УДК 615.355+54.057+66.097.3
https://doi.org/10.29296/25877313-2022-08-02
© С.В. Печинский, 2022

БИОКАТАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТ ОПТИМИЗАЦИИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ОБЗОР)

С.В. Печинский
к.фарм.н., доцент, кафедра фармацевтической химии,
Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск, Россия)
E-mail: hplc@yandex.ru
SPIN 9798-4663; ORCID ID 0000-0002-9505-9990

Актуальность. Конкурентоспособность и признание российских препаратов на фармацевтическом рынке возможны только в том случае, если отечественный продукт и его технология будут вписаны в парадигму развития передового мирового фармацевтического производства, приоритетными драйверами которого являются экологичность и экономическая эффективность. Внедрение принципов «зеленой химии» – яркое проявление современного тренда и запроса на будущее в области разработки и производства лекарственных средств. Наиболее интересным аспектом «зеленой химии» с теоретической точки зрения и перспективным в практическом плане является оптимизация процессов синтеза фармацевтических субстанций посредством внедрения энзимного синтеза.

Цель работы – показать результаты и перспективы применения биокатализа в синтезе лекарственных средств.

Материал и методы. Материалом являлись научные публикации и патенты, посвященные современным проблемам и путям их решения в области «зеленой химии», «биокатализа» и «синтеза фармацевтических субстанций». При написании обзора использовались следующие методы: сравнение, анализ, систематизация и обобщение.

Результаты. Дана краткая характеристика исторических «волн биокатализа», рассмотрены наиболее яркие примеры современного применения энзимного катализа в мировой практике фармацевтического синтеза, обобщены преимущества и перспективы использования биокатализа в синтезе лекарственных средств. Сделан вывод о том, что, несмотря на достаточный экспериментальный материал в смежных научных областях, в нашей стране практически не разрабатывается направление по использованию энзимного синтеза в области разработки и производства лекарственных средств.

Ключевые слова: *энзимный синтез, биокатализ, биокатализаторы, фармацевтическая субстанция, лекарственное средство, фармацевтический синтез.*

Для цитирования: Печинский С.В. Биокатализ как инструмент оптимизации фармацевтического синтеза лекарственных средств (обзор). Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(8):10–23. https://doi.org/10.29296/25877313-2022-08-02

Проблемы развития отечественной фармацевтической отрасли затрагивают практически весь жизненный цикл лекарственного препарата, что особенно резко ощущается после введения санкционных мер. Наиболее остро стоит вопрос максимально быстрого перевода оригинальных отечественных биологически активных соединений (БАС) в статус «лекарственного средства», что в первую очередь связано с качеством синтеза, масштабированием схемы синтеза и доказательностью механизма действия активной фармацевтической субстанции. Конкурентоспособность и признание российских препаратов на фармацевтическом рынке возможны только в том случае, если отечественный продукт и его технология будут вписаны в парадигму развития передового мирового фармацевтического производства, приоритетными драйверами которого являются экологичность и экономическая эффективность.

В этом контексте внедрение «зеленых технологий» – яркое проявление современного тренда и запроса на будущее в области разработки и производства лекарственных средств (ЛС). Среди сегментов «зеленой технологии» («green technology») концепция «зеленой химии» («green chemistry»), включающая 12 основных направлений, занимает ключевую позицию [1]. Наиболее интересной с теоретической точки зрения и перспективной в практическом плане, по нашему мнению, является оптимизация процессов катализа. Необходимо особо подчеркнуть, что если грамотно выстроить концепцию катализа при синтезе или модификации структуры вещества, то одновременно можно решать такие важные задачи, как снижение энергозатрат, отказ от токсичных растворителей, минимизация использования вспомогательных веществ в ходе синтеза, и, наконец, снижение себестоимости целевого продукта.

Одним из основных показателей актуальности развития «зеленых технологий» и, в частности, «зеленой химии» является мировая научная публикационная активность в этой области научных интересов. Проведенный анализ базы данных медицинских и биологических публикаций Национального центра биотехнологической информации США («Pubmed») [2] по тематике «green technology» за период с 2000 по 2021 гг. демонстрирует рост числа публикаций в 38 раз, что отражает общий интерес научного сообщества к данной проблеме (рис. 1).

Отдельно было изучено число опубликованных статей по проблеме «green chemistry» за этот же период (рис. 2). Анализ данных Национального центра биотехнологической информации США («Pubmed») [2] показал, что число публикаций, затрагивающих решение задач в области «зеленой химии», с 2000 до 2020 гг. увеличилось в 8,5 раз, а за последние два года находится примерно на одном уровне. Общее число публикаций по обеим темам за последние пять лет превышает 10000 статей в год, что подтверждает стабильный научный интерес к этому направлению исследований.

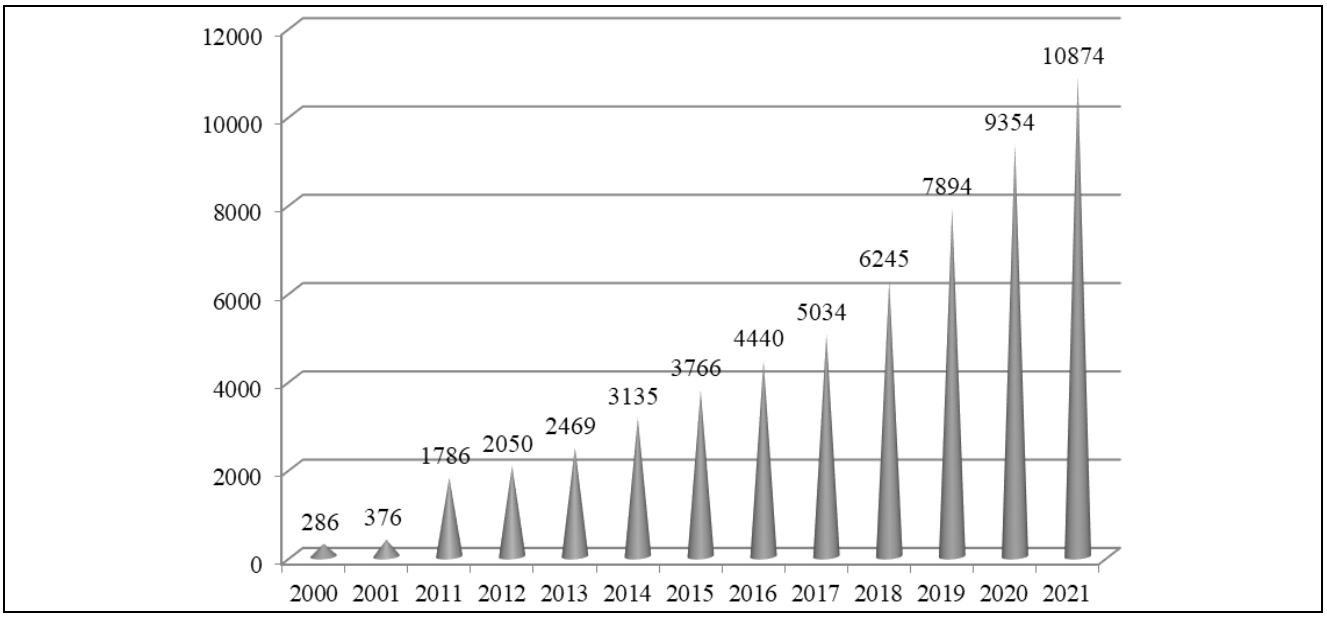

Рис. 1. Число ежегодных публикаций по тематике «green technology» по данным сайта https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov

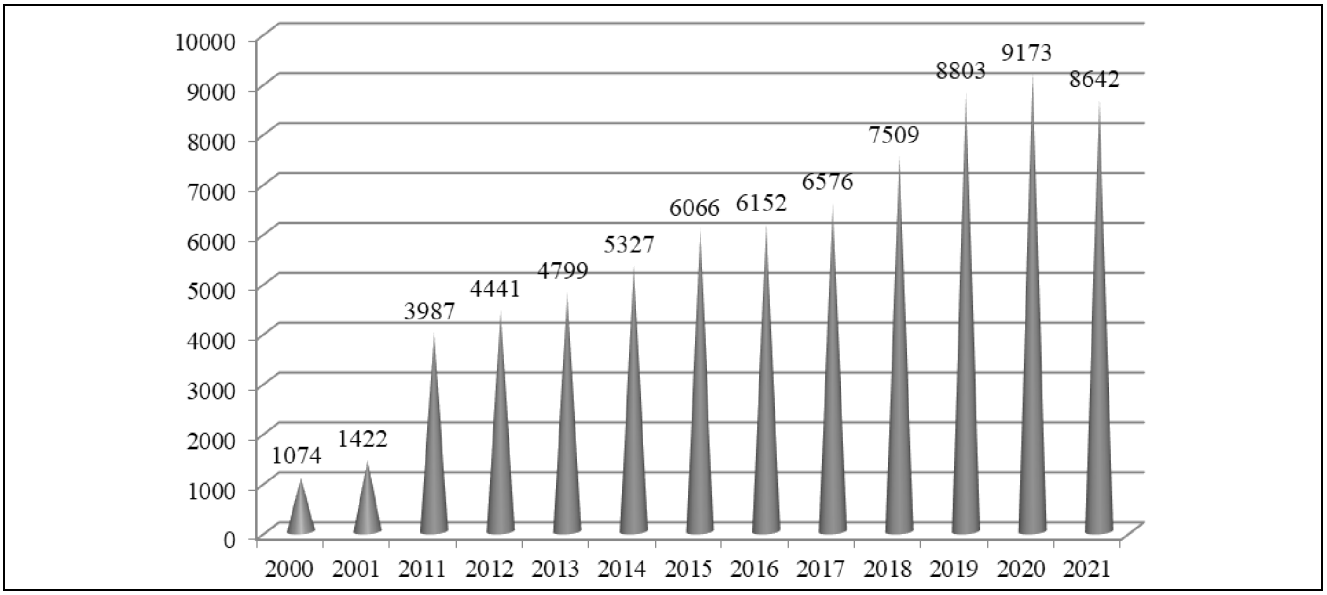

Рис. 2. Число ежегодных публикаций по тематике «green chemistry» по данным сайта https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov

Известно, что в процессе эволюции живых организмов было сформировано множество ферментов, влияющих на различные типы биохимических процессов. Так, если для осуществления всех биохимических процессов у одноклеточных организмов, например, *E. coli*, достаточно около 1000 различных ферментов, то для такого сложного организма, как человек необходимо более 75 000.

