

## 核苷中 2'-位取代基对 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶 选择性酰化核苷的影响

王朝宇<sup>1,2</sup>, 宗敏华<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏淮安 223003

<sup>2</sup> 华南理工大学应用生物催化研究室, 广东广州 510640

**摘要:** 研究了核苷结构中 2'-位含有不同取代基时 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶促 3'-位羟基高区域选择性酰化反应。结果表明, 该脂肪酶催化核苷类似物酰化的优势产物均为 3'-酯, 且随着酰基供体链的增长, 3'-区域选择性逐渐升高; 在酶促核苷类似物酰化反应中, 当核苷 2'-位含有 H, F, Cl 和 Br 取代基时, 3'-区域选择性最高 (89%~98%); 当 2'-位含有 OH 或 OCH<sub>3</sub> 时, 3'-区域选择性较低 (69%~74%)。

**关键词:** 核苷类似物; 选择性酰化; 酶催化; 底物识别

中图分类号: O643 文献标识码: A

## Influence of 2'-Substituent in the Nucleosides on *Burkholderia cepacia* Lipase-Catalyzed Regioselective Acylation

WANG Zhaoyu<sup>1,2,\*</sup>, ZONG Minhua<sup>2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223003, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Laboratory of Applied Biocatalysis, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

**Abstract:** The influence of 2'-differing substituent in the nucleosides on 3'-OH regioselective acylation catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase was investigated. The results revealed that the dominant products in the *Burkholderia cepacia* lipase-catalyzed acylation proved to be 3'-O-esters and the 3'-regioselectivity increased with the elongation of the aliphatic chain of the acyl donors. *Burkholderia cepacia* lipase displayed excellent 3'-regioselectivity (89%~98%) in the decanoylation of nucleoside analogs possessing 2'-substitute (such as H, F, Cl, and Br), while low 3'-regioselectivity (69%~74%) to the OH and OCH<sub>3</sub> substitute in 2'-position.

**Key words:** nucleoside analog; regioselective acylation; enzyme catalysis; substrate recognition

多羟基核苷类药物的选择性酰化一直都是核苷化学领域研究的难点和热点<sup>[1]</sup>; 也是获取具有更高药效的核苷类新药的有效途径之一<sup>[2]</sup>。这主要是由于很多核苷类药物经酰化后可显著改善母药在临床使用过程中普遍存在的脂溶性差、糖苷键易断裂、毒副作用大及生物利用度低等问题。其次, 核苷酰化反应一直是有机合成中重要的基团保护反应, 其酯衍生物单体既是抗病毒药物的中间体, 也是合成各种寡聚核苷酸和具有特殊生物学功能的高分子材料的重要砌块<sup>[3~5]</sup>。

药理研究表明, 某些核苷的 3'-酯的药理活性比 5'-酯更高<sup>[6]</sup>。目前, 采用化学法进行核苷 3'-酯酰化主要有两种: (1) 通过优化或改进产物的分离纯化技术, 将其从非选择性酰化后混合物中分离纯化; (2) 通过繁琐的保护/脱保护等多步反应选择性地合成<sup>[1,7]</sup>。前者区域选择性差, 副产物多, 产物收率低, 分离纯化困难; 后者则需多步反应, 引入溶剂多, 环境污染严重。20 世纪 80 年代兴起的酶促核苷酯衍生物的合成方法正以快速高效、高选择性和绿色无污染的优点逐步取代有机合成方法, 特别是酰化核

收稿日期: 2010-09-03. 接收日期: 2010-11-19.

