

类产碱假单胞菌全细胞催化前手性酮对映选择性还原合成西他列汀手性中间体

韦燕婵, 夏仕文*, 何从林, 熊文娟, 徐红梅, 何项宇

(重庆邮电大学 生物信息学院, 重庆 400065)

摘要: 以苯乙酮为唯一碳源, 从土壤中筛选出一株能够将 4-氧-4-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-1-(2,4,5-三氟苯基)丁-2-酮(**2**)对映选择性还原为抗 II 型糖尿病药物西他列汀关键手性中间体((S)-3-羟基-1-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-4-(2,4,5-三氟苯基)丁-1-酮((S)-**1**))的细菌菌株, 经鉴定并命名为类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) XW-40. 系统研究了水溶性辅溶剂、温度、pH、底物浓度、细胞浓度、反应时间等反应条件对生物还原产率和对映选择性的影响. 该菌株全细胞能够耐受浓度高达 10 g/L 的前手性酮 **2**. 在最优反应条件下, 以制备规模合成了(S)-**1**, 分离收率 90%, ee>99%.

关键词: 类产碱假单胞菌 XW-40; 羰基还原酶; 生物还原; 手性醇; 西他列汀

中图分类号: Q814.1, O643.3

文献标志码: A

西他列汀(Sitagliptin, 商品名 Januvia), 化学名为 7-[(3R)-3-氨基-1-氧代-4-(2,4,5-三氟苯基)丁基]-5,6,7,8-四氢-3-三氟甲基-1,2,4-三唑并[4,3-a]吡嗪, 是 Merck 公司研制的第一个用于治疗 2 型糖尿病的二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 抑制剂. 与易导致低血糖、体重增加和引起恶心呕吐等副作用的传统口服降糖药物相比, 西他列汀具有明显的优势和良好的市场前景^[1-3]. 西他列汀含一个手性中心, 只有(R)-对映体具有药理活性. 目前, 西他列汀的合成有两个途径: 1) 以(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酸为原料, 经氨基保护、与 3-三氟甲基-5,6,7,8-四氢-[1,2,4]三唑-[4,3-a]并吡嗪缩合、脱保护得到西他列汀. 该路线的关键是(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酸的合成. Zeng 等^[4]以 2,4,5-三氟苯甲醛和 N-乙酰甘氨酸为原料经缩合、还原、 α -糜蛋白酶拆分、水解、氨基保护、重氮化、Arndt-Eistert 重排反应、水解得(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酸, 其缺点是合成路线长, 收率低, 使用有毒的易爆炸的重氮甲烷. Tasnádi 等^[5]采用脂肪酶(Lipase PS IM)拆分(RS)-3-氨基-4-(2,4,5-

三氟苯基)丁酸乙酯得到(R)-3-氨基-4-(2,4,5-三氟苯基)丁酸, 收率 42%, ee 96%, 缺点是产物收率和手性纯度低, 无效对映体消旋化困难. 2) 以 4-氧-4-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-1-(2,4,5-三氟苯基)丁-2-酮(前手性酮 **2**)为原料, 采用化学(生物)不对称合成法合成西他列汀. 化学不对称合成法^[6-11]采用昂贵的手性催化剂与手性助剂(如手性铑催化剂、铂催化剂), 反应条件苛刻. Savile 等^[12]改造并利用来自节杆菌的重组转氨酶 ATA-117 催化前手性酮 **2** 转化为西他列汀, 底物使用浓度达到 100 g/L, 产物 ee 为 99%, 成为生物催化制备手性药物中间体的经典案例之一. 前手性酮 **2** 生物还原为(S)-**1**, 通过甲磺酰保护、叠氮取代手性反转、化学还原也可转化为西他列汀^[13].

我们以苯乙酮为唯一碳源, 从土壤中筛选出一株能够将前手性酮 **2** 对映选择性还原为(S)-3-羟基-1-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-4-(2,4,5-三氟苯基)丁-1-酮(手性醇(S)-**1**)的微生物菌株, 经 16S rDNA 鉴定

收稿日期: 2015-11-11; **修回日期:** 2015-11-28.