Биокатализ – общий термин, описывающий применение любого типа биокатализатора. Здесь имеются в виду либо ферменты природного происхождения, либо генетически модифицированные, изолированные или же в виде целых клеток, а также в виде рекомбинантных экспрессируемых белков внутри клеток. В литературе встречается несколько синонимичных определений этого процесса, например, энзимный синтез, энзимный катализ, хемоэнзимный синтез, ферментативный катализ [3].

Уникальные свойства ферментов все больше привлекают внимание исследователей с точки зрения их использования в различных отраслях, в том числе и фармацевтической. В последние годы наблюдается интенсивное внедрение энзимного катализа в различные сферы химического производства, в том числе и в синтез лекарственных средств. Основными драйверами этого процесса являются быстрое коммерческое продвижение и производство новых ферментов, развитие биоинформатики и компьютерное моделирование ферментативных реакций. Столь бурный прогресс связан в первую очередь с тем, что в последние несколько десятилетий молекулярная инженерия внесла огромный вклад в понимание ферментативного катализа. Были устранены такие недостатки ферментов, как низкая стабильность и высокая чувствительность к влиянию pH среды и температуры. Одним из важнейших факторов развития стала направленная модификация структуры ферментов методами генной инженерии, что позволило повысить их эффективность, стабильность и снизить стоимость [4, 5].

ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ ЭНЗИМНОГО СИНТЕЗА

Энзимный катализ имеет долгую историю и развивается рука об руку с человеческой цивилизацией. Так, получение спиртсодержащих напитков в Древнем Египте и сыра в Древней Греции являются древнейшими примерами использования ферментативного катализа, и таких исторических примеров множество. Однако только в XIX в. прикладной биокатализ начал приобретать научную основу. В 1833 г. Пайен и Персоз исследовали действие экстрактов прорастающего ячменя для гидролиза крахмала с образованием декстрина и сахара. При этом они получили активное вещество, которое было названо диастазой (смесь амилаз). В 1835 г. гидролиз крахмала диастазой был признан каталитической реакцией. Кроме этого, было продемонстрировано, что использование ферментов в этом гидролитическом процессе более экономично, чем использование серной кислоты. Уже в 1874 г. в Копенгагене К. Хансен основал первую компанию по продаже таких стандартизированных ферментных препаратов, как сычужный фермент для сыроварения [6]. Этот период в развития биокатализа принято относить к «первой волне биокатализа».

В конце XIX в., (1894) Э. Фишер сформулировал научные аспекты ферментативного катализа и положил начало «второй волне» его развития, которая характеризовалась быстро развивающейся научной составляющей. Исследуя действие разных ферментов с использованием нескольких гликозидов и олигосахаридов, Э. Фишер впервые научно описал специфичность ферментов. Именно им была предложена знаменитая концепция «замка и ключа», которую он считал причиной специфичности химического воздействия фермента на субстрат. Э. Фишер предположил, что геометрическая форма молекулы фермента относительно ее асимметрии соответствует натуральным гексозам [7]. Другой аспект теоретического описания ферментов касался их белковой природы. В 1894 г. Э. Фишер констатировал, что среди всех соединений, которые содержаться в живой клетке, белки являются наиболее важными. Так, в 1898 г. Крофт-Хилл осуществил первый ферментативный синтез – изомальтозы из глюкозы, а в 1900 г. Кастл и Левенхарт доказали, что гидролиз жиров и других сложных эфиров липазами является обратимой реакцией, а ферментативный синтез можно проводить в разбавленной смеси спирта и кислоты. Впоследствии в 1902 г. Э. Фишер с сотрудниками применил липазы в синтезе многочисленных гликозидов [8].

До середины XX в. коммерческое использование ферментов не имело экономически значимых объемов, а носило в основном единичный и научный характер. Начиная с 1960-х годах, производство ферментов характеризуется резким подъемом за счет совершенствования технологий, о

чем свидетельствует рост продаж бактериальных амилаз и протеаз. Действительно, годовой оборот подразделения ферментов «Novo Industri» (в настоящее время «Novozymes») – ведущего производителя ферментов, в то время не превышал 1 млн долларов до 1965 г. Однако с появлением протеаз использование ферментов резко выросло. Как следствие, к 1969 г. (всего за 4 года) оборот ферментов превышал 50 млн долларов США в год, в 2009 г. оборот «Novozymes» составлял примерно 1,4 млрд долларов США, а в 2020 г. – 2,2 млрд долларов США [9].

Следующая «волна» развития биокатализа характеризуется расширением использования ферментов в реакциях синтеза и значительной коммерциализацией этого процесса.

В фармацевтической промышленности биокатализ впервые был успешно применен в 1970-х годах при производстве полусинтетических антибиотиков – производных 6-аминопенициллановой кислоты. Для гидролиза пенициллина фармацевтическая компания «Eli Lilly» совместно с «Beecham Pharmaceuticals» разработала способ с использованием имобилизированного фермента амидазы, который требовал меньшего расхода реактивов и проводился при температуре 30 °C (рис. 3).

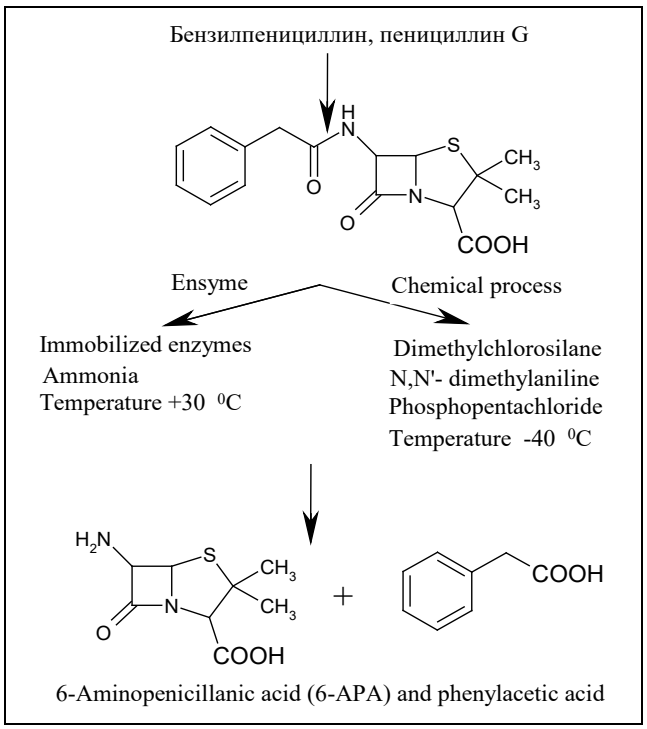

Рис. 3. Схема биокаталитического синтеза 6-аминопенициллановой кислоты [10]

Кроме схемы, демонстрирующей процесс производства 6-аминопенициллановой кислоты, – основного продукта при производстве полусинтетических пенициллинов, авторами был приведен технологический баланс этого процесса, который подтверждал, что в отличие от химического синтеза биокатализ не требует использования токсичных растворителей, таких как дихлорметан, бутанол, бутилацетат, а общий расход фермента составляет 1:1000.

Существенное сокращение затрат на производство полусинтетических пенициллинов привлекло внимание других фармацевтических компаний и были разработаны способы получения полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов с использованием биокатализа [10].

Укрепление позиций биокатализа в фармацевтической промышленности за последнее десятилетие является переходом от третьей «волны» биокатализа к четвертой [11]. Фактически этот период связан с развитием генетического манипулирования биокатализаторами путем направленной эволюции [12–14]. Метод позволяет проводить быстрое генерирование ферментных мутантов с использованием новых методов молекулярной биологии в сочетании с селективным скринингом, что было отмечено Нобелевской премией по химии в 2018 г.