联系人: 王朝宇. Tel/Fax: (0517)83591165; E-mail: biowzy@126.com

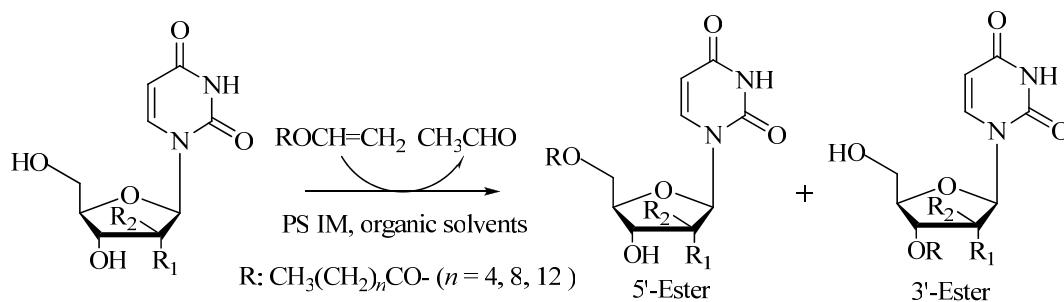
基金来源: 国家自然科学基金(20676043, 20876059).

苷结构中含有比 5'-位伯羟基活性低的 3'-位仲羟基时, 酶法更是具有化学法不可比拟的高选择性优势<sup>[8]</sup>.

目前用于催化 3'-位羟基酰化的酶中, 以来源于 *Burkholderia cepacia* 的脂肪酶催化效果最佳<sup>[9]</sup>. 对此, Lavandera 等<sup>[10]</sup>以  $\beta$ -胸苷丁酰化 (C4) 为模型进行了分子解释, 但并未对核苷结构 2'-位含有取代基

时的 3'-位区域选择性进行讨论. 本文在前期研究基础上<sup>[11–14]</sup>, 采用 2'-位含不同取代基的核苷类似物 and 不同链长的酰基供体为反应底物, 以来源于 *Burkholderia cepacia* 的固定化脂肪酶 PS IM 为催化剂, 探讨核苷类似物的 3'-酯区域选择性合成过程中底物识别规律, 进一步丰富该酶促反应的分子基础.

图式 1 为脂肪酶催化核苷类化合物酰化反应.



图式 1 脂肪酶催化核苷类化合物酰化反应

Scheme 1. Lipase-catalyzed acylation of nucleosides. PS IM—*Burkholderia cepacia* lipase.

## 1 实验部分

### 1.1 脂肪酶促核苷酰化反应

分别在 10 ml 带塞三角瓶中加入 2 ml 脱水溶剂 (将 4 A 分子筛 (购自天津市科密欧化学试剂公司) 于 350 °C 活化 4 h, 置于干燥器中冷却后, 加入到有机溶剂中, 室温振荡 48 h, 滤去分子筛, 得脱水溶剂)、0.04 mmol 核苷 (2'-脱氧尿苷 (纯度 99%)、尿苷 (纯度 99%)、阿糖尿苷 (纯度 99%)、2'-脱氧-2'-氟尿苷 (纯度 99%)、2'-脱氧-2'-氯尿苷 (纯度 98%)、2'-脱氧-2'-溴尿苷 (纯度 98%) 和 2'-脱氧-2'-甲氧基尿苷 (纯度 99%) 均购自 Sigm-Aldrich 公司) 和 0.40 mmol 羧酸乙烯酯 (己酸乙烯酯 (纯度 98%) 和癸酸乙烯酯 (纯度 99%) 购自 TCI 公司; 肉豆蔻酸乙烯酯 (纯度 98%) 购自 Alfa Aesar 公司) 混合均匀, 置于气浴恒温振荡器内 (40 °C, 200 r/min), 加入 50 U 酶 (脂肪酶 CAL-B (来源于南极假丝酵母 *Candida antarctica* B, 固定化于大孔阴离子树脂)、脂肪酶 TLL (来源于嗜热丝孢菌 *Thermomyces lanuginosus*, 固定化于大孔阴离子树脂) 和脂肪酶 RML (来源于根霉 *Rhizomucor miehei*, 固定化于大孔阴离子交换树脂) 均购自 Novozymes 公司; 脂肪酶 PS IM (来源于洋葱布克氏菌 *Burkholderia cepacia*, 固定化于硅藻土) 购自 Amano 公司) 启动反应, 定时取样 20  $\mu$ l,