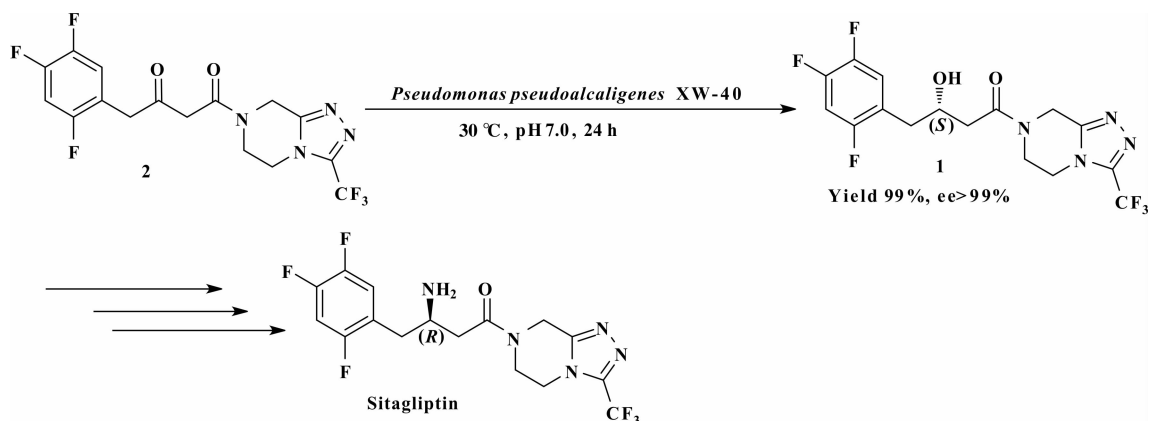
基金项目: 重庆市应用开发计划项目(CSTC2013yykfa10017)(Application Development Program Chongqing Municipality (CSTC2013yykfa10017)).

作者简介: 韦燕婵(1990-), 女, 硕士生. 研究方向: 生物催化与生物转化、手性合成, E-mail: 1187635118@qq.com (Yanchan Wei; (1990-), female, M.S. Research Fields: Biocatalysis and biotransformation, chiral synthesis).

* 通讯联系人, E-mail: xiasw@cqupt.edu.cn.

并命名为类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) XW-40. 在优化反应条件的基础上, 实现

了手性醇(*S*)-**1** 的高收率和高对映选择性制备规模合成(Scheme 1).



图示1 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40 全细胞催化 **2** 合成(*S*)-**1**

Scheme 1 Bioreduction of 4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-one (**2**) to (*S*)-3-hydroxy-1-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-1-one ((*S*)-**1**)

1 实验部分

1.1 实验材料

苯乙酮购自上海邦成化工有限公司, 4-氧-4-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-1-(2,4,5-三氟苯基)丁-2-酮(**2**)购自南京奇可医药化工有限公司. 消旋 3-羟基-1-[3-(三氟甲基)-5,6-二氢[1,2,4]三唑并[4,3-a]吡嗪-7(8H)-基]-4-(2,4,5-三氟苯基)丁-1-酮以 **2** 为原料按文献[14]采用硼氢化钠还原合成, 乙酸乙酯: 石油醚=1:1(v/v)重结晶. 其余试剂为市售分析纯或化学纯.

1.2 实验方法

1.2.1 微生物菌株分离、培养和筛选 菌株分离. 称取约 1 g 土壤样品于 10 mL 无菌水中, 振荡混匀后离心, 吸取上清液 1 mL 加入到 100 mL 富集培养基中, 30 °C 培养 5~7 d. 将浑浊的富集培养液稀释涂布于分离平板上, 30 °C 下培养 48 h. 观察分离平板的菌落形态, 挑选生长较快的单菌落. 划线纯化后斜面培养基培养, 编号保存于 4 °C 下, 作为进一步筛选的菌株.

(1) 富集培养基: 苯乙酮 0.12 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L, KH_2PO_4 1.5 g/L, pH

7.0.

(2) 平板培养基: 富集培养基, 琼脂 15 g/L.

(3) 斜面培养基: 蛋白胨 0.5 g/L, 牛肉浸膏 0.15 g/L, 酵母膏 0.15 g/L, NaCl 0.5 g/L, 葡萄糖 1.0 g/L, 琼脂 15 g/L.

菌株培养. 取斜面保存菌种接种于 5 mL 种子培养基中, 30 °C、180 r/min 下于恒温摇床振荡预培养 48 h. 预培养液作为种子接种于 100 mL 摇瓶发酵培养基中, 30 °C、180 r/min 下于恒温摇床振荡培养 48 h. 离心收获细胞(7 000 r/min, 10 min), 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)洗涤 2 次, 重新悬浮于磷酸盐缓冲液中, 4 °C 下保存备用.

