本发明所述重组表达菌株的制备方法,其中,步骤(a)中所述液体LB培养基成分为:蛋白胨10g/L,酵母膏5g/L,NaCl 10g/L,pH 7.2;所述宿主细胞为大肠杆菌E.coli BL21(DE3);步骤(b)中加入终浓度为0.15mmol/L的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)进行诱导,诱导温度为28 $^{\circ}$ C,诱导培养12h。

[0019] 本发明所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,在pH 6.0~8.0的缓冲液中,在葡萄糖、葡萄糖脱氢酶(GDH)和辅酶存在下,所述酮还原酶对前体羰基化合物进行不对称还原反应,形成(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

[0020] 本发明所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其中,包括以下步骤:

[0021] (1) 在烧瓶中加入500ml 50mM的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液pH为6.0-8.0,搅拌;

[0022] (2) 再加入所述酮还原酶,葡萄糖脱氢酶和葡萄糖,再加入NAD辅酶以及前体羰基化合物,再用磷酸盐缓冲液定容,在25-35 $^{\circ}$ C温度下反应,用2mol/L的氢氧化钠控制pH,反应16h后用TLC点板检测反应完全;

[0023] (3) 将反应体系升温至50-70 $^{\circ}$ C加热1-2h,加入硅藻土过滤除蛋白,用等体积乙酸乙酯萃取水相和洗涤滤饼;

[0024] (4) 萃取两次后合并有机相,用无水硫酸钠干燥后减压旋蒸得油状物粗品,即得(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

[0025] 本发明所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其中,步骤(2)中所述NAD辅酶为NAD⁺或NADP⁺,所述NAD辅酶的用量为0.01~0.1g/L;所述前体羰基化合物为N-Boc-3-哌啶酮,所述N-Boc-3-哌啶酮在反应液中的浓度为10-200g/L;所述酮还原酶的用量为100~1000U/L;所述葡萄糖的用量为20~200g/L,所述葡萄糖脱氢酶的用量为100~2000U/L,所述葡萄糖的浓度为所述前体羰基化合物的1.2-1.5当量。

[0026] 本发明所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,其中,步骤(1)中所述磷酸盐缓冲液pH为7.0,步骤(2)中在30 $^{\circ}$ C温度下反应。

[0027] 本发明有益效果:

[0028] 本发明所述酮还原酶,可将底物N-Boc-3-哌啶酮转化为(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶,其氨基酸序列与其它已知酮还原酶具有明显差异性。

[0029] 本发明所述酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,前体羰基化合物可高达200g/L,反应时间小于24h;NAD⁺作为辅酶,在液体酶反应时添

加,且在全细胞时不需要添加昂贵的辅酶 NAD^+ ;产物(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶得率为95.8%,其e.e.值 $>99\%$,应用葡萄糖脱氢酶实现了 NAD^+/NADH 之间的循环,避免了使用异丙醇等有机试剂对环境及酮还原酶的伤害。相对于现有的其它制备方法,使用本发明的述酮还原酶所制备的(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶不仅浓度和光学纯度高,且反应条件温和,对环境友好,操作简便,易于工业放大,具有很好的工业应用前景。

附图说明

- [0030] 图1为实施例2中PCR扩增电泳图谱;
[0031] 图2为实施例3中SDS-PAGE电泳图谱。
[0032] 下面将结合具体实施例和附图对本发明作进一步说明。

具体实施方式

[0033] 实施例1

[0034] 酮还原酶MT-KRED基因的获得

[0035] (1)从安徽省合肥市中国科学技术大学采集土壤样本并提取DNA(基因提取方法参考Chroma Spin TE-1000,Clontech Laboratories,Inc.,USA),将提取的DNA样品用Sau3AI酶切后,电泳后切胶回收0.5~4kb的DNA片段,通过BamHI位点连接到pUC19质粒上,从而得到基因组的质粒文库;

[0036] (2)将步骤(1)中所述质粒文库转化到大肠杆菌E.coli BL21(DE3)(购自北京全式金生物技术有限公司),并涂布到有相应氨苄抗生素的LB平板上,挑选阳性克隆接种到加有500 μM LLB的96深孔孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养4h后加入终浓度为0.2mmol/L异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导,28 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养诱导过夜;离心收集深孔培养物并加入50 μl 的10mmol/LpH7.5的磷酸钠缓冲液,-80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融三次后使细菌裂解;

[0037] (3)加入1mmol/L前体羰基化合物N-Boc-3-哌啶酮为底物、20mmol/L葡萄糖、1U葡萄糖脱氢酶(GDH)、0.001%的酚红,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养4h,挑取颜色变红最明显的孔所对应的深孔培养物,抽提质粒并送测序;用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的ORF Finder分析序列的开放读码框(ORF),得到ORF核苷酸序列后筛选出的酮还原酶基因,并进一步得到其编码的氨基酸序列SEQ ID NO:1。