在 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (配备 G1311A 四元泵和 VWD 可变波长紫外检测器, Zorbax SB-C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m, Agilent) 色谱柱. 2'-脱氧尿苷、尿苷、阿糖尿苷、2'-脱氧-2'-氟尿苷、2'-脱氧-2'-氯尿苷、2'-脱氧-2'-溴尿苷、2'-脱氧-2'-甲氧基尿苷的紫外分析波长分别为 261, 261, 263, 260, 260, 260 和 260 nm) 上分析. 底物转化率为反应后底物减少的量与反应前底物的量之比, 区域选择性用目的酰化产物的浓度与所有酰化产物的浓度之比来表征<sup>[15]</sup>.

### 1.2 产物的纯化与结构鉴定

将上述反应分别放大 10 倍, 反应结束后过滤酶, 真空浓缩滤液. 利用石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱, 进行快速柱层析. 核苷类化合物的酯衍生物的结构通过核磁共振 (德国 Bruker DRX-400 型核磁共振波谱仪) 碳谱 (<sup>13</sup>C NMR, 100.5 MHz) 和氢谱 (<sup>1</sup>H NMR, 400 MHz) 鉴定.

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶来源的影响

来源不同的脂肪酶在催化水解或酯化反应中均遵循相似的机理, 但由于其活性中心结构的差异, 它们在多羟基化合物区域选择性酰化反应中往往表现出不同的区域选择性. Ozaki 等<sup>[16]</sup>在研究酶促 5-氟

尿苷酰化反应时,发现来源于 *Pseudomonas sp.*, *Candida antarctica* B 和 *Mucor javanicus* 的脂肪酶分别优先酰化底物中的 3', 5' 和 2'-OH. 故本文首先以 2'-脱氧-2'-氟尿苷癸酰化反应为模型,研究了来源不同的脂肪酶催化该反应的区域选择性,结果列于表 1.

由表可见,除 RML 外,所选用的脂肪酶均表现出很高的催化活性,底物转化率达 99%. TLL,

CAL-B 和 RML 催化 2'-脱氧-2'-氟尿苷癸酰化的优势产物是 5'-酯,但 PS IM 催化该反应的优势位点则是 3'-羟基. X-射线晶体结构研究表明,TLL 的活性中心位于酶蛋白表面,呈狭窄的“裂缝”状; CAL-B 的活性中心则呈窄而长的“烟囱”状<sup>[17]</sup>. 因此,当核苷 2'-位含有取代基时,5'-伯羟基的空间位阻明显小于 3'-仲羟基,从而更容易进入这两种酶的活性中心进攻酶-酰基过渡中间体而形成优势产物 5'-酯.

表 1 不同来源的脂肪酶促 2'-脱氧-2'-氟尿苷 3'-区域选择性癸酰化反应  
Table 1 3'-Regioselective decanoylation of 2'-deoxy-2'-fluorouridine catalyzed by various lipases

Lipase	Time <sup>a</sup> (h)	Conversion <sup>b</sup> (%)	Regioselectivity (%)	
			5'-Ester	3'-Ester
<i>Burkholderia cepacia</i> lipase (PS IM)	9.0	99	6	89
<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase (TLL)	2.0	99	93	2
<i>Candida antarctica</i> B lipase (CAL-B)	10.0	99	94	3
<i>Rhizomucor miehei</i> lipase (RML)	15.0	10	88	4

Reaction conditions: 40 °C, 200 r/min, 2'-deoxy-2'-fluorouridine 0.04 mmol, vinyl decanoate 0.40 mmol, 50 U lipase into 2 ml anhydrous THF.

<sup>a</sup>Reaction time when the maximum conversion was achieved.

<sup>b</sup>Maximum substrate conversion.