Профессор Ф.Х. Арнольд из Калифорнийского технологического института Пасадена (США) разработала концепцию «направленной эволюции ферментов». Это знаковое исследование привело к развитию производства ферментов, катализирующих коммерчески полезные реакции, которые ранее были неизвестны, включая катализ в органических растворителях, а также позволило улучшить модернизацию ферментов с точки зрения специфичности и активности, сохраняя при этом или увеличивая их высокую селективность [15, 16]. В связи с этим в настоящее время скорость всего процесса необходимого для создания улучшенного биокатализатора возрастет, как минимум, на 200–1000% [17, 18].

Таким образом, накопленные научные разработки и технологические схемы производства становятся началом так называемой «четвертой волны биокатализа» [19, 20], которая будет полностью реализована в фармацевтической промышленности в ближайшее десятилетие.

БИОКАТАЛИЗ КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ КОНЦЕПЦИИ «ЗЕЛЕНОЙ ХИМИИ»

Одним из важнейших приоритетов в современном фармацевтическом производстве является концепция «зеленой химии». Эта концепция была впервые сформулирована в середине 1990-х годов П. Анастасом, чтобы решать экологические проблемы, связанные с химическими продуктами и процессами их производства [21]. П. Анастас и Дж. Уорнер сформулировали 12 принципов «зеленой химии» [1], которая не только позволяет улучшить экологичность процесса химического производства, но и повысить экономические показатели. Возможность сочетания экономических и экологических преимуществ, безусловно, является причиной того, почему «зеленая химия» привлекла такое огромное внимание за последние два десятилетия.

Для производства фармацевтических препаратов основной проблемой является постоянно возрастающая сложность молекул, которая требует многоэтапного и многостадийного синтеза. Так, например, с учетом «правила Липинского» молекулярная масса молекулы-кандидата должна быть не менее 450. Однако сложность фармацевтических молекул имеет тенденцию увеличиваться, так как разработчики все больше усложняют структуры веществ с целью увеличения их эффективности и безопасности. Анализ 128 молекул-кандидатов «в лекарства» от разных фармацевтических компаний показал, что в среднем для синтеза активных фармацевтических субстанций требуется восемь стадий. Большое число стадий синтеза также объясняет, почему Е-фактор (отношение килограмма отходов к килограмму целевого продукта) в фармацевтической отрасли намного выше (25–100), чем, например, в производстве удобрений, бытовой химии и косметики (< 1–5) [22].

Ведущие фармацевтические компании решают эту проблемы путем интеграции «зеленой химии» в фармацевтическую отрасль, развивая ее основные приоритетные направления: использование реагентов с высокой атомной экономичностью; замена растворителей на менее токсичные; выбор более эффективных реакций синтеза, в том числе с использованием биокатализаторов [23].

Знаковым примером использования «зеленой химии» для производства фармацевтических препаратов является производство цефалексина, в котором 13-стадийный химический процесс был заменен двумя стадиями с использованием биокатализа. Предложенный способ позволил в три раза улучшить показатель Е-фактора производства: для ферментативного процесса он составлял 5 кг отходов на 1 кг цефалексина, а в химическом синтезе – 15 кг отходов на 1 кг цефалексина. Другое преимущество – биокаталитический синтез цефалексина не требует использования метиленхлорида, что существенно снижает токсичность отходов [24].

Очевидно, что интерес к применению биокатализа в фармацевтической промышленности неслучаен, так как эта отрасль на сегодняшний день производит больше всего отходов [25–27]. Кроме того, поскольку биокатализ обычно проводится примерно при одинаковом температурном режиме, то появляется возможность проведения спаренных каскадов реакций, это обеспечивает дополнительные экономические и экологические перспективы для фармацевтического синтеза [28, 29].

Еще одним «зеленым» преимуществом биокатализаторов в производстве является использование стандартных многоцелевых реакторов периодического действия, не требующих установки дополнительных дорогостоящих специальных устройств, например, оборудования высокого давления [30], что позволяет сократить затраты при реализации непрерывных процессов [31, 32].

Безусловно, не все биокаталитические процессы оказывают столь впечатляющее влияние на процесс производства, но преимущества биокатализа очевидны. Технический прогресс в области биокатализа способствует росту ферментативных схем синтеза и тем самым продвижению и внедрению принципов «зеленой химии» в фармацевтическую отрасль.

Однако динамика развития в этой области остается проблемой для «зеленой химии» в целом и для ферментативного синтеза в частности. Высокая скорость истощения числа лекарственных препаратов-кандидатов, как правило, не оправдывает обширных работ по поиску новых схем синтеза и их разработке на ранней стадии создания лекарственных средств. Разработчики чаще всего уделяют основное внимание скорости вывода лекарственного препарата на рынок, а не поиску более эффективного и экономичного производства. Это часто приводит к неоптимальным и плохо изученным схемам синтеза с низким использованием зеленных принципов.

Долгое время реализации ферментативного синтеза при переводе кандидатов в лекарственные препараты препятствовало ограниченное количество легкодоступных биокатализаторов или отсут-

ствие положительного опыта их применения. Кроме того, против выбора биокаталитических схем синтеза долгое время активно выступали химики-технологи, для которых использование давно проверенных и часто используемых классических схем синтеза было предпочтительным, даже при существующих альтернативах. Однако за последнее десятилетие эта ситуация изменилась и этому способствовали прорывные разработки, например, в молекулярной биологии, биоинформатике и генной инженерии. Все это в совокупности привело к увеличению спектра легкодоступных коммерческих биокатализаторов [33, 34].

Крайне важным является то, что, применяя принципы «зеленой химии», можно объединить экологичность и высокую экономическую целесообразность фармацевтического синтеза, т.е. прогресс в биокатализе может обеспечить более «зеленое» будущее фармацевтического производства.

ХАРАКТЕРИСТИКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ КЛАССОВ ФЕРМЕНТОВ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Исторически сложилось, что наиболее популярными ферментами, используемыми для синтеза лекарственных средств, являются кеторедуктазы, липазы, трансаминазы, альдолазы и др.

Оксидоредуктазы – по оценкам специалистов составляют около 25% всех известных в настоящее время ферментов, а наиболее часто используемыми в биокатализе являются дегидрогеназы, к которым относятся и алкогольдегидрогеназы. Это ферменты, которые катализируют превращение широкого спектра кетонов и некоторых альдегидов в спирты с высокой степенью регио- и стереоселективности в присутствии НАДН или НАДФН. За последние 10 лет научные и технологические достижения сделали их промышленное применение по-настоящему эффективным, экологически чистым и способным конкурировать с традиционным катализом при производстве спиртов [35]. Чаще всего их используют для получения промежуточных продуктов, характеризующихся высокой энантиоселективностью. Пример такого энантиоселективного синтеза – получение 3-тиациклопентанона и 3-оксациклопентанона – промежуточных продуктов в синтезе Fosamprenavir и Sulopenem, представлен на рис. 4.

Авторы этого исследования изучали природу энантиоселективности родственных мутантных кеторедуктаз. Было проведено бикаталитическое восстановление почти симметричных 3-оксациклопентанона и 3-тиациклопентанона, что практически невозможно было осуществить другими способами [36].

Компания «Merck Sharp & Dohme Corp» использовала биокатализ для синтеза новых селективных агонистов β_3-адренергических рецепторов (рис. 5). Один из этих этапов синтеза включает восстановление аминокетонов до аминоспиртов в присутствии кеторедуктаз (KRED) и кофактора НАДФ. Использование энзима позволило получить стереоселективный изомер из диастереомеров с высоким выходом оптической чистоты [37].

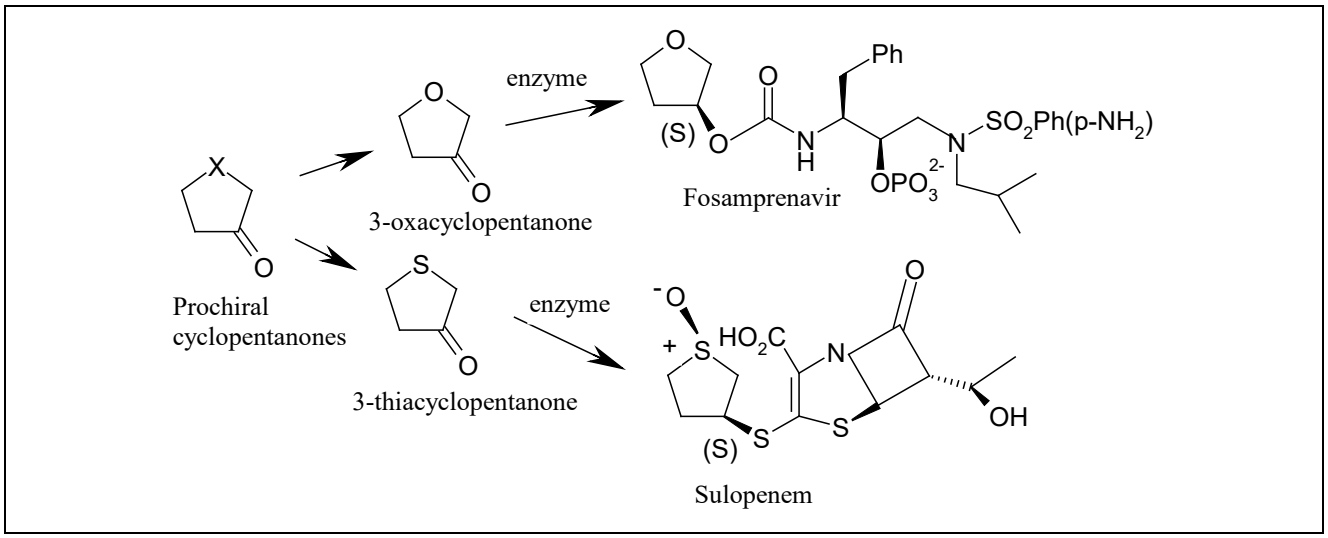

Рис. 4. Энантиоселективный синтез Fosamprenavir и Sulopenem [36]

