



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108315365 B

(45) 授权公告日 2021.01.29

(21) 申请号 201810126667.4

(22) 申请日 2018.02.08

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108315365 A

(43) 申请公布日 2018.07.24

(73) 专利权人 浙江宏元药业股份有限公司
地址 317016 浙江省台州市临海市化学原料药基地临海园区

(72) 发明人 梅光耀 陈建华 金辉 胡磊
林金荣 汪海波 林京都 王飞

(51) Int. Cl.
C12P 7/62 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2003233675 A1, 2003.12.18

CN 102341494 A, 2012.02.01

CN 1678735 A, 2005.10.05

CN 101528917 A, 2009.09.09

CN 103060396 A, 2013.04.24

CN 103614430 A, 2014.03.05

DE 2505154 A1, 1976.08.19

CN 103060396 A, 2013.04.24

Hidetsugu NAKAZAWA, 等. Enzymatic Preparation of Aromatic Ethylamines from Aromatic L-Amino Acids. 《Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry》. 1993, 第57

卷(第7期), 第1210-1211页.

M.Pajak, 等. Enzymatic synthesis of dopamine ring labeled with hydrogen isotopes. 《Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry》. 2008, 第279卷(第2期), 第455-458页.

Alan R. Battersby, 等. Studies of enzyme-mediated reactions. Part 12. Stereochemical course of the decarboxylation of (2S)-tyrosine to tyramine by microbial, mammalian, and plant systems. 《Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1》. 1980, (第1期), 第31-42页.

Alan R. Battersby, 等. Studies of enzyme-mediated reactions. Part 161. Stereochemical course of the formation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) by decarboxylation of (2S)-5-hydroxytryptophan with the aromatic L-amino acid decarboxylase (E.C. 4.1.1.28) from hog kidney. 《Tetrahedron》. 1990, 第46卷(第13-14期), 第4685-4696页.

审查员 陈昊

权利要求书2页 说明书9页
序列表7页

(54) 发明名称

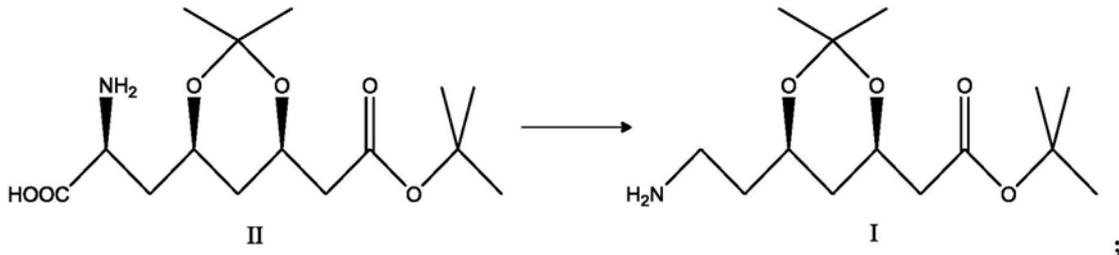
阿托伐他汀中间体的生物合成方法

(57) 摘要

本发明公开了一种阿托伐他汀中间体的生物合成方法, 包括以下步骤: 化合物(4R, 6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯在氨基酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成化合物(4R, 6R)-6-(氨乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯, 即为阿托伐他汀中间体。本发明反应条件温和, 对设备无特殊要求, 化学合成法和酶法结合, 对环境无

污染, 反应条件易控制, 操作简便, 工艺流程简单。

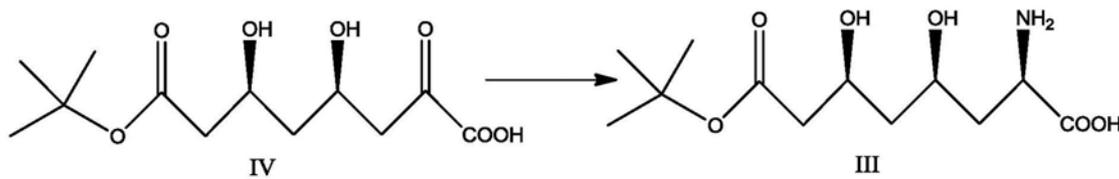
1. 一种阿托伐他汀中间体侧链化合物 I 的生物合成方法,其特征在于,包括以下步骤:式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯在氨基酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成式I化合物(4R,6R)-6-(氨基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯,即为阿托伐他汀中间体侧链化合物 I,反应式如下:



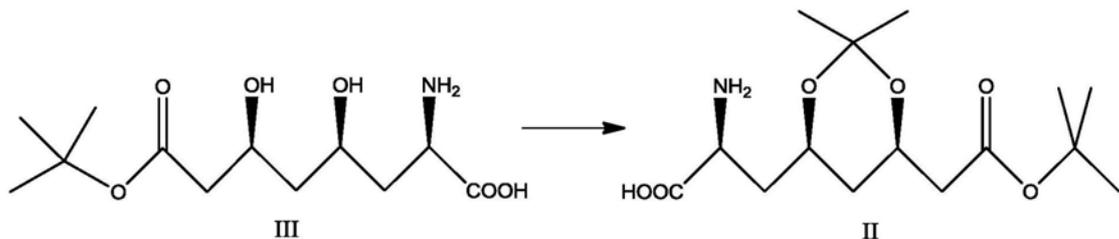
所述氨基酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,氨基酸脱羧酶基因序列如SEQ ID NO:1所示;

所述式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯的制备方法包括以下步骤:

步骤1:式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸在转氨酶的作用下进行酶催化反应生成式III化合物(2R,4S,6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-8-羰基辛酸;反应式如下:

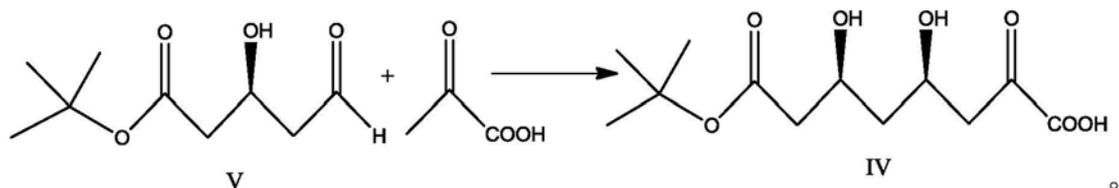


步骤2:式III化合物(2R,4S,6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-8-羰基辛酸进行双羟基保护得到化合物II(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯,采用的保护基为2,2-二甲基丙烷;



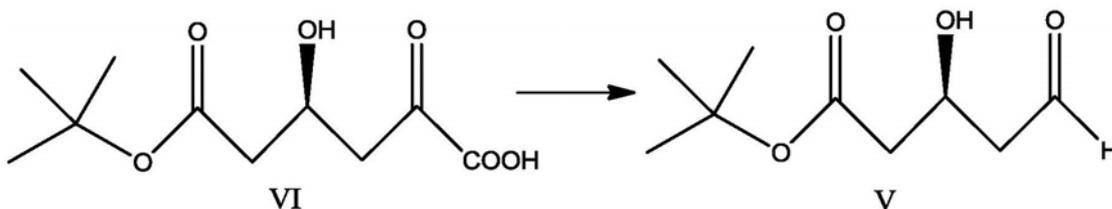
所述步骤1中,转氨酶基因来源于*Vibrio fluvialis*,所述转氨酶基因序列如SEQ ID NO:2所示,酶催化反应体系中加入丙氨酸作为氨基供体,添加PLP作为辅酶;