Lavandera 等<sup>[10]</sup>的研究发现,在形成 3'-酰化过渡态时, $\beta$ -胸苷的 2'-脱氧核糖部分位于 *Burkholderia cepacia* 脂肪酶活性中心的“中等大小口袋”内,而碱基部分则延伸至“小疏水性口袋”. 这种键合方式可有效避免空间位阻,有利于核苷亲和进攻酰基-酶过渡中间体形成 3'-酯. 此外,碱基的疏水性部位 (C5-C6-C7) 与“小疏水性口袋”中的 Leu 287 之间的疏水性相互作用和其他 3 个远程氢键都会起到稳定 3'-酰化过渡态的作用,使得 PS IM 对 3'-羟基表现出高的区域选择性.

## 2.2 有机溶剂的影响

“介质工程”是非水相酶学研究的重要内容之一. 通过改变反应溶剂,可有效调节非水相中酶的活性、选择性和稳定性<sup>[18,19]</sup>. Li 等<sup>[20]</sup>在利用固定化脂肪酶 PSL 促阿昔洛维酰化时发现,在极性溶剂二甲基亚砜 (DMSO) 中酰化产物为 2-N 形成的酰胺,而在弱极性溶剂叔丁醇中酰化产物则变成 3'-O 酯. 然而,在核苷类化合物的酶法修饰中往往存在矛盾:溶解核苷底物需要强极性的溶剂,而保持酶活需要溶剂具有较强疏水性;但强极性溶剂容易剥夺酶分子表面的“必需水”,增加酶分子的“刚性”,使酶催化活性丧失.

表 2 为有机溶剂对 PS IM 催化 2'-脱氧-2'-氟尿

苷癸酰化反应的影响. 由表可见,在所考察的 5 种溶剂中,PS IM 均表现出较好的催化性能. 其中以乙腈和丙酮为溶剂时酶促反应相对较快,但其 3'-区域选择性 (77% 和 80%) 却低于四氢呋喃 (THF) 中的 89%. 这可能是由于在疏水性相对较强的 THF 中,酶的活性中心能更好地维持催化 2'-脱氧-2'-氟尿苷 3'-酯合成所需的“柔性”结构.

虽然化学惰性较好的叔丁醇已被广泛用作生物柴油和糖酯等的酶促反应溶剂<sup>[21]</sup>;但叔丁醇粘度过大,容易产生传质阻力,因而限制了其在核苷酰化反应中的应用. 综合考虑,下文中均选择 THF 作为反应介质.

表 2 有机溶剂对 PS IM 催化 2'-脱氧-2'-氟尿苷癸酰化反应的影响

Table 2 Effect of organic solvents on PS IM-catalyzed decanoylation of 2'-deoxy-2'-fluorouridine

Solvent	Time (h)	Conversion (%)	Regioselectivity (%)	
			5'-Ester	3'-Ester
Acetonitrile	5.0	99	15	77
Acetone	6.5	99	13	80
THF	9.0	99	6	89
Dioxane	9.5	91	10	83
<i>tert</i> -Butanol	15.0	87	9	84

Reaction conditions: 40 °C, 200 r/min, 2'-deoxy-2'-fluorouridine 0.04 mmol, vinyl decanoate 0.40 mmol, 50 U PS IM into 2 ml anhydrous solvent.

### 2.3 核苷结构中取代基的影响

表 3 为底物结构中取代基对 PS IM 催化核苷类化合物癸酰化反应的影响。可以看出, 7 种底物结构的核苷酰化的优势产物均为 3'-酯衍生物, 且以 2'-脱氧尿苷癸酰化反应速度最快, 仅用 3.5 h 底物转化率就达 99%。2'-位含有电负性较强的取代基(H 除外)所产生的诱导效应可有效降低邻位 3'-羟基的亲核活性, 因而反应速度降低。还可以看出, 当底物含有可形成氢键受体或供体(实验 5~7)时, 其癸酰化的 3'-区域选择性均比不含氢键受体或供体底物的低。文献[10,22]的研究认为, 来源于 *Burkholderia cepacia* 的脂肪酶在催化核苷区域选择性酰化反应中, 当形成 3'-酰化过渡态中间体时, 2'-位指向反应溶剂; 而当形成 5'-酰化过渡态中间体时, 2'-位则指向活性中心的“小疏水性口袋”。所以, 我们推断由于“小疏水性口袋”中存在 Tyr 残基<sup>[22]</sup>, 在 5'-酰化时, 2'-位的 OH 或 OCH<sub>3</sub> 中 O 易与附近的 Tyr 29 或 Tyr 23 的酚羟基间形成氢键, 从而稳定了 5'-酰化过渡态, 故导致酶促含氢键受体或供体的底物酰化反应(实验 5~7)表现出较低的 3'-区域选择性。