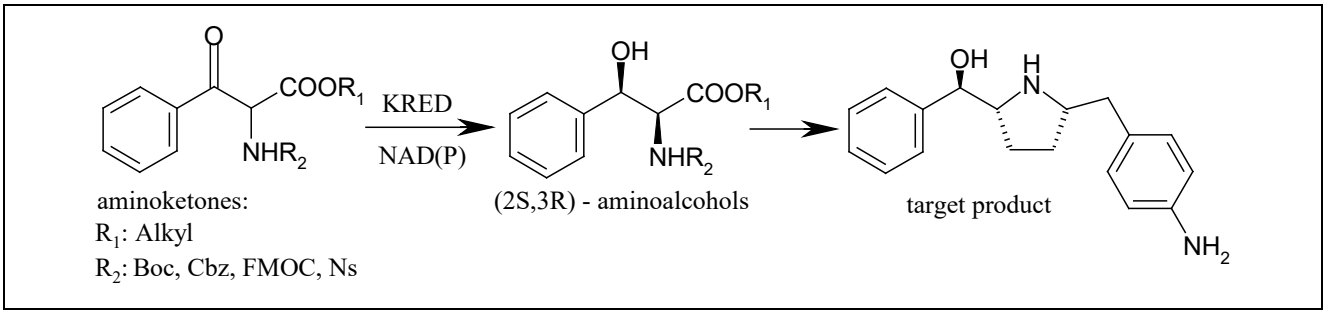

Рис. 5. Биокаталитический синтез селективных агонистов β3-адренергических рецепторов [37]

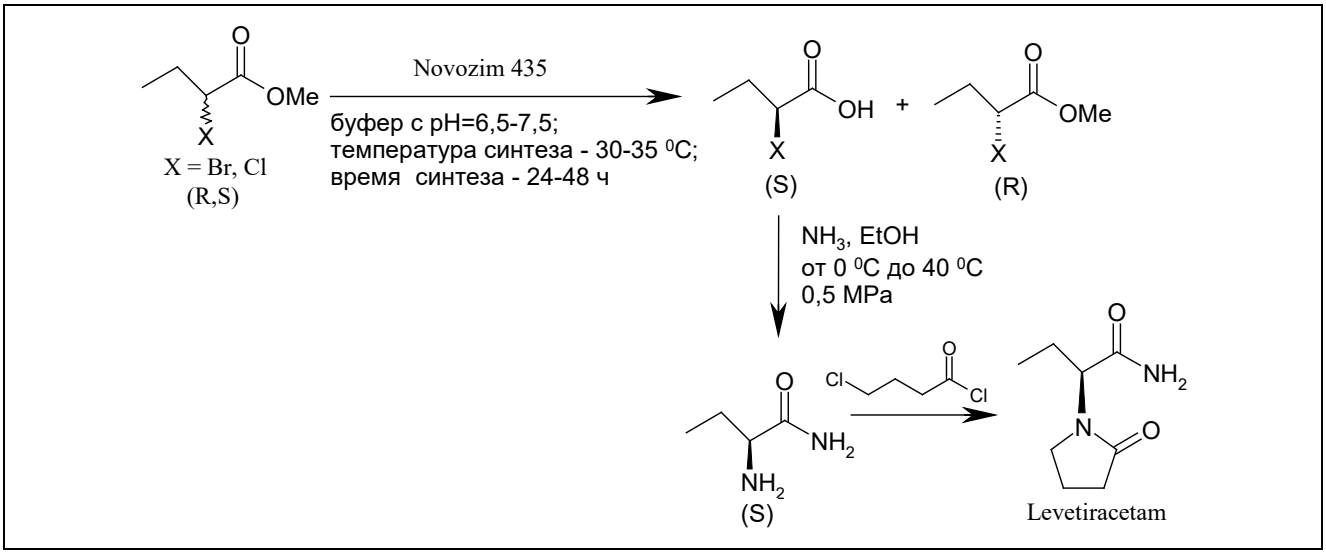

Рис. 6. Хемоэнзимный синтез Levetiracetam [38]

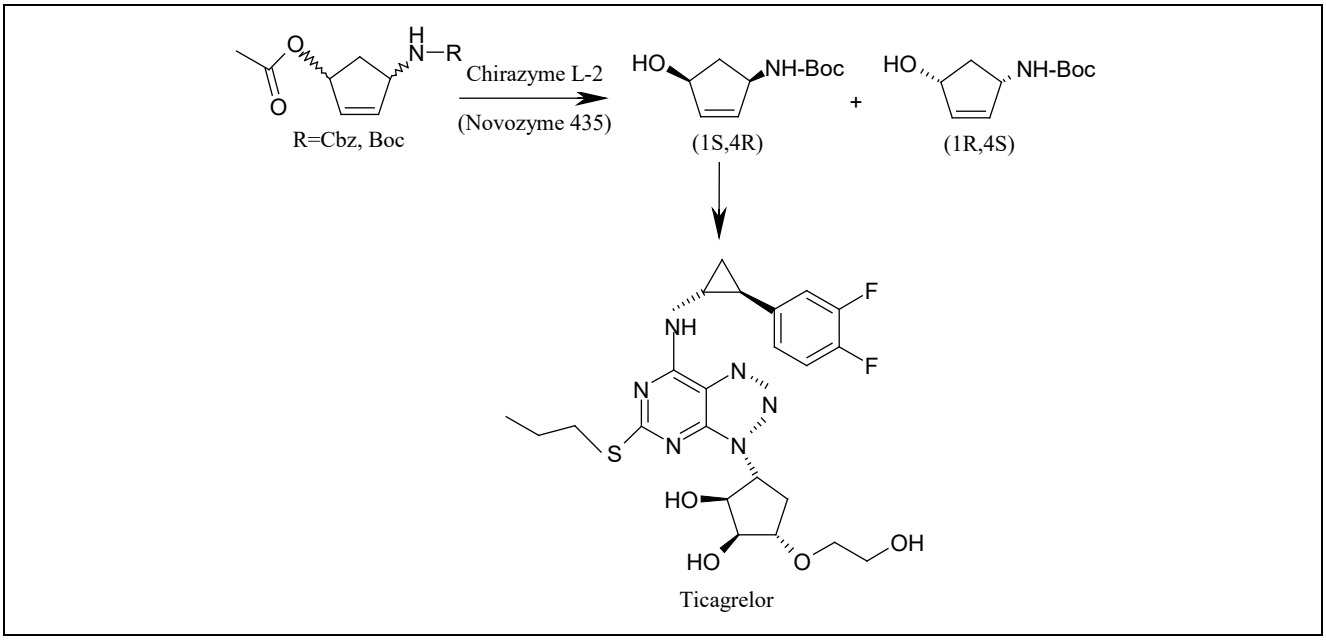

Рис. 7. Энзимный синтез Ticagrelor [39]

Липазы – один из наиболее часто используемых классов гидролаз в органическом синтезе. Они широко встречаются в природе (дрожжи, бактерии, грибы, растения, животные, человек), и значительное их количество производиться промышленным путем. Естественная функция липаз – гидролиз и повторная этерификация триглицеридов. Липазы, несомненно, являются наиболее ценным классом ферментов в прикладном биокатализе, так как обладают рядом уникальных свойств: широкая специфика субстрата, отсутствие необходимости использовать кофакторы, способность работать при высоких концентрациях субстрата и коммерческая доступность.

Примером использования липазы в стереоселективном синтезе фармацевтических лекарственных средств является патент компании «Zhejiang changming pharmaceutical CO Ltd», опубликованный в 2018 г. В нем описывается синтез противоэпилептического препарата Levetiracetam (Keppra, Elepsia), начиная с рацемического метил-2-бромобутаноата с применением коммерчески доступной иммобилизованной липазы B *Candida antarctica* – липазы Novozym 435 (рис. 6) [38].

Ключевым шагом данного патента является образование только S-изомера ((S), см. рис. 6), который извлекается с помощью этилацетата и используется в дальнейшем для синтеза Levetiracetam [38]. Использование липазы для получения Ticagrelor (Brilinta) было запатентовано Пекинским университетом химических технологий в 2017 г. (рис. 7) [39]. Предложенный способ синтеза является более экономичным и простым по сравнению с методом синтеза, предложенным компанией «AstraZeneca» – разработчиком оригинального препарата Ticagrelor.

Преимуществом энзимного синтеза Ticagrelor является получение только S-изомера промежуточного продукта (рис. 7), что не требует в дальнейшем дополнительной очистки конечного продукта. В качестве катализатора предложено использовать коммерческую липазу Chirazyme L-2, которая является аналогом Novozym 435 [39].