所述式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸由式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



所述醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶基因序列如SEQ ID NO:3所示;

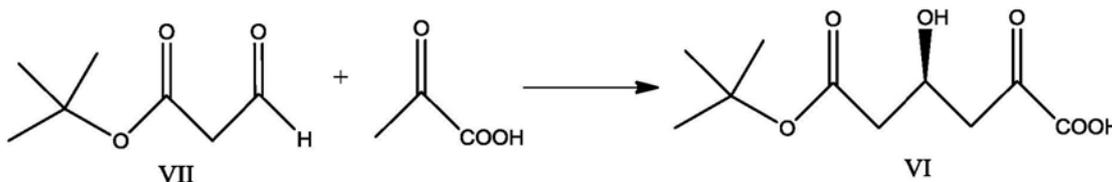
所述式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸在酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



所述酮酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,所述酮酸脱羧酶基因序列如SEQ ID NO:4所示。

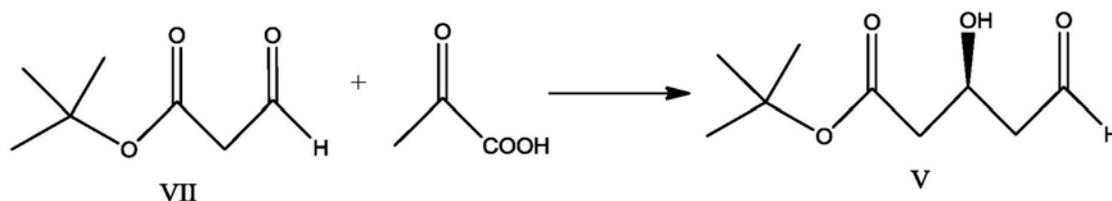
2. 根据权利要求1所述的阿托伐他汀中间体侧链化合物 I 的生物合成方法,其特征在于,所述式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯在氨基酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应在甲醇和缓冲溶液构成的混合溶液中进行,甲醇与混合溶液的体积比控制为10%-30%,所述缓冲溶液选自磷酸盐缓冲溶液、碳酸盐缓冲溶液、Tri-HCl缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液或MOPS缓冲溶液中的一种或多种。

3. 根据权利要求1所述的阿托伐他汀中间体侧链化合物 I 的生物合成方法,其特征在于,式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸由式VII化合物3-羰基丙酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



其中,所述醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶基因序列如SEQ ID NO:3所示。

4. 根据权利要求1所述的阿托伐他汀中间体侧链化合物 I 的生物合成方法,其特征在于,式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VII化合物3-羰基丙酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶和酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化一锅法反应生成,反应式如下:



所述醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶基因序列如SEQ ID NO:3所示;所述酮酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,所述酮酸脱羧酶基因序列如SEQ ID NO:4所示。

阿托伐他汀中间体的生物合成方法

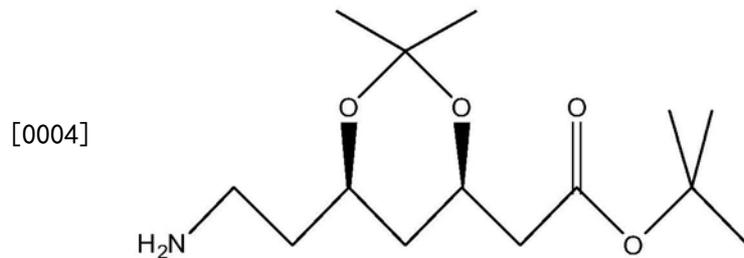
技术领域

[0001] 本发明涉及原料药及药物中间体的制备方法,具体地指一种阿托伐他汀中间体的生物合成方法。

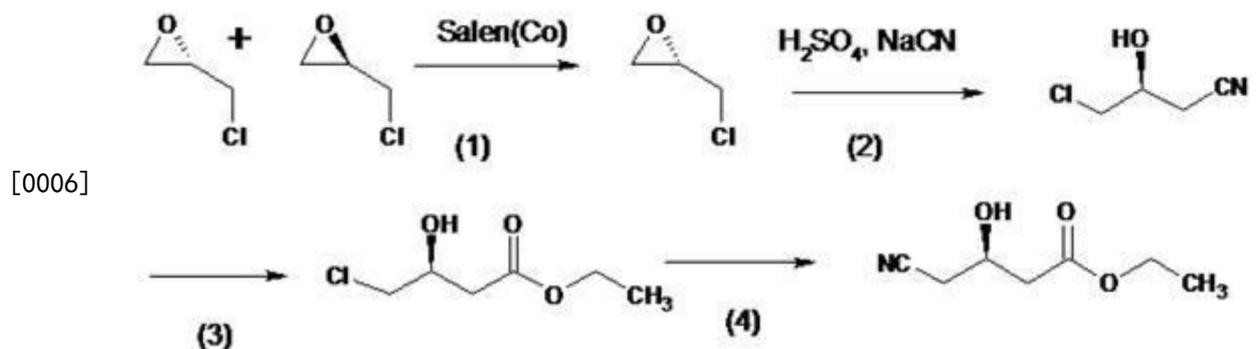
背景技术

[0002] 阿托伐他汀是HMG-CoA还原酶的选择性、竞争性抑制剂,通过抑制肝脏内HMG-CoA还原酶和胆固醇的合成从而降低血浆中胆固醇和脂蛋白水平,并通过增加细胞表面的肝脏LDL受体以增强LDL的摄取和代谢。同时,阿托伐他汀还可以降低低密度脂蛋白和甘油三酯、升高高密度脂蛋白,从而对动脉粥样硬化和冠心病的防治有重要意义。虽然目前国内调血脂药市场仍以辛伐他汀为主,然而,阿托伐他汀因其适应症更广、耐受性和安全性更好已经引起国内各制药企业的广泛关注。因此,开展阿伐他汀及其中间体合成工艺的探索和改进具有重要意义。

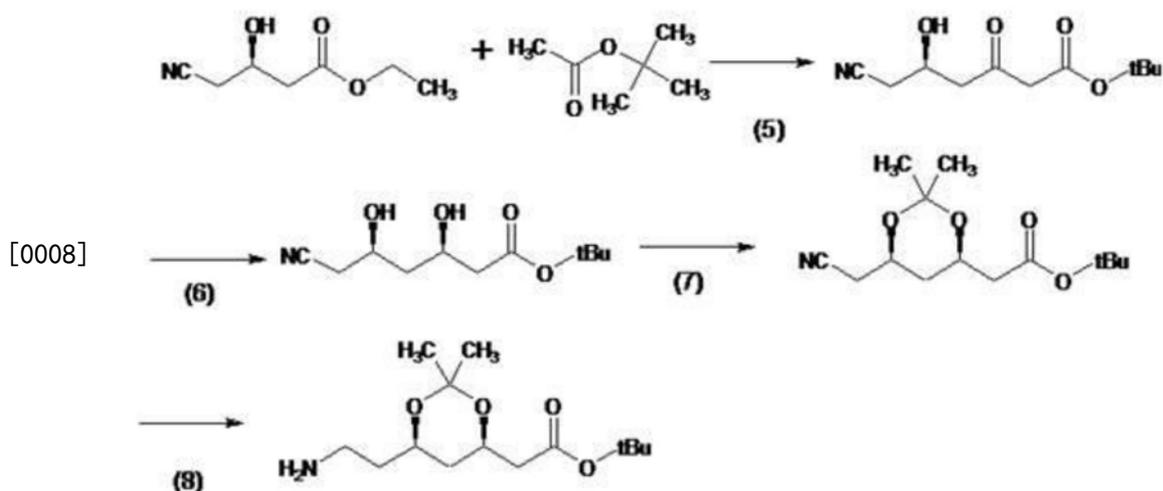
[0003] 阿伐他汀的重要中间体(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯,化学结构为:



[0005] 申请号为200910061164.4的中国发明专利报道了一种以环氧氯丙烷为原料,经过Salen催化剂手性拆分,开环、醇解酯化,再经过腈代得到(R)-(-)-4-腈基-3-羟基丁酸乙酯的工艺,合成路线如下:



[0007] 申请号为20090216029A1的美国发明专利报道了以(R)-(-)-4-腈基-3-羟基丁酸乙酯为原料与醋酸叔丁酯缩合,用硼烷保持构型后用硼氢化钠还原,还原后的产物用丙酮将双羟基保护后再用雷尼镍还原即得到(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯。



[0009] 按上述路线,以环氧氯丙烷为原料合成(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯需要8步,该工艺第(4)步合成收率较低,第(5)步需要用到贵金属锂化合物,第(6)步需要-80℃的低温,工艺流程长,反应的副产物多,因此整个合成路线的工业化成本偏高,安全方面也不易控制。

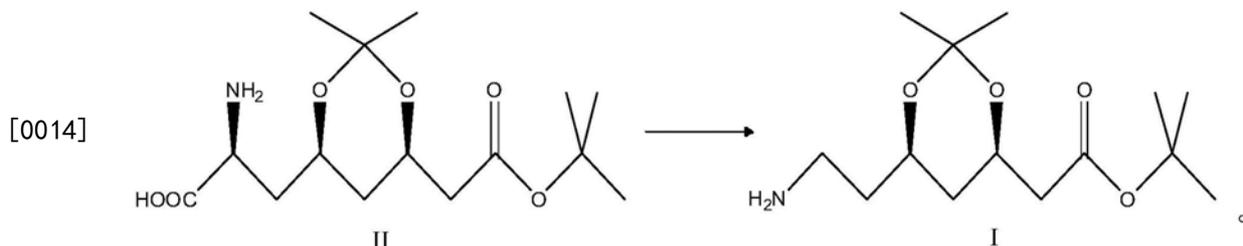
[0010] 现有技术中,(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯的合成很多需要用到中间体(R)-(-)-4-腈基-3-羟基丁酸乙酯,该化合物难以获得,且后续工艺用到贵金属锂,所以并不适合工业化。

[0011] 综上所述,研发一种反应条件温和,成本低易于产业化的(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯的合成工艺显得很有必要。

发明内容

[0012] 本发明所要解决的问题就是要提供一种阿托伐他汀中间体的生物合成方法,该方法反应条件温和,能简化现有的生产工艺。

[0013] 为解决上述技术问题,本发明所提供的阿托伐他汀中间体的生物合成方法,包括以下步骤:式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯在氨基酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成式I化合物(4R,6R)-6-(氨乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯,即为阿托伐他汀中间体,反应式如下:



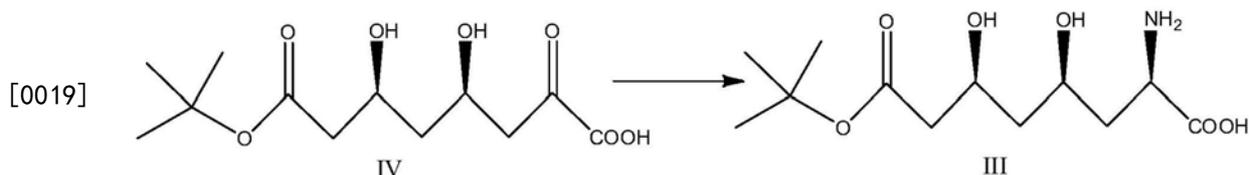
[0015] 优选地,氨基酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,氨基酸脱羧酶氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0016] 进一步地,酶催化反应在甲醇和缓冲溶液构成的混合溶液中进行,甲醇与混合溶液的体积比控制为10%-30%,所述缓冲溶液选自磷酸盐缓冲溶液、碳酸盐缓冲溶液、Tri-HCl缓冲溶液、柠檬酸盐缓冲溶液或MOPS缓冲溶液中的一种或多种。

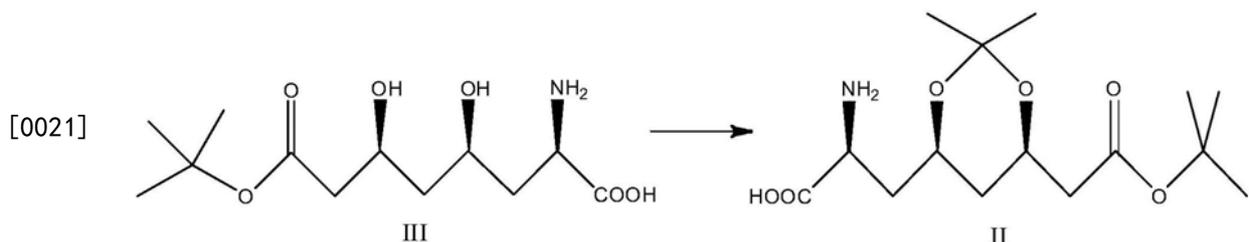
[0017] 进一步地,式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧

六环-4-乙酸叔丁酯的制备方法,包括以下步骤:

[0018] 步骤1:式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸在转氨酶的作用下进行酶催化反应生成式III化合物(2R,4S,6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-8-羰基辛酸;反应式如下:

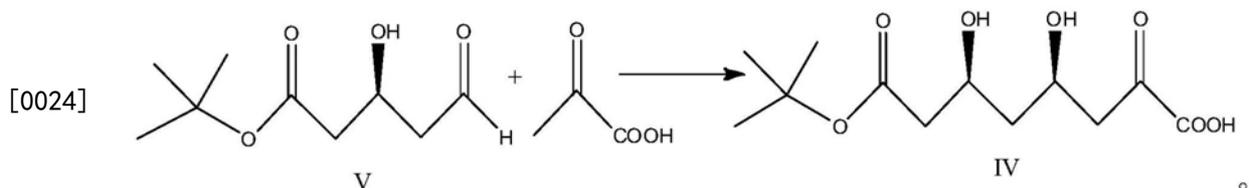


[0020] 步骤2:式III化合物(2R,4S,6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-8-羰基辛酸进行双羟基保护得到化合物II(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯,采用的保护基为2,2-二甲基丙烷;