表 3 底物结构中取代基对 PS IM 催化核苷类化合物癸酰化反应的影响

Table 3 Effect of the substituents in substrate structure on PS IM-catalyzed decanoylation of nucleosides

Entry	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Time (h)	Conversion (%)	Regioselectivity (%)	
					5'-Ester	3'-Ester
1	H	H	3.5	99	2	96
2	F	H	9.0	99	6	89
3	Cl	H	10.5	99	3	95
4	Br	H	26.0	98	2	98
5	H	OH	18.0	98	13	74
6	OH	H	13.0	98	11	69
7	OCH <sub>3</sub>	H	15.5	99	22	73

Reaction conditions: 40 °C, 200 r/min, nucleosides 0.04 mmol, vinyl decanoate 0.40 mmol, 50 U PS IM into 2 ml anhydrous THF.

当 R<sub>1</sub> 取代基为 F, Cl 或 Br 时(实验 2~4), 随着取代基体积的增大, 酶促反应的 3'-区域选择性逐渐升高, 反应速率则随之减缓。因为酶促反应在形成 5'-酰化过渡态时, 2'-位指向空间非常有限的“小疏水性口袋”, 所以当 2'-位连有体积较大的卤素原子时, 必然会与“小疏水性口袋”之间形成空间位阻, 从而产生较大空间张力; 且这种张力随着卤素原子的增大而增加, 从而导致 5'-酰化过渡态的失稳, 降低了

5'-区域选择性, 从而有利于 3'-酯的合成。

### 2.4 酰基供体链长的影响

为了更好地理解 PS IM 在核苷酰化反应中底物识别特异性, 本文选取癸酰化反应中 3'-区域选择性较高的(表 3, 实验 1~4)的核苷类似物为模型底物, 通过改变另一反应底物酰基供体的链长, 研究了核苷酰化反应中 PS IM 对酰基供体的识别特异性, 结果列于表 4 和表 5。

表 4 底物结构对 PS IM 催化核苷类化合物己酰化反应的影响

Table 4 Effect of substrate structure on PS IM-catalyzed hexanoylation of nucleosides

Entry	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Time (h)	Conversion (%)	Regioselectivity (%)	
					5'-Ester	3'-Ester
1	H	H	1.5	99	4	91
2	F	H	7.5	98	14	83
3	Cl	H	9.0	99	3	90
4	Br	H	15.0	98	3	93

Reaction conditions: 40 °C, 200 r/min, nucleosides 0.04 mmol, vinyl hexanoate 0.40 mmol, 50 U PS IM into 2 ml anhydrous THF.

表 5 底物结构对 PS IM 催化核苷类化合物肉豆蔻酰化反应的影响

Table 5 Effect of substrate structure on PS IM-catalyzed myristoylation of nucleosides

Entry	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Time (h)	Conversion (%)	Regioselectivity (%)	
					5'-Ester	3'-Ester
1	H	H	4.5	99	1	99
2	F	H	11.5	98	7	93
3	Cl	H	13.5	99	3	97
4	Br	H	39.0	99	1	99

Reaction conditions: 40 °C, 200 r/min, nucleosides 0.04 mmol, vinyl myristate 0.40 mmol, 50 U PS IM into 2 ml anhydrous THF.