В 2018 г. «HC-Pharma AG» (Швейцария) запатентовала схему синтеза противовирусного препарата Sofosbuvir (Sovaldi), используемого в комбинированной терапии хронического гепатита C (рис. 8) [40].

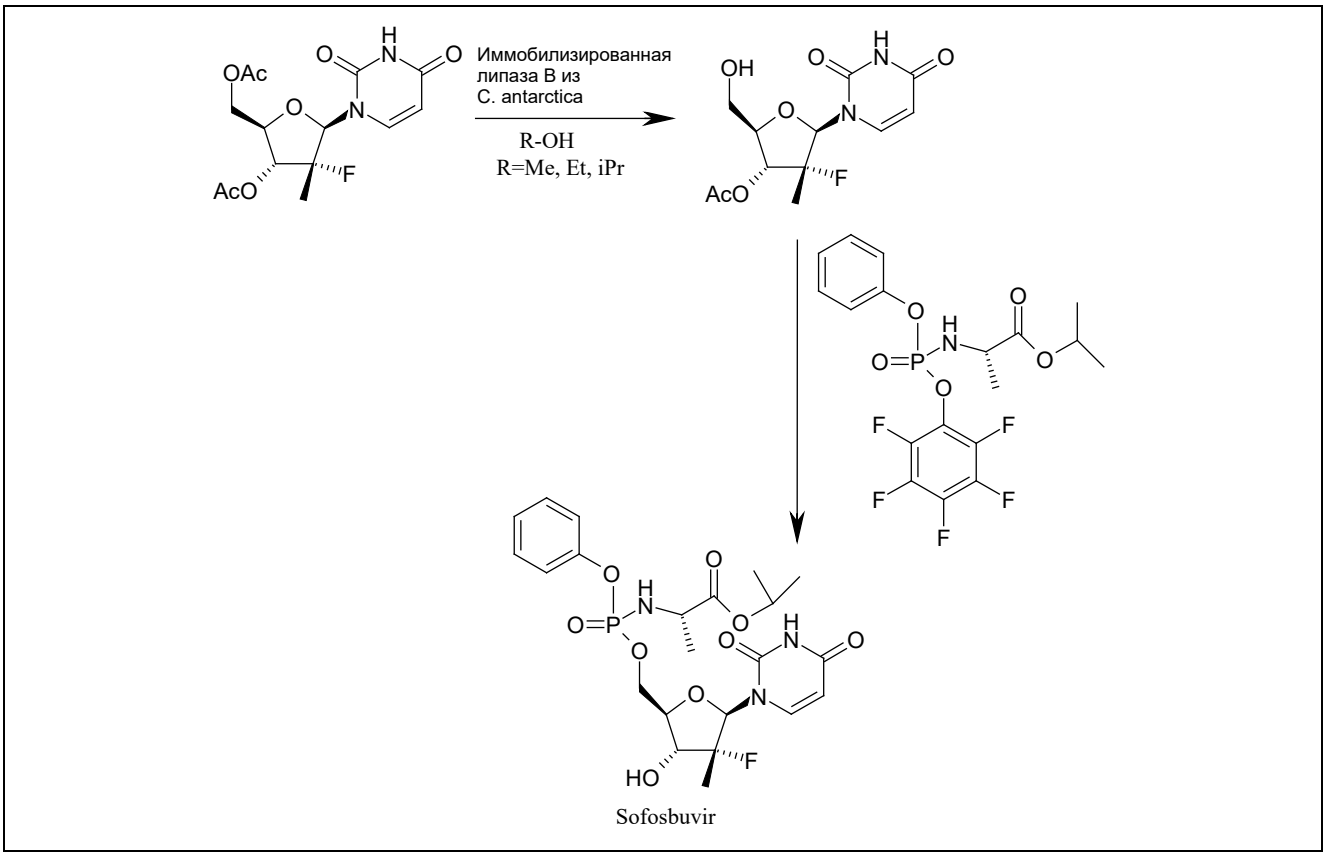

Рис. 8. Биокаталитический синтез Sofosbuvir [40]

По этой схеме монодеацетилирование промежуточного продукта проводится в присутствии липазы. Крайне важно, что данная схема используется в промышленном производстве [40].

Трансаминазы способны катализировать процесс обратимой передачи аминокислотной группы от подходящего донора к акцептору. В последние годы к ним приковано пристальное внимание, так как они обеспечивают синтез хиральных первичных аминов [41, 42]. Так, «Codexis» (США) предложили использовать трансаминазу для синтеза (1R,2R)-2-(3,4-dimethoxy phenethoxy)-cyclohexanamine ((R,R)-88, см. рис. 9).

Полученный амин ((R,R)-88, см. рис. 9) является промежуточным продуктом в синтезе Vernakalant – блокатора ионных каналов, применяемого для лечения мерцательной аритмии [41].

Компания «Pfizer Ireland Pharmaceuticals» запатентовала синтез прегабалина, используемого в терапии нейропатических болей, генерализованном тревожном расстройстве, эпилепсии и т.д. (рис. 10).

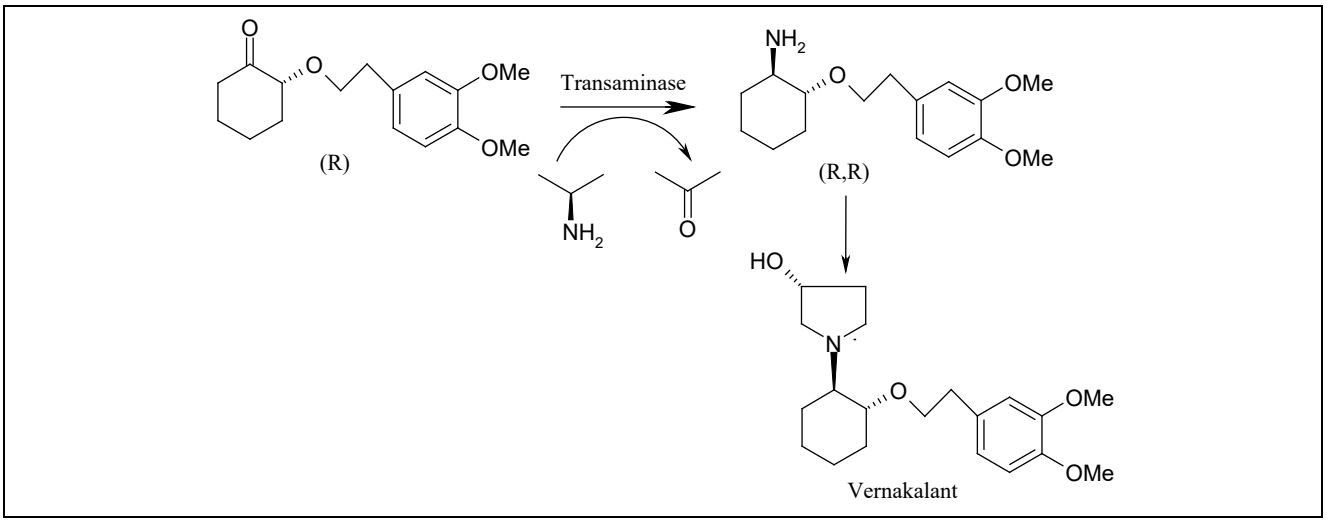

Рис. 9. Стереоселективный энзимный синтез Vernakalant [41]

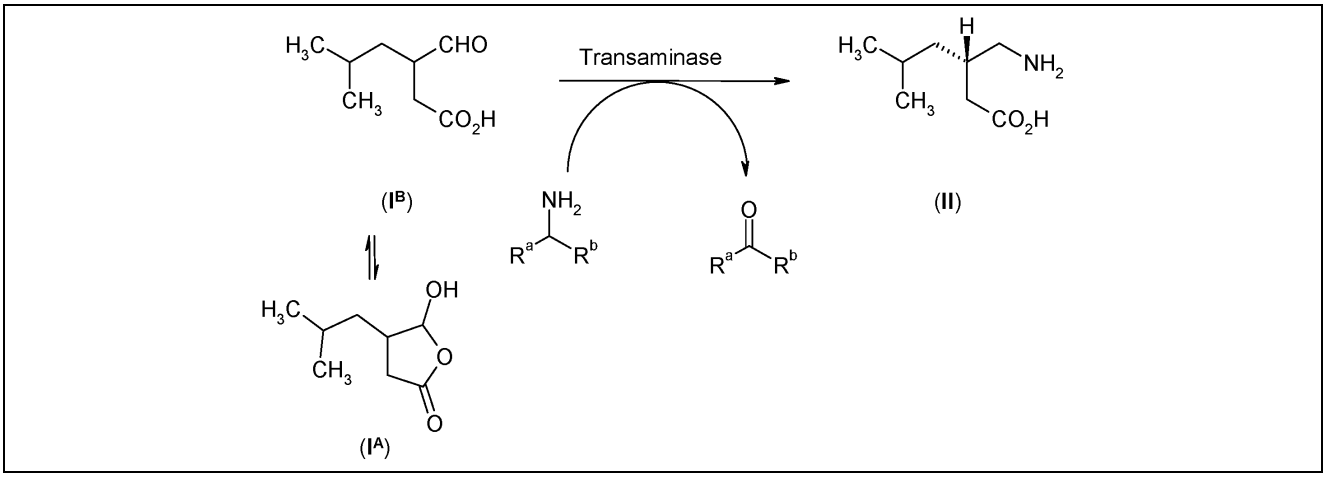

Рис. 10. Синтез прегабалина с участием трансаминаз [43]

В предлагаемой схеме используется стереоселективная трансаминаза, которая обеспечивает образование только S-энантиомера 5-гидрокси-4-(2-метилпропил)-3,4-дигидро-5/-/-2-фуранон (I^A, см. рис. 10), что позволяет сократить стадии очистки промежуточного продукта [43].