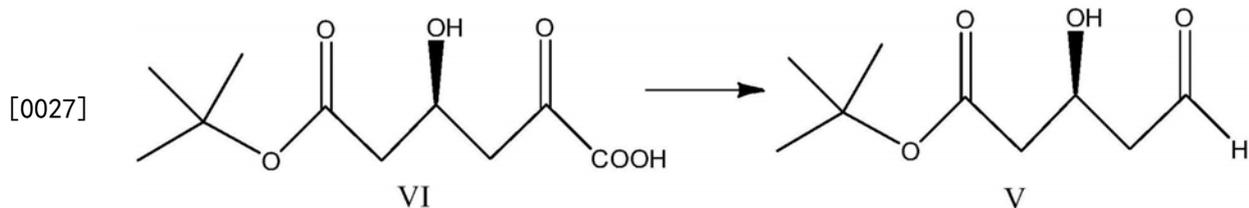
[0022] 进一步地,步骤1中,转氨酶基因来源于*Vibrio fluvialis*,所述转氨酶氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,酶催化反应体系中加入丙氨酸作为氨基供体,添加PLP作为辅酶。

[0023] 进一步地,式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸由式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



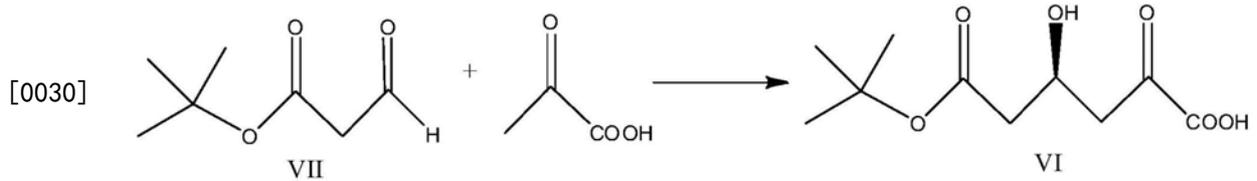
[0025] 进一步地,醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0026] 更进一步地,式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸在酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



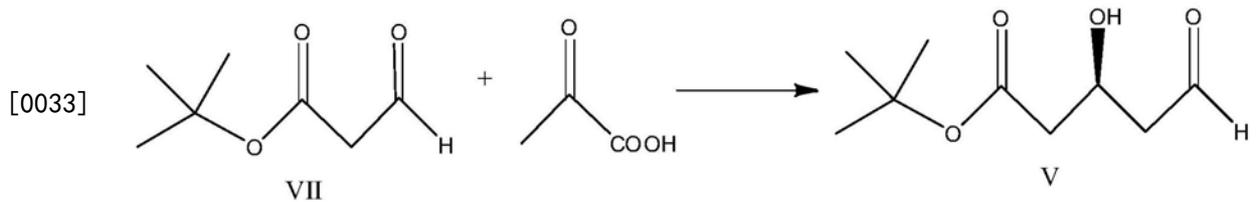
[0028] 其中,酮酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,所述酮酸脱羧酶氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0029] 更进一步地,式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸由式VII化合物3-羰基丙酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



[0031] 其中,所述醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0032] 再更进一步地,式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸和丙酮酸在醛缩酶和酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化一锅法反应生成,反应式如下:



[0034] 所述醛缩酶基因来源于*Escherichia coli*,所述醛缩酶氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示;所述酮酸脱羧酶基因来源于*Saccharomyces cerevisiae*,所述酮酸脱羧酶氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0035] 本发明的优点主要体现在如下几方面:

[0036] 其一,本发明提供了一种全新的阿托伐他汀中间体的生物合成方法,反应条件温和,对设备无特殊要求;

[0037] 其二,本发明化学合成法和酶法结合,对环境无污染;

[0038] 其三,本发明反应条件易控制,操作简便,工艺流程简单。

具体实施方式

[0039] 以下结合具体实施例对本发明作进一步的详细描述,但该实施例不应该理解为对本发明的限制,仅作举例而已。同时通过说明本发明的优点将变得更加清楚和容易理解。

[0040] 实施例1

[0041] 1、醛缩酶的制备

[0042] 重组醛缩酶基因工程菌,具体制备方法是:选择来源于*Escherichia coli*的醛缩酶的氨基酸序列,进行人工设计,将人工设计后的序列通过全基因合成(委托金斯瑞生物科技有限公司合成),克隆入表达载体pET28a的Nde I和Xho I酶切位点,转化宿主菌*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞;挑取阳性转化子并测序鉴定后,得到重组表达载体;将重组表达载体转入*E. coli* BL21 (DE3) 菌株中,获得可以诱导表达重组醛缩酶的重组醛缩酶基因工程菌。

[0043] 将重组醛缩酶基因工程菌接种到含有卡那霉素的LB培养基中,于37℃过夜培养,得到种子培养液;将种子培养液接种到含卡那霉素的TB培养基中,接种量为含卡那霉素的TB培养基体积的1%;然后置于37℃下培养2-5h,加入无菌的IPTG诱导,使IPTG终浓度达到0.1mM,置于25℃下继续培养20h。最后通过高速离心得到来源于*Escherichia coli*的醛缩酶基因工程菌全细胞。采用超声破碎方法对得到的基因工程菌全细胞进行超声破碎,得到

来源于*Escherichia coli*的醛缩酶基因工程菌全细胞的破碎酶液,即为如下实施例2-7所用的醛缩酶,所述醛缩酶氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

[0044] 2、酮酸脱羧酶的制备

[0045] 重组酮酸脱羧酶基因工程菌,具体制备方法是:选择来源于*Saccharomyces cerevisiae*的酮酸脱羧酶的氨基酸序列,进行人工设计,将人工设计后的序列通过全基因合成(委托金斯瑞生物科技有限公司合成),克隆入表达载体pET28a的Nde I和Xho I酶切位点,转化宿主菌*E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞;挑取阳性转化子并测序鉴定后,得到重组表达载体;将重组表达载体转入*E.coli* BL21 (DE3) 菌株中,获得可以诱导表达重组酮酸脱羧酶的重组酮酸脱羧酶基因工程菌。

[0046] 将重组酮酸脱羧酶基因工程菌接种到含有卡那霉素的LB培养基中,于37℃过夜培养,得到种子培养液;将种子培养液接种到含卡那霉素的TB培养基中,接种量为含卡那霉素的TB培养基体积的1%;然后置于37℃下培养2-5h,加入无菌的IPTG诱导,使IPTG终浓度达到0.1mM,置于25℃下继续培养20h。最后通过高速离心得到来源于*Saccharomyces cerevisiae*的酮酸脱羧酶基因工程菌全细胞。采用超声破碎方法对得到的基因工程菌全细胞进行超声破碎,得到来源于*Saccharomyces cerevisiae*的酮酸脱羧酶基因工程菌全细胞的破碎酶液,即为如下实施例2-7所用的酮酸脱羧酶,所述酮酸脱羧酶氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0047] 3、氨基酸脱羧酶的制备

[0048] 重组氨基酸脱羧酶基因工程菌,具体制备方法是:选择来源于*Saccharomyces cerevisiae*的氨基酸脱羧酶的氨基酸序列,进行人工设计,将人工设计后的序列通过全基因合成(委托金斯瑞生物科技有限公司合成),克隆入表达载体pET28a的Nde I和Xho I酶切位点,转化宿主菌*E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞;挑取阳性转化子并测序鉴定后,得到重组表达载体;将重组表达载体转入*E.coli* BL21 (DE3) 菌株中,获得可以诱导表达重组氨基酸脱羧酶的重组氨基酸脱羧酶基因工程菌。