由表 4 和表 5 可见, 随着酰基链长由 C6 增加到 C14, 酶促反应速率降低, 底物转化率保持不变, 但 3'-区域选择性升高。由上文中可知, 在形成 3'-酰化过渡态时, 核苷的碱基朝向“小疏水性口袋”; 在形成 5'-酰化过渡态时, 碱基指向溶剂并靠近酰基供体的键合区域“大疏水性口袋”。所以, 随着酰基链长的增加, 碱基侧面与酰基链由于空间位阻而产生的张力增大, 从而降低了 5'-酰化过渡态稳定性, 有利于 3'-酯的生成。

## 3 结论

以 2'-位含有不同取代基的多羟基核苷类似物的酰化为模型反应, 探讨了来源于 *Burkholderia ce-*

*pacia* 的固定化脂肪酶 PS IM 在催化核苷类似物 3'-酯高选择性合成过程中的底物识别特异性. 构效分析表明, 酶促核苷类似物酰化反应中 3'-区域选择性与 PS IM 活性中心结构及反应底物结构有关. 同时, 本文还合成了一系列结构新颖的核苷类似物酯衍生物, 为活性物质的筛选提供了基础.

### 参 考 文 献

- 1 Ferrero M, Gotor V. *Monats Chem*, 2000, **131**: 585
- 2 Matsuda A, Sasaki T. *Cancer Sci*, 2004, **95**: 105
- 3 Garcia J, Fernandez S, Ferrero M, Sanghvi Y S, Gotor V. *Nucleos Nucleot Nucl*, 2003, **22**: 1455
- 4 Sun X F, Wang N, Wu Q, Lin X F. *Biotechnol Lett*, 2004, **26**: 1019
- 5 Wang P, Dordick J S. *Macromolecules*, 1998, **31**: 941
- 6 Hamamura E K, Prystasz M, Verheyden J P H, Moffatt J G, Yamaguchi K, Uchida N, Sato K, Nomura A, Shiratori O. *J Med Chem*, 1976, **19**: 654
- 7 Pejanović V, Piperski V, Uglješić-Kilibarda D, Tasić J, Dačević M, Medić-Mijačević L, Gunić E, Popsavin M, Popsavin V. *Eur J Med Chem*, 2006, **41**: 503
- 8 García J, Fernández S, Ferrero M, Sanghvi Y S, Gotor V. *Tetrahedron Lett*, 2004, **45**: 1709
- 9 Li N, Ma D, Zong M H. *J Biotechnol*, 2008, **133**: 103
- 10 Lavandera W, Fernandez S, Magdalena J, Ferrero M, Grewal H, Savile C K, Kazlauskas R J, Gotor V. *ChemBioChem*, 2006, **7**: 693
- 11 Wang Z Y, Li N, Zong M H. *J Mol Catal B*, 2009, **59**: 212
- 12 Wang Z Y, Zong M H. *Biotechnol Progr*, 2009, **25**: 784
- 13 Li N, Zong M H, Ma D. *J Biotechnol*, 2009, **140**: 250
- 14 Li N, Zong M H, Ma D. *Eur J Org Chem*, 2008, **2008**: 5375
- 15 Therisod M, Klibanov A M. *J Am Chem Soc*, 1986, **108**: 5638
- 16 Ozaki S, Yamashita K, Konishi T, Maekawa T, Eshima M, Uemura A, Ling L. *Nucleos Nucleot Nucl*, 1995, **14**: 401
- 17 Pleiss J, Fischer M, Schmid R D. *Chem Phys Lipids*, 1998, **93**: 67
- 18 程咏梅, 吴坚平, 徐刚, 杨立荣. 催化学报 (Cheng Y M, Wu J P, Xu G, Yang L R. *Chin J Catal*), 2010, **31**: 225
- 19 陈志刚, 宗敏华. 催化学报 (Chen Zh G, Zong M H. *Chin J Catal*), 2007, **28**: 339
- 20 Li X, Wu Q, Lv D S, Lin X F. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, **14**: 3377
- 21 Li N, Zong M H, Liu X M, Ma D. *J Mol Catal B*, 2007, **47**: 6
- 22 Tuomi W V, Kazlauskas R J. *J Org Chem*, 1999, **64**: 2638