Лиазы – другая обширная группа биокатализаторов, которые катализируют образование ковалентных связей. В связи с успешными исследованиями в области направленного конструирования ферментов с заданными свойствами лиазы стали интенсивно использоваться в фармацевтическом

производстве и в области тонкого органического синтеза. Так, Юлихский исследовательский центр (Германия) запатентовал синтез алкалоида Cathine, схема которого представлена на рис. 11.

Синтез Cathine осуществлен и использованием (S)-селективных лиазы и трансаминазы, в результате которого целевым продуктом стал Cathine в форме S-изомера [44].

К классу лиаз относят альдолазы, катализирующие биологический эквивалент альдольной конденсации в химической реакции, что приводит к образованию углерод-углеродных связей путем обратимого стереоконтролируемого добавления нуклеофильного кетона к электрофильному акцептору альдегида. Способность альдолаз принимать множество «неестественных» акцепторных субстратов для создания новых стереоцентров делает их мощными инструментами для асимметричного синтеза.

На рис. 12 показана запатентованная компанией «Pfizer» схема синтеза статинов, в которой в качестве биокатализатора используется альдолаза [45].

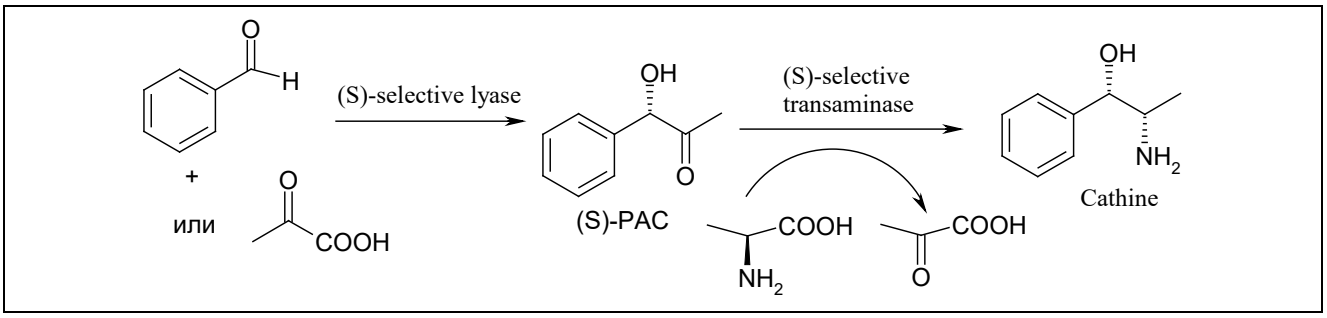

Рис. 11. Стереоселективный синтез Cathine [44]

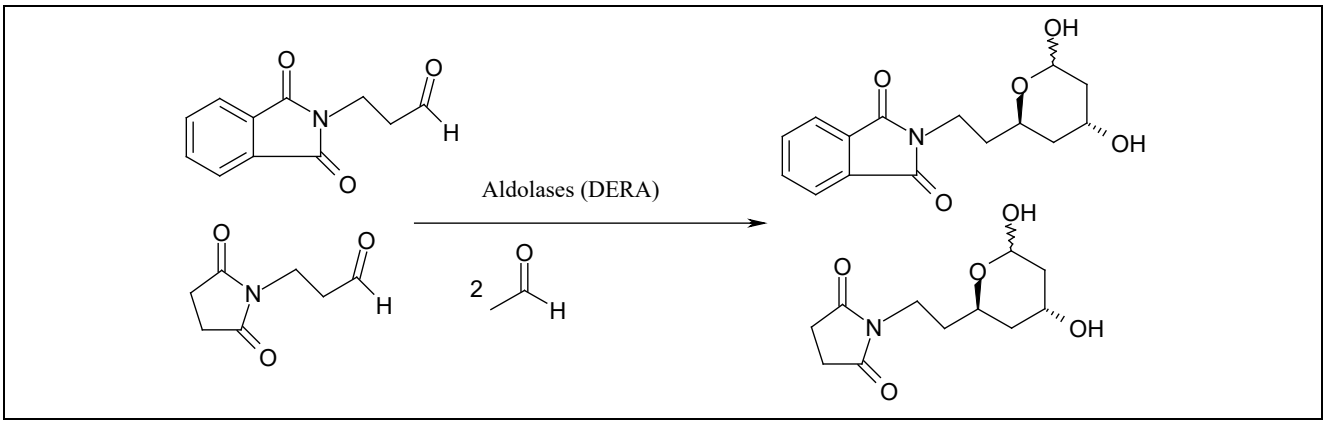

Рис. 12. Хемоэнзимный способ синтеза статинов [53]

На этапе взаимодействия альдегида с субстратом аминоальдегида или N-защищенным субстратом аминоальдегида альдолаза-катализированные условия позволяют проводить конденсацию с формированием соответствующих изомеров лактола.

Таким образом, в современном фармацевтическом синтезе используются практически все классы биокатализаторов, что в первую очередь обусловлено их стереоселективностью, экономической эффективностью, стабильностью, широким ассортиментом и коммерческой доступностью современных ферментов.

ПРЕИМУЩЕСТВА И НЕДОСТАТКИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОКАТАЛИЗА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ОТРАСЛИ

Существенным стимулом для развития энзимного синтеза явился прогресс в развитии современной генной инженерии. Развитие таких методов как ДНК-шаффлинг, сайт-направленный мутагенез, циркулярная пермутация, направленная эволюция и др. на сегодняшней день позволяет «конструировать» новые энзимы с заданными свойствами и расширять области их применения [15, 16]. Современный биокатализ имеет явные

преимущества и перспективы использования в фармацевтической отрасли, но, как и любое новое научно-практическое направление, сталкивается с определенными трудностями.

Высокая каталитическая активность в сравнении с традиционными катализаторами является неоспоримым преимуществом энзимного катализа [46]. Использование генной инженерии способствует созданию все более активных и менее дорогостоящих ферментов, а внедрение различных технологических приемов, например, иммобилизация на твердых носителях [47, 48], позволяет повысить их стабильность и активность. Все эти процессы обусловливают расширение внедрения биокатализа в фармацевтическое производство.

Немаловажным движущим фактором востребованности энзимов в фармацевтической отрасли является их более высокая экологичность в сравнении с классическими химическими катализаторами. Использование биокатализаторов уменьшает количество отходов, а в некоторых случаях позволяет уменьшить количество токсичных реактивов и растворителей, т.е. «озеленяет» производство лекарственных средств.

Еще одним преимуществом энзимного синтеза является энантиселиктивность и высокая энантиомерная чистота конечного продукта. Примерно 57% современных коммерческих лекарственных препаратов и около 99% всех природных биологически активных соединений являются хиральными молекулами [49, 50]. Для большинства лекарственных средств фармакологические свойства напрямую связаны с их пространственной структурой. Присутствие в фармацевтической субстанции нескольких стереоизомеров может быть не только причиной потери фармакологической активности, но проявления серьезных нежелательных реакций, т.е. хиральная конфигурация является критическим фактором для безопасности лекарственного средства. Широко известным примером такого проявления является талидомидовая трагедия [51].

Еще одним приоритетным аспектом развития хемоэнзимного синтеза можно признать экономическую составляющую этого процесса. Стереоселективность энзимов опосредованно обусловливает их экономическое преимущество: синтез соединения происходит в белковой структуре фермента, при этом пространственная структура продукта синтеза ограничивается активным центром белка-энзима, поэтому конечный продукт получают только в необходимой изомерной форме. Как следствие, синтезированные таким образом соединения не требуют дополнительной хроматографической или электрофоретической очистки, что удешевляет технологию производства [52, 53]. Долгое время биокатализ применялся в одноэтапных схемах, которые не давали существенных экономических преимуществ. Разработка и внедрение в процесс производства сначала многоэтапных, а затем и каскадных биокатализируемых технологических схем производства позволили свести к минимуму выделение промежуточных продуктов, что напрямую повлияло на сокращение отходов, а в конечном итоге и на сокращение производственных затрат [54, 55]. Кроме того, снижение стоимости биокатализа связано с прорывом в развитии производства ферментов, чему способствует повышение активности энзимов, расширение ассортимента коммерческих ферментов, используемых в фармацевтическом производстве, и их ценовая доступность. Суммарно это приводит к расширению объемов данного рыночного сегмента, например, в 2014 г. рынок ферментов имел объем около 4 млрд долларов, а в 2020 г. уже оценивался в более чем 10 млрд долларов. Такой бурный рост способствует увеличению инвестиций в научно-исследовательский и биотехнологический секторы производства, в том числе и фармацевтический.