种子培养基、摇瓶发酵培养基不加琼脂, 其余同斜面培养基.

菌株筛选. 5 mL 反应液含 1 g/L **2**, 5% 葡萄糖, 10% (v/v) 乙醇, 50 g(干重)/L 菌体, 30 °C、180 r/min 下振荡反应 24 h, 离心去除细胞. 反应液用乙酸乙酯萃取, HPLC 测定转化率和产物 ee 值.

1.2.2 菌株 40-1 鉴定 酚-氯仿-异戊醇法提取菌体的基因组 DNA, 采用引物 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (16HF) 和 5'-GGTACCTTGT-TACGACTT-3' (16HR) 进行 PCR 扩增. 扩增产物送北京英茂盛业生物科技有限公司采用 16 S rDNA 测定基因序列, 并与 GenBank 中已知微生物的 16 S rDNA 序列进行核苷酸同源性分析.

1.2.3 生物还原反应条件优化 5 mL 反应液中含 0.1 mol/L 缓冲液, 10% (v/v) 水溶性辅溶剂, 5% (w/v) 葡萄糖, 确定浓度的前手性酮 **2** 和类产碱假单胞菌 XW-40 细胞, 在一定温度下振荡反应 12 h. 反应液离心, 收集上清液, 用乙酸乙酯萃取, HPLC 测定转化率和产物 ee 值.

1.2.4 制备规模 生物还原反应 200 mL 反应液中含 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 5% (w/v) 葡萄糖, 10 g/L 前手性酮 **2** 和 80 g (干重)/L 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞, 30 ℃、180 r/min 下振荡反应 24 h, 离心去除细胞. 上清液用乙酸乙酯萃取 (3×100 mL), 合并萃取液, 无水硫酸钠干燥, 减压浓缩至 20 mL 左右, 硅胶柱色谱分离, 乙酸乙酯: 石油醚=1:1 (v/v) 洗脱, 洗脱液减压浓缩至干.

1.2.5 分析方法 产率采用反相 HPLC 法在 Ali-gent-1000 高效液相色谱仪上测定. 色谱柱: C₁₈ 柱 (250×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 水/乙腈=70/30 (v/v), 流速: 1 mL/min, 检测波长: 268 nm, 温度: 25 ℃. **1** 和 **2** 的保留时间分别为 19.7 min 和 26.8 min. 产物 ee 值采用手性 HPLC 测定. 色谱柱: Chiracel AY-H (5×250 mm, 5 μm), 流动相: 正己烷/无水乙醇/三乙胺=85/15/0.1 (v/v/v), 流速: 1.0 mL/min, 检测波长: 268 nm, 温度: 25 ℃. (*S*)-**1** 和 (*R*)-**1** 的保留时间分别为 11.3 min 和 17.8 min. **1** 的对映体过量 (ee) = (A_S-A_R)/(A_S+A_R)×100%, 其中 A_S、A_R 分别为 (*S*)-**1** 和 (*R*)-**1** 的峰面积.

2 结果与讨论

2.1 2 生物还原为 1 的微生物菌株筛选

Ni 等^[15] 和 Soni 等^[16] 分别以苯乙酮为唯一碳源从土壤中筛选适合还原芳基酮和 N,N-二甲基-3-酮-3-(2-噁吩)-1-丙胺为相应手性醇的微生物菌株. 基于苯乙酮与前手性酮 **2** 结构的相似性, 我们采用类似的策略从 125 份土壤中分离出能够以苯乙酮为唯一碳源生长的 89 个菌株. 其中 24 个菌株能够将前手性酮 **2** 还原为手性醇 **1**. 表 1 列出了转化率大于 5% 的 16 个菌株, 其中编号为 40-1 的菌株表现出最高的羰基还原酶活性和对映选择性, 催化前手性酮 **2** 还原为手性醇 (*S*)-**1** 的转化率为 75%, ee>99%. 该菌株经 16S rDNA 鉴定, 与 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 的同源性为 100%, 命名为类产碱

假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) XW-40, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC No.: M2015521.