[0038] 实施例2

[0039] 酮还原酶MT-KRED基因的克隆

[0040] 合成引物对F1和F2;

[0041] PCR 20 μl 体系如下:2mmol/L dNTP 2 μL ,10 \times PCR buffer 2 μL ,PCR高保真酶0.5 μL ,实施例1获得的DNA模板1 μL ,ddH₂O 12 μL ,F1和F2各1 μL (5mmol/L)。PCR扩增步骤为:①95 $^{\circ}\text{C}$,预变性5min;②98 $^{\circ}\text{C}$,变性15s;③56 $^{\circ}\text{C}$ 退火30s;④72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸50s;步骤②~④重复32次;⑤72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸10min,冷却至16 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR产物经琼脂糖电泳纯化,PCR扩增电泳图谱如图1所示,在1000bp左右出现目标条带,用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收所述目标条带,获得一条完整的序列,经DNA测序,全长1026bp,即获得酮还原酶基因的PCR产物。

[0042] 实施例3

[0043] 酮还原酶MT-KRED基因的表达

[0044] 将实施例2中所述PCR产物和pET21a载体同时用NdeI/XhoI双酶切后,经琼脂糖凝胶电泳纯化,利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目标片段;在T4DNA连接酶的作用下,将所述目标片段与双酶切后的pET21a载体连接得到重组表达载体pET21a-MT-KRED。

[0045] 将上述重组表达载体pET21a-MT-KRED转化到E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布在含有50 μ g/mL氨苄的LB平板上,37 $^{\circ}$ C过夜培养后,从中挑选阳性菌落接种到50mL液体LB培养基中进行培养,液体LB培养基成分为:蛋白胨10g/L,酵母膏5g/L,NaCl 10g/L,pH 7.2;培养4h后,吸取10ml种子液转入1L新鲜的LB液体培养基,培养到OD₆₀₀达0.6~1.0后,降温至28 $^{\circ}$ C,并加入终浓度为0.15mmol/L的IPTG进行诱导培养12h,5000rpm离心收集菌体(即获得重组表达菌株的湿菌体),用50mmol/L pH7.0的磷酸钠缓冲液洗一次,每克菌体重悬于10mL上述磷酸盐缓冲液中,在冰浴中超声破碎,离心收集上清液,即为重组表达菌株的粗酶裂解液。取部分上清液进行SDS-PAGE蛋白电泳检验表达水平,SDS-PAGE电泳图谱如图2所示,由图2可知,目标蛋白大小与预期一致。

[0046] 实施例4

[0047] 一种酮还原酶在不对称还原制备(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶中的应用,包括以下步骤:

[0048] (1) 在2L三口烧瓶中加入500ml 50mmol/L的磷酸盐缓冲液,所述磷酸盐缓冲液pH为7.0,搅拌;

[0049] (2) 再加入实施例3中所述粗酶裂解液200ml,葡萄糖脱氢酶(GDH) 2000U(购自sigama)和葡萄糖100g,再加入NAD辅酶0.05g以及前体羰基化合物N-Boc-3-哌啶酮100g,再用磷酸盐缓冲液定容至1L,在30 $^{\circ}$ C温度下反应,用2mol/L的氢氧化钠控制pH,反应16h后用TLC点板检测反应完全;酮还原酶的用量为500U/L;

[0050] (3) 将反应体系升温至70 $^{\circ}$ C加热2h,加入10g硅藻土过滤除蛋白,用等体积乙酸乙酯(EA)萃取水相和洗涤滤饼;

[0051] (4) 萃取两次后合并有机相,用无水硫酸钠干燥后减压旋蒸得油状物粗品,即得(S)-1-叔丁氧羰基-3-羟基哌啶。

[0052] 测定本实施例粗品的纯度98.0%,摩尔收率95%,e.e.值>99%。

[0053] 产物e.e.值的具体分析条件为:色谱柱为CP-Chirasil-DEX CB手性毛细管柱,FID检测器。色谱柱温度120 $^{\circ}$ C,气化和检测温度均为280 $^{\circ}$ C,载气为N₂。