Как отмечалось выше, энзимный синтез сталкивается и с определенными трудностями. Одной из основных проблем, стоящей перед более активным внедрением биокатализа в фармацевтическую отрасль, является скорость и затраты на создание ферментов с конкретными специализированными свойствами. Регио-, хемо- и энантиоселективность ферментов является как плюсом их использования, так и минусом, так как зачастую для каждой реакции, а особенно для фармацевтического синтеза, требуется разработка специфического фермента. Создание ферментов с заданными свойствами является сложной наукоемкой задачей, в решении которой могут помочь методы *in silico*. Создание последовательности ДНК, тестирование полученного фермента в предлагаемых условиях, корректировка его структуры – все эти этапы могут быть проведены на компьютерных моделях, позволяющих быстро и недорого решать поставленные задачи. Например, для проведения филогенетического анализа пептида с максимальной длиной до 40 000 аминокислот возможно использование программного комплекса InterProScan [56] или PfamScan [57]. Выбор фермента для опреде-

ленной реакции можно проводить, используя программу Selenzyme [58, 59]. Другим примером решения задачи по выбору фермента может быть веб-инструмент EC-BLAST – алгоритм количественного сходства поисков между ферментными реакциями на трех уровнях: изменение длины связей, поиск центра реакции и сходства структуры реакции. Этот веб-ресурс использует знания об изменениях связей и моделях реакции для всех известных биохимических реакций, полученных в результате картирования в каждой реакции. Данный подход имеет потенциал для поиска новых биохимических преобразований, с целью улучшения функции фермента, а также для ре-инженерии ферментов [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Энзимный синтез является одним из наиболее перспективных путей поиска и последующего производства фармацевтических препаратов. В связи с развитием технологии создания ферментов за два последних десятилетия появились возможности быстро и эффективно разрабатывать реакции синтеза лекарственных средств с использованием биокатализа. Он имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным хемокатализом и в ближайшие годы станет основным вектором развития всего органического синтеза.

Биокатализ произвел революцию в области создания лекарственных средств: снизилась стоимость производства, повысилась чистота целевого продукта, появилась возможность синтеза новых лекарственных средств, получение которых по классическим схемам ранее было затруднено или вовсе невозможно. Это прежде всего касается тех структур, активность которых обусловлена геометрией молекулы и зависит от нее. Стереоселективный энзимный синтез решает проблему получения целевого соединения преимущественно в форме одного из возможных наиболее активных изомеров, что позволяет в перспективе повысить эффективность, биодоступность, чистоту и безопасность получаемого препарата.

В последние годы стало очевидным, что создание лекарственных средств на основе природных соединений осложнено с экономической и экологической точек зрения, поскольку включает множество операций, связанных с выделением и очисткой индивидуального соединения из соответствующего сырья, использованием часто токсичных растворителей и экстрагентов. В этой связи модификацию структуры биологически активных соединений путем получения их полусинтетических производных с применением биокаталитических реакций можно признать актуальным направлением исследований.

Как показал анализ литературных данных и патентных документов, в нашей стране практически не разрабатывается направление по использованию энзимного синтеза в области создания и производства лекарственных средств. Следует отметить, что имеется достаточный экспериментальный материал в смежных научных областях, который может послужить основой для реализации работ по синтезу и направленной модификации лекарственных средств и биологически активных соединений с использованием энзимного синтеза. Важно, что в настоящее время существует доступный программный ресурс, который позволит успешно решать не только экспериментальные задачи, но и теоретические фрагменты таких исследований.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. *Anastas P.T., Warner J.C.* Green chemistry: theory and practice. New York: Oxford University Press, 1998.
2. *Truppo M.D.* Biocatalysis in the pharmaceutical industry: the need for speed. ACS Medicinal Chemistry Letters. 2017; 8(5): 476–480. doi: 10.1021/acsmedchemlett.7b00114.
3. База данных медицинских и биологических публикаций Национального центра биотехнологической информации (NCBI) США. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.
4. *Federsel H.J., Moody T.S., Taylor S.J.C.* Recent trends in enzyme immobilization-concepts for expanding the biocatalysis toolbox. Molecules. 2021; 26(9): 2822. doi: 10.3390/molecules26092822.
5. *Gkantzou E., Chatzikonstantinou A.V., Fotiadou R., Giannakopoulou A., Patila M., Stamatis H.* Trends in the development of innovative nanobiocatalysts and their application in biocatalytic transformations. Biotechnol. Adv. 2021; 51: 107738. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107738.
6. *Buchholz K., Poulson P.B.* Overview of history of applied biocatalysis, in: Applied biocatalysis edited by *Straathof A.J.J., Adlercreutz P.* Amsterdam: CRC Press, 2000.
7. *Stein R.L.* A Process Theory of enzyme catalytic power – the interplay of science and metaphysics. Found Chem. 2006; 8: 3–29. doi.org/10.1007/s10698-005-7907-8.
8. *Rastall R.A., Bucke Ch.* Enzymatic synthesis of oligosaccharides. Biotechnology and genetic engineering reviews. 1992; 10(1): 253–282. doi: 10.1080/02648725.1992.10647890 report2020.novozymes.com.
9. Biotech powerhouse «Novozymes»: https://www.novozymes.com/en.
10. *Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K.* Engineering the third wave of biocatalysis. Nature. 2012; 485: 185–194. doi.org/10.1038/nature11117.