表 1 2 生物还原为 1 的微生物菌株筛选
Table 1 Screening of microbial strains for the

bioreduction of 2 to 1			
Microbial strain	Conversion / (%)	ee / (%)	Configuration
40-1	75	>99	<i>S</i>
40-2	69	>99	<i>S</i>
60-1	68	>99	<i>S</i>
28-1	62	98	<i>S</i>
50-1	10	>99	<i>S</i>
38-1	9	>99	<i>S</i>
55-1	14	95	<i>S</i>
11-3	8	96	<i>S</i>
42-1	7	61	<i>S</i>
10-1	23	6	<i>S</i>
10-2	20	89	<i>R</i>
39-1	45	>99	<i>S</i>
57-1	11	49	<i>R</i>
57-2	8	98	<i>S</i>
60-3	9	>99	<i>S</i>
60-2	13	78	<i>S</i>

Screening conditions: Reaction mixture (5 mL) contained phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 7.0), 10% (v/v) EtOH, 5% (w/v) glucose, 1 g/L **2**, and 50 g dry weight cells /L. 30 ℃, 180 r/min, 24 h

2.2 生物还原反应条件优化

2.2.1 水溶性辅溶剂选择 前手性酮 **2** 在磷酸盐缓冲液中的溶解度极低. 为保证生物还原反应顺利进行, 反应体系中加入水溶性辅溶剂是必要的. 研究了 6 种水溶性辅溶剂对类产碱假单胞菌 XW-40 全细胞催化前手性酮 **2** 还原为手性醇 (*S*)-**1** 的转化率和 对映选择性的影响 (表 2). 结果表明, 无论加入何种水溶性辅溶剂, 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞都表现出极高的对映选择性. 与其他水溶性辅溶剂相比, 10% (v/v) 二甲亚砜 (DMSO) 存在下, 前手性酮 **2** 的转化率最高. 进一步的研究表明, 转化率随 DMSO 浓度增大而减小, 50% (v/v) 导致反应几

表 2 水溶性辅溶剂对类产碱假单胞菌 XW-40
还原 2 的转化率和 对映选择性的影响

Table 2 Effect of water-soluble cosolvents on conversion and enantioselectivity of 2 bioreduction by *P. pseudoalcaligenes* XW-40

Co-solvent (10% v/v)	Conversion /(%)	ee (%) Configuration
None	1	>99 (S)
Ethanol	57	>99 (S)
Acetonitrile	25	>99 (S)
DMSO	92	>99 (S)
Methanol	87	>99 (S)
THF	0	-
Dimethylformamide	45	99 (S)

Reaction mixture (5 mL) contained phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 7.0), 10% (v/v) Co-solvent, 5% (w/v) glucose, 1 g /L 2 and 50 g dry weight cells /L. 30 ℃, 180 r/min, 12 h

乎完全不能进行(图 1). 以下研究选择 10% (v/v) DMSO 为辅溶剂.

2.2.2 温度和 pH 选择柠檬酸-氢氧化钠 (pH 5.0, 0.1 mol/L)、磷酸二氢钾-磷酸氢二钾 (pH 6.0 ~

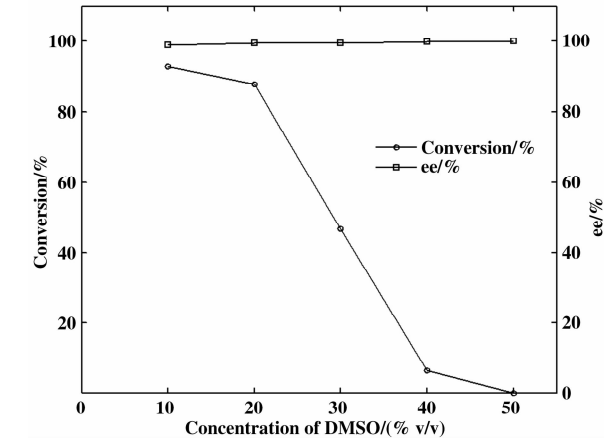
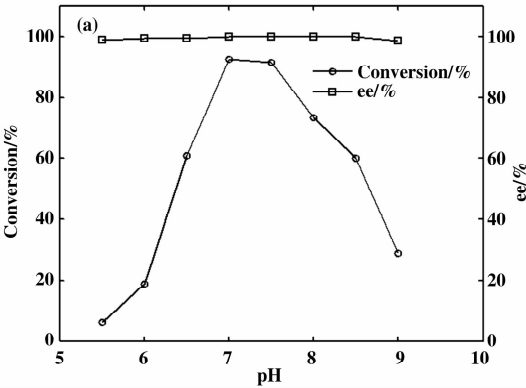


图 1 DMSO 浓度对转化率和 对映选择性的影响
Fig. 1 Effect of DMSO concentration on the conversion and enantioselectivity

7.0, 0.1 mol/L)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (pH 8.0 ~ 9.0, 0.1 mol/L) 3 个缓冲体系, 考察 pH 对转化率和 对映选择性的影响(图 2a). pH<6 时, 转化率很低, 此后转化率随 pH 增大而增大. pH 为 7.0 时具有最大转化率, 此后随 pH 增大而降低. pH 的变化 对 对映选择性没有明显影响. 温度小于 30 ℃, 转化率随温度升高而增大. 高于 30 ℃, 因胞内羰基 还原酶热失活, 转化率随温度升高而降低(图 2b). 温度的变化对酶的 对映选择性也没有明显影响.