[0049] 将重组氨基酸脱羧酶基因工程菌接种到含有卡那霉素的LB培养基中,于37℃过夜培养,得到种子培养液;将种子培养液接种到含卡那霉素的TB培养基中,接种量为含卡那霉素的TB培养基体积的1%;然后置于37℃下培养2-5h,加入无菌的IPTG诱导,使IPTG终浓度达到0.1mM,置于25℃下继续培养20h。最后通过高速离心得到来源于*Saccharomyces cerevisiae*的氨基酸脱羧酶基因工程菌全细胞。采用超声破碎方法对得到的基因工程菌全细胞进行超声破碎,得到来源于*Saccharomyces cerevisiae*的氨基酸脱羧酶基因工程菌全细胞的破碎酶液,即为如下实施例2-7所用的氨基酸脱羧酶,所述氨基酸脱羧酶氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

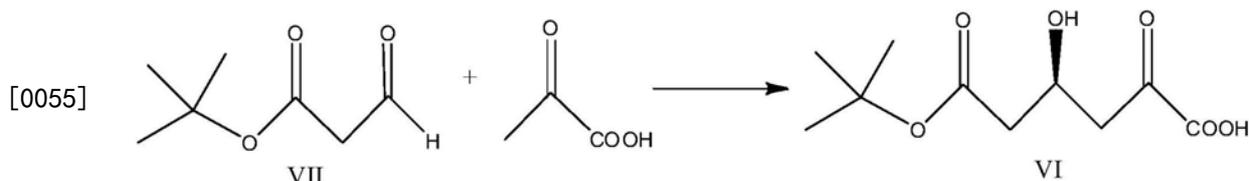
[0050] 4、转氨酶的制备

[0051] 重组转氨酶基因工程菌,具体制备方法是:选择来源于*Vibrio fluvialis*的转氨酶的氨基酸序列,进行人工设计,将人工设计后的序列通过全基因合成(委托金斯瑞生物科技有限公司合成),克隆入表达载体pET28a的Nde I和Xho I酶切位点,转化宿主菌*E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞;挑取阳性转化子并测序鉴定后,得到重组表达载体;将重组表达载体转入*E.coli* BL21 (DE3) 菌株中,获得可以诱导表达重组转氨酶的重组转氨酶基因工程菌。

[0052] 将重组转氨酶基因工程菌接种到含有卡那霉素的LB培养基中,于37℃过夜培养,得到种子培养液;将种子培养液接种到含卡那霉素的TB培养基中,接种量为含卡那霉素的TB培养基体积的1%;然后置于37℃下培养2-5h,加入无菌的IPTG诱导,使IPTG终浓度达到0.1mM,置于25℃下继续培养20h。最后通过高速离心得到来源于Vibrio fluvialis的转氨酶基因工程菌全细胞。采用超声破碎方法对得到的基因工程菌全细胞进行超声破碎,得到来源于Vibrio fluvialis的转氨酶基因工程菌全细胞的破碎酶液,即为如下实施例2-7所用的转氨酶,所述转氨酶氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0053] 实施例2

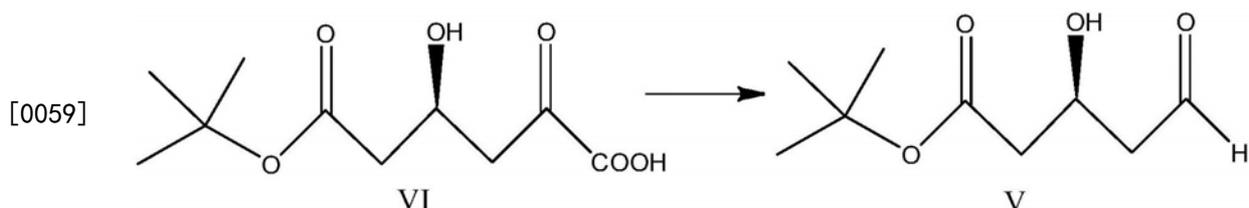
[0054] 式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸由式VII化合物3-羰基丙酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



[0056] 具体反应过程如下:在500mL摇瓶中,将式VII化合物3-羰基丙酸叔丁酯(10g, 69.44mmol)溶于40mL甲醇,再向摇瓶中加入丙酮酸(17.6g,0.200mol),再加入160mL磷酸盐缓冲溶液、40g的醛缩酶,醛缩酶的制备如实施例1,再加入1mM的PLP,20mM的MgCl₂,控制反应体系中pH值为7.5,在摇床中反应14h,后用乙酸乙酯萃取有机相,旋蒸,得到油状液体,气质联用检测产物,产物式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸的浓度(峰面积占比)为16.79%,ee值为76.43%。

[0057] 实施例3

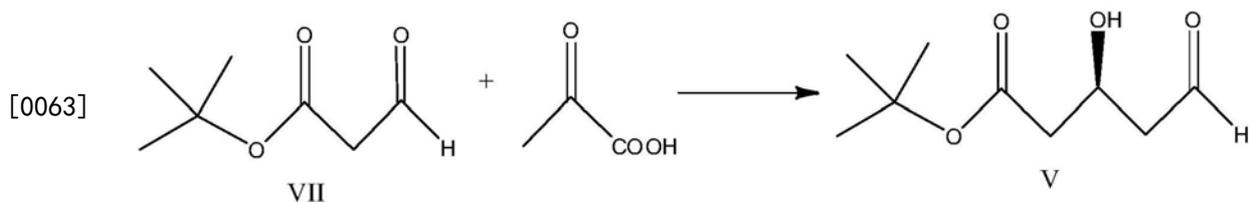
[0058] 式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸在酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:



[0060] 具体反应过程如下:在500mL摇瓶中,将式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸(20g,86.21mmol)溶于20mL的DMSO中,再向摇瓶中加入180mL磷酸盐缓冲溶液,再向摇瓶中加入30g的酮酸脱羧酶,酮酸脱羧酶的制备如实施例1,再加入1mM的TPP、20mM的MgCl₂,控制反应体系中pH值为8,控制反应体系中温度为6℃,在摇床中反应22h,纯化,经¹H-NMR和¹³C-NMR和MS确认得到产物V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯,收率为62.19%。

[0061] 实施例4

[0062] 式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯由式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸和丙酮酸在醛缩酶和酮酸脱羧酶的作用下进行酶催化一锅法反应生成,反应式如下:

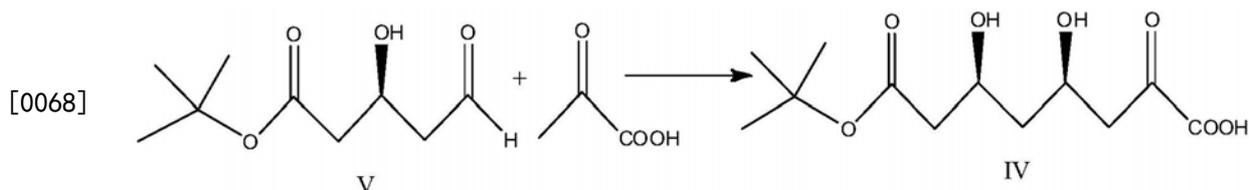


[0064] 具体反应过程如下:

[0065] 在500mL摇瓶中,将式VI化合物(S)-6-叔丁氧基-4-羟基-2,6-二羰基己酸(10g, 69.44mmol)溶于25mL的DMSO中,再向摇瓶中加入丙酮酸(26.4g, 0.300mol),加入175mL磷酸盐缓冲溶液,再向反应体系中加入40g的酮酸脱羧酶,1mM的TPP,40g的醛缩酶,1mM的PLP,20mM的MgCl₂,醛缩酶和酮酸脱羧酶的制备如实施例1,控制反应体系中pH值为7.5,在摇床中反应14h,用乙酸丁酯萃取有机相,旋蒸,得到油状液体,结构经¹H-NMR和¹³C-NMR和MS确认为式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯,收率为42.19%,产物式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯ee值为85.3%。

[0066] 实施例5

[0067] 式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸由式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯和丙酮酸在醛缩酶的作用下进行酶催化反应生成,反应式如下:

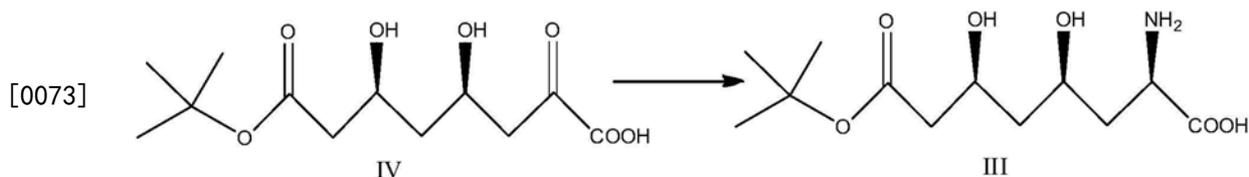


[0069] 具体反应过程如下:在500mL摇瓶中,将式V化合物(S)-3-羟基-1-羰基戊酸叔丁酯(9g, 47.87mmol)溶于20mL的DMSO中,再向摇瓶中加入丙酮酸(17.6g, 0.200mol),加入磷酸盐缓冲溶液180mL,再向反应体系中加入40g的醛缩酶,1mM的PLP,20mM的MgCl₂,醛缩酶的制备如实施例1,控制反应体系中pH值为8,在摇床中反应14h,萃取有机相,旋蒸,得到油状液体,结构经确认为式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸,转化率为76.79%。

[0070] 实施例6

[0071] 所述式II化合物(4R,6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2,2-二甲基-1,3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯的制备方法,包括以下步骤:

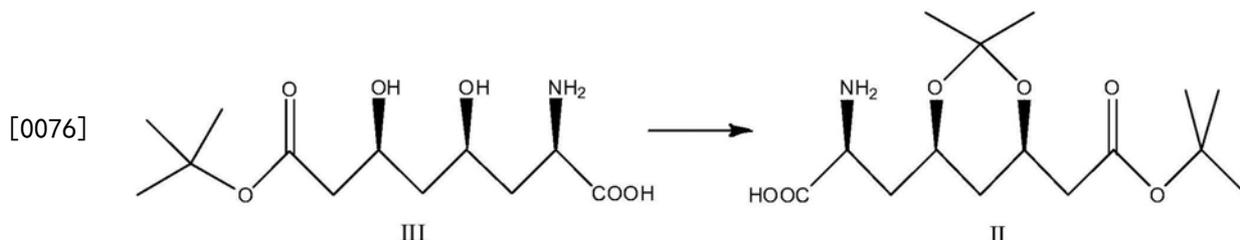
[0072] 步骤1:式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸在转氨酶的作用下进行酶催化反应生成式III化合物(2R,4S,6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-8-羰基辛酸;反应式如下:



[0074] 具体反应过程如下:在500mL摇瓶中,将式IV化合物(4R,6S)-8-叔丁氧基-4,6-二羟基-2,8-二羰基辛酸(16g, 57.97mmol)加入195mL的MOPS缓冲溶液中,再向反应体系中加入丙胺酸(17.8g, 0.2mol)和5mL乙醇,加入转氨酶和磷酸吡哆醛,转氨酶的投入浓度为25g/

L, 磷酸吡哆醛的投入浓度为15mM, 进行转化反应, 控制转化体系的pH值为7.5, 控制转化体系的温度为25℃, 转化18h, 得到转化液, 纯化, 得到油状液体, 产物结构经结果鉴定确认为式III化合物(2R, 4S, 6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4, 6-二羟基-8-羧基辛酸, 转化率为89.68%。

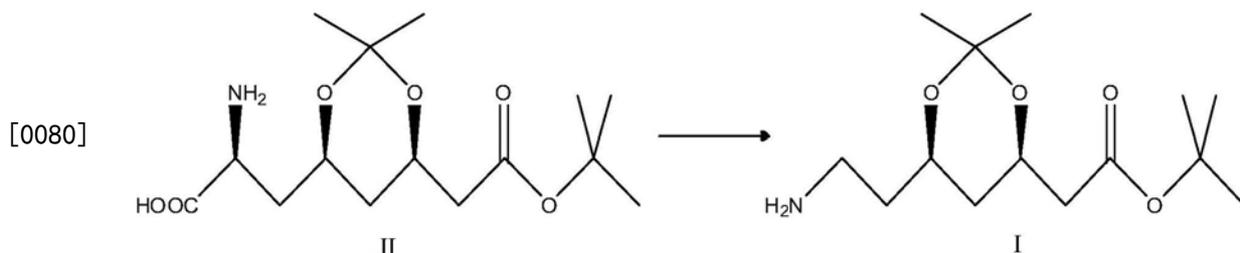
[0075] 步骤2: 式III化合物(2R, 4S, 6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4, 6-二羟基-8-羧基辛酸进行双羟基保护得到式II化合物(4R, 6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯, 采用的保护基为2, 2-二甲基丙烷;



[0077] 具体反应过程如下: 向200mL的圆底烧瓶中计入干燥的甲醇80mL, 将体系于-75℃下加入2, 2-二甲基丙烷(14.4g, 0.2mol), 式III化合物(2R, 4S, 6S)-2-氨基-8-叔丁氧基-4, 6-二羟基-8-羧基辛酸(22.16g, 0.08mol), 搅拌过夜, 旋蒸去除溶剂, 乙酸乙酯萃取, 饱和食盐水洗涤, 有机相用无水MgSO₄干燥, 过滤, 滤液减压浓缩经硅胶柱层析分离得到油状液体, 结构经鉴定为式II化合物(4R, 6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯。收率为73.31%。

[0078] 实施例7

[0079] 式II化合物(4R, 6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯在氨基酸脱羧酶的作用下进行酶催化反应生成式I化合物(4R, 6R)-6-(氨基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯, 即为阿托伐他汀中间体, 反应式如下:



[0081] 具体反应过程如下:

[0082] 在烧杯中将式II化合物(4R, 6R)-6-(1-氨基-1-羧基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯(20g, 0.063mol)溶于20mL的DMSO中, 用磷酸盐缓冲溶液将反应体系定容至200mL, 反应体系转入500mL摇瓶中, 再向摇瓶中加入20mM的MgCl₂, 46g的氨基酸脱羧酶, 1mM的TPP, 氨基酸脱羧酶的制备如实施例1, 控制反应体系中pH值为7.5, 在摇床中反应14h, 萃取有机相, 旋蒸, 得到油状液体, 产物结构经¹H-NMR和¹³C-NMR和MS确认为式I化合物(4R, 6R)-6-(氨基乙基)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧六环-4-乙酸叔丁酯, 即为阿托伐他汀中间体, 数据如下: $[\alpha]_D^{14} = +16.8$ (C 0.34, CHCl₃)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) $\delta = 4.24 \sim 4.27$ (m, 1H), 3.95 ~ 4.02 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 2.89 (m, 2H), 2.42 (dd, 1H), 2.29 (dd, 1H), 1.62 ~ 1.74 (m, 2H), 1.51 ~ 1.58 (m, 1H), 1.45 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (s, 3H), 1.21 ~ 1.29 (m, 1H)。¹³C NMR (100MHz, CDCl₃) $\delta = 170.1, 98.8, 80.4, 67.3, 66.1, 42.5, 39.1, 38.1, 36.4, 29.9, 28.1,$

19.7. MS (ESI) :m/z 274 [M+H]⁺。收率为56.79%。

[0083] 本说明书中未作详细描述的内容,属于本专业技术人员公知的现有技术。

序列表

<110> 浙江宏元药业股份有限公司

<120> 阿托伐他汀中间体的生物合成方法

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 635

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 1

[0001]

Met Ala Pro Val Thr Ile Ala Leu Pro Gly Ala Gly Gly Gly Ala His
1 5 10 15
Val Val Ser Ala Ala Ser Ala Thr Ile Pro Pro Gly Gly Thr Ile Pro
 20 25 30
Leu Ala Leu Leu Ser Ile Ala Thr Leu Ser Val Pro Gly Val Pro Gly
 35 40 45
Ala Pro Ala Leu Ser Leu Leu Gly Thr Leu Thr Ala Pro Ser Val Gly
 50 55 60
Gly Ala Gly Leu Ala Thr Val Gly Thr Cys Ala Gly Leu Ala Ala Ala
65 70 75 80
Thr Ala Ala Ala Gly Thr Ser Ala Thr Ser Ala Leu Ile Gly Cys Leu
 85 90 95
Ile Thr Thr Thr Gly Val Gly Gly Leu Ser Ala Leu Ala Gly Ile Ala
 100 105 110
Gly Ala Pro Ala Gly Ala Val Leu Val Leu His Ile Val Gly Val Ala
 115 120 125
Leu Ser Thr Ala Ser Ala Ser Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ala Leu His
 130 135 140
His Leu Val Pro Gly Leu His Ala Ser Ala Pro Leu Gly Pro Ala His
145 150 155 160
Leu Val Thr His Ala Met Val Leu Ala Ala Val Ala Cys Ser Val Ala
 165 170 175
Thr Leu Gly Ala Ile Gly Thr Ala Cys Ala Gly Val Ala Ala Val Ile
 180 185 190
Ala Ala Ile Thr Ala Thr Ser Leu Pro Gly Thr Ile Pro Val Pro Ala
 195 200 205
Ala Pro Ala Met Ser Val Thr Cys Ala Ala Leu Ile Ala Val Pro
210 215 220

	Ala Ile Ser Gly Gly Ala Cys Ile Ala Thr Pro Ser Gly Ala Gly Leu		
	225	230	240
	Ser Ala Ile Ile Ala Leu Ile Thr Ser Thr Ile Thr Ser Ser Leu Thr		
	245	250	255
	Pro Ala Ile Leu Gly Ala Val Leu Thr Ala Ala Thr Gly Val Ser Ala		
	260	265	270
	Pro Leu Ala Leu Leu Ile Cys Ala Ser Gly Ile Thr Ala Pro Ser Thr		
	275	280	285
	Val Met Gly Leu Ser Val Ile Ala Gly Thr Ala Pro Ser Thr Met Gly		
	290	295	300
	Gly Thr Ala Gly Leu Gly Gly Leu Leu Gly Val Thr Gly His Pro Gly		
	305	310	320
	Leu Cys Ala Leu Ile Leu His Pro Gly Val Ala Ile Ala Gly Ile Ala		
	325	330	335
	Ala Gly His Thr Ser Pro Thr Thr Leu Pro Ala Ala Leu Ile Ile Gly		
	340	345	350
	Pro His Pro Ala Thr Ile Ala Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Gly Gly		
	355	360	365
	Gly Met Pro Leu Gly Thr Ala Pro Ala Pro Ile Leu Leu Gly Leu Thr		
	370	375	380
	Gly His Ile Ala Val Ser Leu Leu Ser Leu Gly Thr Ala Ser Ala Val		
	385	390	400
[0002]	Thr Gly Thr Thr Ala Gly Thr Met Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ala Gly		
	405	410	415
	Gly Ser Ser Ile Ile Thr Gly Val His Leu Gly Leu Thr Ile Pro Leu		
	420	425	430
	Pro Leu Ala Pro Gly Ala Val Val Val Cys Gly Thr Gly Ser Pro Gly		
	435	440	445
	Pro Ser Val Ala Ala Pro Ala Pro Pro Thr Gly Leu Leu Thr Ile Ser		
	450	455	460
	Gly Gly Pro Pro Leu Ser Ile Gly Met Ala Leu Pro Ala Ala Leu Gly		
	465	470	480
	Val Gly Ile Ala Met Gly Ala His Ser Ala Ala His Ile Ala Gly Gly		
	485	490	495
	Ala Ile Leu Gly Gly Thr Leu Pro Ala Leu Ile Leu Pro Gly Gly Ala		
	500	505	510
	Gly Ala Ala Gly Met Thr Ile Gly Gly Leu Ser Thr Ile Leu Leu Cys		
	515	520	525
	Ala Ile Pro Leu Gly Val Ile Ile Thr Ala Ala Ala Gly Thr Thr Ile		
	530	535	540
	Gly Ala Ala Ile Met Gly Pro Thr Ala Ser Thr Ala Ala Val Met Ser		
	545	550	560
	Thr Leu Thr Thr Leu Leu Pro Gly Ala Pro Gly Ala Pro Ala Gly Leu		
	565	570	575