11. *Tischer W.* Umweltschutz durch technische Biokatalysatoren, in Symposium Umweltschutz durch Biotechnik. Boehringer Mannheim GmbH, 1990.
12. *Currin A., Swainston N., Day P.J., Kell D.B.* Synthetic biology for the directed evolution of protein biocatalysts: navigating sequence space intelligently. Chem. Soc. Rev. 2015; 44: 1172–1236. doi.org/10.1039/C4CS00351A.
13. *Davis A., Plowright A., Valeur E.* Directing evolution: the next revolution in drug discovery? Nat Rev Drug Discov. 2017; 16: 681–698. doi.org/10.1038/nrd.2017.146.
14. *Bornscheuer U.T., Hauer B., Jaeger K.E., Schwaneberg U.* Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals. Angewandte Chemie. 2019; 58: 36–40. doi.org/10.1002/anie.201812717.
15. *Illane A.* Dr. Frances Arnold is awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2018: Good news for biocatalysis. Electronic Journal of Biotechnology. 2018; 36: A1. doi.org/10.1016/j.ejbt.2018.10.001.
16. *Jones C.W.* Another nobel prize for catalysis: Frances Arnold in 2018. ACS Catal. 2018; 8: 10913−10913. doi.org/10.1021/acscatal.8b04266.
17. *Sheldon R.A., Brady D.* The limits to biocatalysis: pushing the envelope. Chem. Commun. 2018; 54: 6088−6104. doi.org/10.1039/C8CC02463D.
18. *Woodley J.M.* Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. Appl Microbiol Biotechnol. 2019; 103: 4733–4739. doi.org/10.1007/s00253-019-09796-x.
19. *Poppe L., Vertessy B.G.* The Fourth Wave of Biocatalysis Emerges – The 13th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations. ChemBioChem. 2018; 19(4): 284–287. doi.org/10.1002/cbic.201700687.
20. *Bornscheuer Uwe T.* The fourth wave of biocatalysis is approaching. Phil. Trans. R. Soc. A. 2018; 376(2110): 1–7. doi.org/10.1098/rsta.2017.0063.
21. *Paul T. Anastas, Tracy C. Williamson* Green chemistry. ACS Symposium Series. 1996; 626: 1–17. doi: 10.1021/bk-1996-0626.ch001.
22. *Achille Antenucci, Stefano Dughera, Polyssena Renzi* Green chemistry meets asymmetric organocatalysis: a critical overview on catalysts synthesis. ChemSusChem. 2021; 14(14): 2785–2853. doi: 10.1002/cssc.202100573.
23. *Marian C. Bryan, Peter J. Dunn, David Entwistle, Fabrice Gallou, Stefan G. Koenig, et al.* Green chemistry meets asymmetric organocatalysis: a critical overview on catalysts synthesis. Green Chem. 2018; 20: 5082–5103. doi: 10.1039/C8GC01276H.
24. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). The Application of biotechnology to industrial sustainability. Paris: OECD Publishing, 2001. doi.org/10.1787/9789264195639-en.
25. *Faber K., Fessner W.-D., Turnerhttps N.J.* Biocatalysis: Ready to master increasing complexity. Adv. Synth. Catal. 2019; 361: 2373–2376. doi.org/10.1002/adsc.201900610.
26. *Roschangar F., Colberg J., Dunn P.J., Gallou F., Hayler J. D., et al.* A deeper shade of green: inspiring sustainable drug manufacturing. Green Chem. 2017; 19: 281–285. https://doi.org/10.1039/C6GC02901A.
27. *McElroy C. Robert, Constantinou Andri, Jones Leonie C., Summertona Louise, Clarkhttps James H.* Towards a holistic approach to metrics for the 21st century pharmaceutical industry. Green Chem. 2015; 17: 3111–3121. doi.org/10.1039/C5GC00340G.
28. *Uwe T. Bornscheuer* (Chemo-) enzymatic cascade reactions. Zeitschrift für Naturforschung. 2019; 74(3–4): 61–62. doi.org/10.1515/znc-2019-0016.
29. *Rudroff F.* Whole-cell based synthetic enzyme cascades – light and shadow of a promising technology. Current Opinion in Chemical Biology. 2019; 49: 84–90. doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.016.
30. *Ramesh Hemalata, Nordblad Mathias, Whittall John, Woodley John M.* Considerations for the application of process technologies in laboratory- and pilot-scale biocatalysis for chemical synthesis. Practical methods for biocatalysis and biotransformations 3. John Wiley & Sons, Ltd Print, 2016. doi.org/10.1002/9781118697856.ch01.
31. *Luke Rogers, Klavs F. Jensenhttps* Continuous manufacturing – the Green Chemistry promise? Green Chem., 2019; 21: 3481–3498.doi.org/10.1039/C9GC00773C.
32. *Britton J., Majumdar S., Weiss G.A.* Continuous flow biocatalysis. Chem. Soc. Rev. 2018; 47: 5891–5918. doi.org/10.1039/C7CS00906B.
33. *Lorenz P., Eck J.* Screening for Novel Industrial Biocatalysts. Eng. Life Sci. 2004; 4(6): 501–504. doi.org/10.1002/elsc.200402159.
34. *Robertson D.E., Steer B.A.* Recent progress in biocatalyst discovery and optimization. Curr Opin Chem Biol. 2004; 8(2): 141–149. doi: 10.1016/j.cbpa.2004.02.010.
35. *Robinson P. K.* Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays Biochem. 2015; 59(15): 1–41. doi: 10.1042/bse0590001.
36. *Noeya E. L., Tibrewalb N., Jiménez-Osésa G., Osunaa S., Parka J., et al.* Origins of stereoselectivity in evolved ketoreductases. PNAS. 2015; 112(51): E7065–E7072. doi.org/10.1073/pnas.1507910112
37. *de María P.D., de Gonzalo G., Alcántara A.R.* Biocatalysis as Useful Tool in Asymmetric Synthesis: An Assessment of Recently Granted Patents (2014–2019). Catalysts. 2019; 9 (802): 2–42. https://doi.org/10.3390/catal9100802.
38. ZHEJIANG CHANGMING PHARMACEUTICAL CO Ltd. Patent CN105063120B. Publ. Date 07.08.2018.
39. *Zheng G., Chen Q.* Patent CN104164469B. Publ. Date 26.11.2014.
40. *Mauro Gaboardi, Giuseppe Pallanza, Marco Baratella, Graziano Castaldi, Marta Castaldi*. Patent WO2017144423A1. Publ. Date 31.08.2017.
41. *Kossaify A.* Vernakalant in Atrial Fibrillation: A relatively new weapon in the armamentarium against an old enemy. Drug Target Insights. 2019; 13(1): 1–7. doi: 10.1177/1177392819861114.
42. *Limanto J., Ashley E.R., Yin J., Beutner G.L., Grau B.T., et al.* A highly efficient asymmetric synthesis of vernakalant. Org. Lett. 2014; 16(10): 2716–2719. doi.org/10.1021/ol501002a.
43. *Debarge S., Erdman D.T., O'neill P.M., Kumar R., Karmilowicz M.J.* Patent WO2014155291A1. Publ. Date 02.10.2014.
44. *Rother D., Poh M., Sehl T., Baraibar Á.G.* Patent WO2014198247A1. Publ. Date 18.12.2014.
45. *Bauer D.W., Hu S., O'neil P.M., Watson T.* Patent WO2009019561A2 Publ. Date 14.05.2009.
46. *Wang W., Taber D.F., Renata H.* Practical enzymatic production of carbocycles. Chemistry. 2021; 27(46): 11773–11794. doi: 10.1002/chem.202101232.
47. *Federsel H.J., Moody T.S., Taylor S.J.C.* Recent trends in enzyme immobilization-concepts for expanding the biocatalysis

toolbox. Molecules. 2021; 26(9): 2822. doi: 10.3390/molecules26092822.
48. *Ayala M., Segovia L., Torres E.* Halogenases: a biotechnological alternative for the synthesis of halogenated pharmaceuticals. Mini Rev Med Chem. 2016; 16(14): 1100–1111. doi: 10.2174/1389557516666160623100619.
49. *Li G., Wang J.B., Reetz M.T.* Biocatalysts for the pharmaceutical industry created by structure-guided directed evolution of stereoselective enzymes. Bioorg Med Chem. 2018; 26(7): 1241–1251. doi: 10.1016/j.bmc.2017.05.021.
50. *Jiang W., Fang B.* Synthesizing chiral drug intermediates by biocatalysis. Appl Biochem Biotechnol. 2020; 192(1): 146–179. doi: 10.1007/s12010-020-03272-3.
51. *Tian C., Xiu P., Meng Y., Zhao W., Wang Z., Zhou R.* Enantiomerization Mechanism of Thalidomide and the Role of Water and Hydroxide Ions. Chemistry A European Journal. 2012; 18(5): 14305–14313. doi.org/10.1002/chem.201202651.
52. *Bezborodov A.M., Zagustina N.A.* Enzymatic biocatalysis in chemical synthesis of pharmaceuticals (Review). Appl Biochem Microbiol. 2016; 52: 237–249. doi.org/10.1134/S0003683816030030.
53. *Hoyos P., Pace V., Hernaiz M.J., Alcantara A.R.* Biocatalysis in the pharmaceutical industry. A greener future. Current Green Chemistry. 2014; 1(2): 115–181 doi:10.2174/2213346-101666131113201722.
54. *Huffman M.A., Fryszkowska A., Alvizo O., Borra-Garske M., Campos K.R., et al.* Design of an in vitro biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. Science. 2019; 366(6470): 1255–1259. doi: 10.1126/science.aay8484.
55. *Del Arco J., Acosta J., Fernández-Lucas J.* New trends in the biocatalytic production of nucleosidic active pharmaceutical ingredients using 2'-deoxyribosyltransferases. Biotechnol Adv. 2021; 51: 107701. doi: 10.1016/j.biotechadv.2021.107701.
56. InterPro. Classification of protein families: https://www.ebi.ac.uk/interpro.
57. PfamScan. PfamScan is used to search a FASTA sequence against a library of Pfam HMM: https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/pfamscan.
58. Selenzyme: Enzyme Selection Tool: http://selenzyme.synbiochem.co.uk.
59. *Carbonell P., Wong J., Swainston N., Takano E., Turner N.J., et al.* Selenzyme: enzyme selection tool for pathway design. Bioinformatics. 2018; 34(12): 2153–2154. doi.org/10.1093/bioinformatics/bty065.
60. *Rahman S., Cuesta S, Furnham N, Holliday G.L., Thornton J.M.* EC-BLAST: a tool to automatically search and compare enzyme reactions. Nature Methods. 2014; 11: 171–174. doi.org/10.1038/nmeth.2803.

Поступила 3 марта 2022 г.

BIOCATALYSIS AS A TOOL FOR OPTIMIZING PHARMACEUTICAL SYNTHESIS OF DRUGS (REVIEW)

© S.V. Pechinskii, 2022

S.V. Pechinskii
Ph.D. (Pharm.), Associate Professor,
Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute — Branch of Volgograd State Medical University
E-mail: hplc@yandex.ru
SPIN 9798-4663; Researcher ID AAN-3254-2020; ORCID ID 0000-0002-9505-9990; Scopus AuthorID 55993869200

Relevance. Competitiveness and recognition of Russian drugs in the pharmaceutical market is possible only if the domestic product and its technology are inscribed in the paradigm of the development of advanced global pharmaceutical production, the priority drivers of which are environmental friendliness and economic efficiency. The introduction of "green technologies", and in particular the principles of "green chemistry", is a clear manifestation of the current trend and demand for the future in the development and production of medicines. The most interesting from a theoretical point of view and promising in practical terms is the optimization of the processes of synthesis of pharmaceutical substances through the introduction of enzyme synthesis.
The goal is to show the prospects for the use of biocatalysis in the synthesis of drugs.
Material and methods. The materials were scientific publications and patents devoted to modern problems and ways to solve them in the field of "green chemistry", "biocatalysis" and "synthesis of pharmaceutical substances". When writing the review, the following methods were used: systematization, comparison, analysis and generalization.
Results. The review gives a brief historical description of the "waves of biocatalysis", considers the most striking examples of the modern application of enzyme catalysis in the world practice of pharmaceutical synthesis, generalizes the general prospects for the use of biocatalysis in the synthesis of drugs. The article shows that chemoenzymatic synthesis is economical, increases the purity of the target product, especially its "stereopurity", allows the synthesis of new drugs, which were previously difficult or even impossible to obtain according to classical schemes. It is concluded that, despite sufficient experimental material in related scientific fields, in our country there is practically no development of the direction on the use of enzyme synthesis in the development and production of medicines.

Key words: *enzyme synthesis, biocatalysis, biocatalysts, pharmaceutical substance, drug, pharmaceutical synthesis.*

For citation: Pechinskii S.V. Biocatalysis as a tool for optimizing pharmaceutical synthesis of drugs (review). Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(8):10–23. https://doi.org/10.29296/25877313-2022-08-02