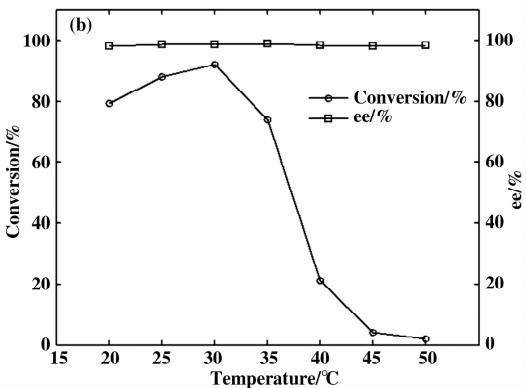


图 2 pH(a) 和温度(b) 对转化率和 对映选择性的影响

Fig. 2 Effect of pH (a) and Temperature (b) on the conversion and enantioselectivity.

Reaction mixture (5 mL) contained buffer (0.1 mol/L), 10% (v/v) DMSO, 5% (w/v) glucose, 1 g /L 2 and 50 g dry weight cells /L. 180 r/min, 12 h.

(a): pH 5.0 ~ 9.0, 30 ℃; (b): pH 7.0, 20 ~ 50 ℃

2.2.3 底物浓度和细胞浓度 分别考察了底物浓度和细胞浓度对转化率和 对映选择性的影响. 当底物浓度小于 6 g/L 时, 转化率没有明显的下降, 可

见在此底物浓度下, 几乎不存在底物抑制. 当底物浓度大于 6 g/L 时, 转化率随底物浓度增大逐渐下降, 可见高浓度的底物对羰基还原酶有一定的抑

制,但是抑制作用不是很明显.当底物浓度为 10 g/L,转化率仍达到 80% (图 3a).该结果表明类产碱假单胞菌 XW-40 细胞对底物有较高的耐受性.当细胞浓度小于 80 g(干重)/L 反应液时,转化率随

细胞浓度增大而增大.因为质量扩散阻力,更高的细胞浓度不能显著改善转化率(图 3b).为了生物还原反应能够经济有效的进行,选择底物浓度和细胞浓度分别为 10 g/L 和为 80 g(干重)/L 反应液.

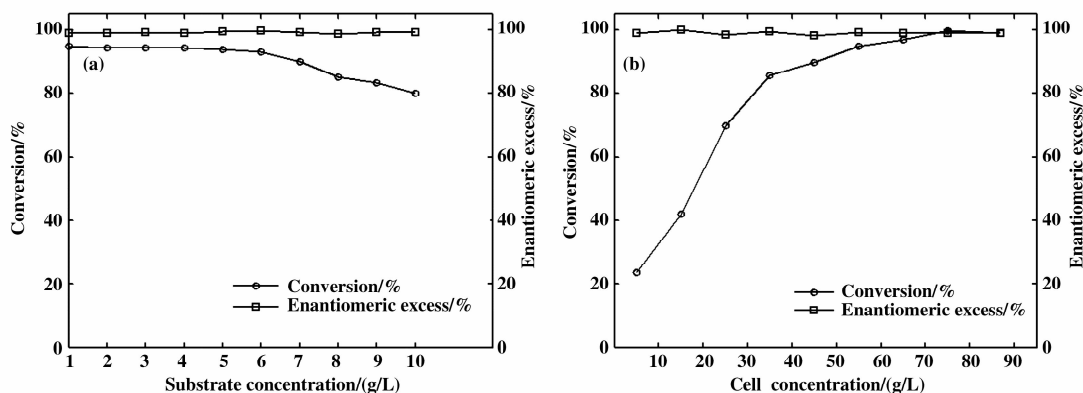


图 3 底物浓度(a)和细胞浓度(b)对反应的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration (a) and cell concentration (b) on the conversion and enantioselectivity

Reaction mixture (5 mL) contained phosphate buffer (0.1 mol/L, pH 7.0), 10% (v/v) DMSO and 5% (w/v) glucose.