[0054] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

[0001] 序列表

[0002] <110> 安徽联创生物医药股份有限公司

[0003] <120> 酮还原酶、核酸、重组表达载体、重组表达菌株及应用

[0004] <160> 1

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 341

[0008] <212> PRT

[0009] <213> incognita

[0010] <400> 1

[0011] Met Ala Asp Leu Pro Lys Thr Gln Tyr Gly Trp Lys Tyr Asp Lys Ser

[0012] 1 5 10 15

[0013] Ile Asn Asn Leu Lys Leu Val Glu Asp Leu Lys Val Pro Thr Pro Ser

[0014] 20 25 30

[0015] Ala Thr Gln Val Val Val Lys Ile Glu Ala Ala Gly Leu Cys His Ser

[0016] 35 40 45

[0017] Asp Leu His Val Leu Glu Gly Leu Asp Val Gly Asp Asp Tyr Val Met

[0018] 50 55 60

[0019] Gln His Glu Ile Phe Gln His Ile Val Leu Glu Ile Gly Asp Ser Val

[0020] 65 70 75 80

[0021] Asn Pro Glu Val Phe Lys Val Gly Gly Arg Tyr Ala Val His Gly Leu

[0022] 85 90 95

[0023] Asn Ser Cys Gly Ser Cys Glu Met Cys Arg Thr Gly His Asp Asn Asp

[0024] 100 105 110

[0025] Cys Thr Gly Asn Glu Ser Lys Trp Tyr Gly Leu Gly Ile Ser Gly Gly

[0026] 115 120 125

[0027] Tyr Gln Gln Tyr Leu Leu Val Pro Asn Ser His His Leu Leu Pro Ile

[0028] 130 135 140

[0029] Pro Asp Asn Val Ser Tyr Glu Val Ala Ala Ala Thr Ser Asp Ala Val

[0030] 145 150 155 160

[0031] Ser Ala Pro His His Ala Ile Lys Asn Ser Gly Val Thr Pro Ser Ser

[0032] 165 170 175

[0033] Lys Val Leu Met Phe Gly Leu Gly Gly Leu Gly Ser Asn Ala Leu Gln

[0034] 180 185 190

[0035] Ile Leu Lys Ala Phe Gly Ala Tyr Val Val Ala Val Asp Val Lys Pro

[0036] 195 200 205

[0037] Ala Ser Lys Ala Ile Ala Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Phe Tyr Thr

[0038] 210 215 220

[0039]	Asp Ile Ser Gln Ser Ser Trp Lys Pro Ala Ser Phe Asp Tyr Cys Phe
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Thr Phe Asp Ile Cys Gln Lys Tyr Ile
[0042]	245 250 255
[0043]	Lys Ser His Gly Val Cys His Pro Val Gly Leu Gly Ser Ser Lys Leu
[0044]	260 265 270
[0045]	Thr Phe Asp Leu Gly Asn Leu Ala Leu Arg Glu Val Lys Ile Val Gly
[0046]	275 280 285
[0047]	Asn Phe Trp Gly Thr Ser Gln Glu Gln Ile Glu Ala Met Glu Leu Val
[0048]	290 295 300
[0049]	Ser Ser Gly Arg Val Lys Pro Gln Val His Thr Thr Val Lys Leu Phe
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Asp Gly Ala Lys Lys Glu Thr His Ser Gly Lys Phe Phe Asn Val Asp
[0052]	325 330 335
[0053]	Gly Thr Phe Leu Pro
[0054]	340

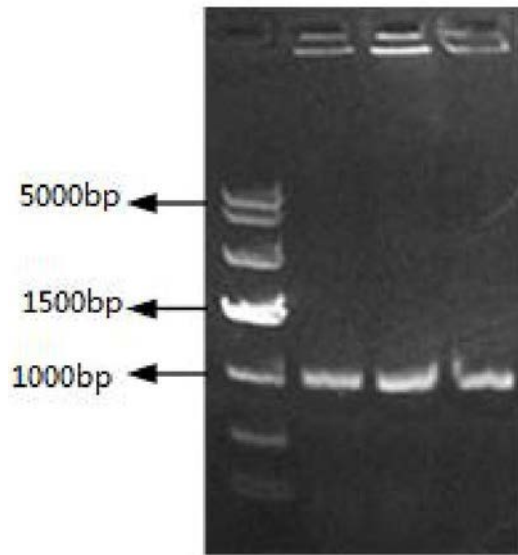


图1

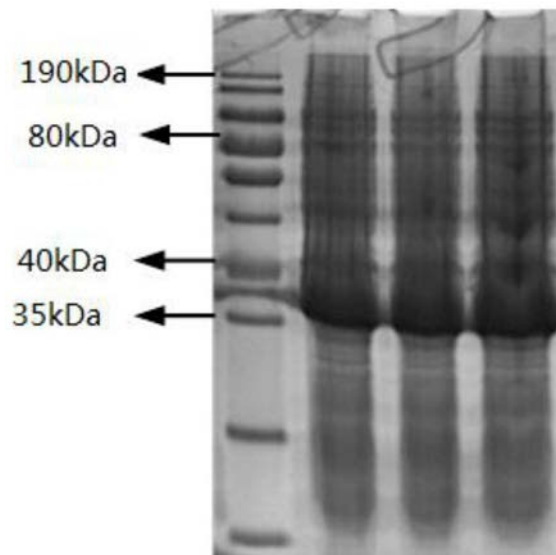


图2