	Thr Thr Ala Ser Thr Ile Ile Gly Cys Pro Ser Leu Leu Ala Leu Leu	
	580	590
	Leu Gly Gly Leu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Ser Gly Ile Gly Leu Leu	
	595	605
	Gly Val Leu Leu Gly Gly Leu Ala Pro Pro Gly Gly Leu Leu Cys Met	
	610	620
	Val Gly Ala Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu	
	625	635
	<210> 2	
	<211> 453	
	<212> PRT	
	<213> <i>Vibrio fluvialis</i>	
	<400> 2	
	Met Ala Leu Pro Gly Ser Thr Gly Ser Ala Ala Gly Thr Thr Ser Leu	
	1	15
	Thr Gly Pro Thr Ala Leu Pro Ser Val His Gly Ala Gly Thr Val Val	
	20	30
	Val Thr His Gly Gly Gly Pro Thr Ile Val Ala Val Ala Gly Ala Ala	
	35	45
[0003]	Thr Leu Ala Ala Ala Ser Gly Leu Thr Ala Met Val Ala Gly Pro Ala	
	50	60
	His Pro Gly Leu Ile Ala Ala Ala Leu Ala Gly Thr Gly Ala Pro Pro	
	65	80
	Gly Thr His Ala Pro Pro Gly Ala Met Ser Ala Gly Thr Val Met Leu	
	85	95
	Ser Gly Leu Leu Val Gly Ala Ser Pro Pro Ala Ser Gly Ala Val Pro	
	100	110
	Thr Thr Ala Ser Gly Ser Gly Ala Ala Ala Thr Met Val Leu Met Leu	
	115	125
	Thr Pro Leu Gly Ala Ala Gly Gly His Pro Gly Leu Ala Leu Ile Leu	
	130	140
	Thr Ala Thr Ala Ala Thr His Gly Val Thr Ala Val Ser Ala Ser Met	
	145	160
	Thr Gly Leu Pro Thr Ala Ser Leu Pro Gly Leu Pro Leu Pro Gly Pro	
	165	175
	Ile His Leu Thr Cys Pro His Thr Thr Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly	
	180	190
	Thr Gly Ala Ala Pro Thr Ala Ala Leu Ala Ala Gly Leu Gly Ala Thr	
	195	205
	Ile Gly Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ile Ala Gly Pro Pro Ala Gly Pro	
	210	220
	Val Met Gly Ala Gly Gly Val Ile Pro Pro Ser Gly Gly Thr Pro Gly	

	225	230	235	240
	Ala Ile Leu Pro Val Leu Ala Leu Thr Gly Ile Pro Val Ile Ser Ala			
		245	250	255
	Gly Val Ile Cys Gly Pro Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Cys Val			
		260	265	270
	Thr Thr Ala Pro Thr Pro Ala Ala Ile Ile Ser Ser Leu Ala Ile Thr			
		275	280	285
	Ala Gly Pro Pro Pro Met Gly Ala Val Ile Leu Gly Pro Gly Leu Ala			
		290	295	300
	Leu Ala Leu Gly Thr Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Pro Pro His Gly			
	305	310	315	320
	Pro Thr Ala Ser Gly His Pro Val Gly Cys Ala Ile Ala Leu Leu Ala			
		325	330	335
	Ile Ala Val Val Met Ala Gly Gly Leu Ala Gly Ala Val Ala Ala Leu			
		340	345	350
	Thr Pro Ala Pro Gly Gly Ala Leu Leu His Ile Ala Gly Ala Pro Ala			
		355	360	365
	Ile Gly Gly Thr Ala Gly Leu Gly Pro Met Thr Ala Leu Gly Ala Val			
		370	375	380
	Leu Ala Leu Ala Ser Leu Thr Pro Pro Ala Gly Ala Leu Ser Val Ser			
	385	390	395	400
[0004]	Gly Ala Ile Ala Ala Thr Cys Thr Ala Leu Gly Leu Ile Cys Ala Pro			
		405	410	415
	Leu Gly Gly Ser Val Val Leu Cys Pro Pro Pro Ile Leu Thr Gly Ala			
		420	425	430
	Gly Met Ala Gly Met Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Ala Leu Val			
		435	440	445
	Pro Ala Gly Val Ala			
		450		
	<210> 3			
	<211> 216			
	<212> PRT			
	<213> Escherichia coli			
	<400> 3			
	Met Leu Ala Thr Leu Thr Ser Ala Gly Ser Ile Leu Thr Thr Gly Pro			
		5	10	15
	Val Val Pro Val Ile Val Val Gly Ala Leu Gly His Ala Val Pro Ala			
		20	25	30
	Ala Leu Ala Leu Val Ala Gly Gly Val Ala Val Leu Gly Val Thr Leu			
		35	40	45
	Ala Thr Gly Cys Ala Val Ala Ala Ile Ala Ala Ile Ala Leu Gly Val			
		50	55	60

	130	135	140	
	Ala Pro Ala Gly Ile Ala Ala Cys Ile Ala Thr Thr Thr Val Thr Gly			
	145	150	155	160
	Ala Pro Val Thr Leu Gly Leu Pro Ala Ala Leu Val Ala Leu Ala Val			
	165	170		175
	Pro Ala Leu Leu Leu Gly Thr Pro Ile Ala Met Ser Leu Leu Pro Ala			
	180	185		190
	Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly Val Ile Ala Thr Ile Leu Val Leu Ala			
	195	200	205	
	Leu Ala Ala Leu Ala Pro Val Ile Leu Ala Ala Ala Cys Cys Ser Ala			
	210	215	220	
	His Ala Val Leu Ala Gly Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Thr Gly Pro			
	225	230	235	240
	Pro Val Pro Val Thr Pro Met Gly Leu Gly Ala Ile Ser Gly Gly His			
	245	250		255
	Pro Ala Thr Gly Gly Val Thr Val Gly Thr Leu Ser Ala Pro Gly Val			
	260	265	270	
	Leu Gly Ala Val Gly Ser Ala Ala Leu Ile Leu Ser Val Gly Ala Leu			
	275	280	285	
	Leu Ser Ala Pro Ala Thr Gly Ser Pro Ser Thr Ser Thr Leu Thr Leu			
	290	295	300	
[0006]	Ala Ile Val Gly Pro His Ser Ala His Met Leu Ile Ala Ala Ala Thr			
	305	310	315	320
	Pro Pro Gly Val Gly Met Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Ala Ala			
	325	330		335
	Ile Ala Ala Ala Ala Leu Gly Thr Leu Pro Val Ala Val Pro Ala Ala			
	340	345	350	
	Thr Pro Ala Ala Ala Ala Val Pro Ala Ser Thr Pro Leu Leu Gly Gly			
	355	360	365	
	Thr Met Thr Ala Gly Leu Gly Ala Pro Leu Gly Gly Gly Ala Val Val			
	370	375	380	
	Ile Ala Gly Thr Gly Thr Ser Ala Pro Gly Ile Ala Gly Thr Thr Pro			
	385	390	395	400
	Pro Thr Ala Thr Thr Gly Ile Ser Gly Val Leu Thr Gly Ser Ile Gly			
	405	410		415
	Pro Thr Thr Gly Ala Leu Leu Gly Ala Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ile			
	420	425	430	
	Ala Pro Leu Leu Ala Val Ile Leu Pro Ile Gly Ala Gly Ser Leu Gly			
	435	440	445	
	Leu Thr Val Gly Gly Ile Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Leu Leu Pro			
	450	455	460	
	Thr Ile Pro Val Leu Ala Ala Ala Gly Thr Thr Ile Gly Leu Leu Ile			
	465	470	475	480
	His Gly Pro His Ala Gly Thr Ala Gly Ile Gly Gly Thr Ala His Leu			

	485	490	495
	Ala Leu Leu Pro Thr Pro Gly Ala Leu Ala Thr Gly Thr His Ala Val		
	500	505	510
	Ala Thr Thr Gly Gly Thr Ala Leu Leu Thr Gly Ala Leu Ser Pro Ala		
	515	520	525
[0007]	Ala Ala Ser Leu Ile Ala Met Ile Gly Val Met Leu Pro Val Pro Ala		
	530	535	540
	Ala Pro Gly Ala Leu Val Leu Gly Ala Leu Leu Thr Ala Ala Thr Ala		
	545	550	555
			560
	Ala Leu Gly		