30 °C, 180 r/min, 12 h.

(a): 1 ~ 10 g/L **2**, 50 g dry weight cells /L; (b): 1 g/L **2**, 5 ~ 85 g dry weight cells /L.

2.2.4 时间对反应的影响 在最优反应条件下,对类产碱假单胞菌 XW-40 细胞催化还原 **2** 合成 (S)-**1** 的反应历程进行了研究.由图 4 可知,以 80 g(干重)/L 细胞作为生物催化剂,可在 24 h 内将 10 g/L 的前手性酮 **2** 生物还原为手性醇 (S)-**1**,产率>99%, ee >99%.

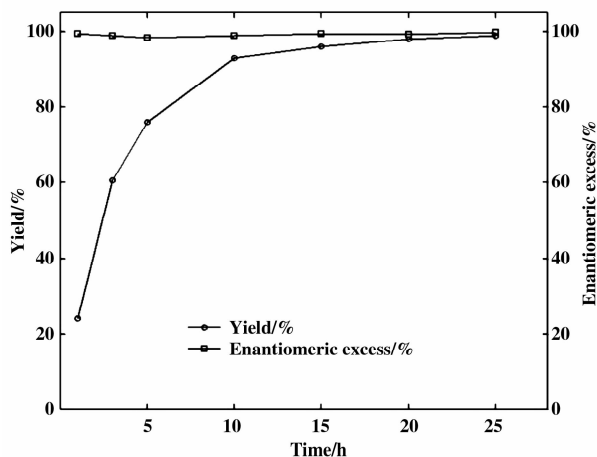


图 4 类产碱假单胞菌 XW-40 细胞催化还原 **2** 合成 **1** 的时间历程
Fig. 4 Time-course of (S)-**1** from **2** by *P. pseudoalcaligenes* XW-40.

The bioreduction was carried out under the following reaction conditions: 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 7.0), 10% (v/v) DMSO, 5% (w/v) glucose, 10 g/L **2** and 80 g dry weight cells/L. 30 °C, 180 r/min, 24 h

2.3 制备规模生物还原反应

为了制备 (S)-**1**, 在 200 mL 反应液中加入 2 g 前手性酮 **2** 和 16 g(干重)类产碱假单胞菌 XW-40 细胞, 30 °C 下反应 24 h, 反相 HPLC 检查底物反应完全. 经萃取、柱色谱分离得 1.8 g 手性醇 (S)-**1** 白色固体, 分离收率 90%, ee>99%. $[\alpha]_D^{25} = 23.3$ (C = 1, CHCl₃). ¹H NMR (400MHz, DMSO-D₆): δ2.46-2.48 (m, 1H), 2.67-2.79 (m, 3H), 3.90-3.97 (m, 2H), 4.00-4.09 (m, 2H), 4.21-4.26 (m, 1H), 4.84-5.06 (overlapping m, 3H), 7.40-7.48 (m, 2H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO-D₆): δ35.4, 37.3, 38.3, 40.1, 41.3, 42.1, 43.0, 43.7, 67.3, 105.1, 115.2, 117.3, 119.5, 123.0, 142.3, 144.4, 146.5, 148.7, 151.0, 154.8, 156.8, 170.2.

3 结论

我们从土壤中筛选出一株能够不对称生物还原 **2** 合成抗 2 型糖尿病药物西他列汀关键手性中间体 (S)-**1** 的菌株, 经鉴定命名为类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) XW-40. 该菌株中的羰基还原酶具有较高的活性、底物耐受性和极高的对映选择性, 单批次底物使用浓度高达 10 g/L, 产率>99%, ee >99%. 由于类产碱假单胞菌 XW-

40 属于革兰氏阴性菌, 有望实现该菌株中的羧基还原酶基因在以大肠杆菌为宿主的基因表达系统中的高效异源表达. 相关工作正在进行中. 我们建立的生物还原方法为合成西他列汀关键手性中间体提供了一条新途径.

参考文献:

- [1] Karasik A, Aschner P, Katzeff H, *et al.* Sitagliptin, a DPP-4 inhibitor for the treatment of patients with type 2 diabetes: a review of recent clinical trials[J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, **24**(2): 489-496.
- [2] Lee M, Rhee M K. Sitagliptin for Type 2 diabetes: a 2015 update[J]. *Exp Rev Cardio Thera*, 2015, **13**(6): 597-610.
- [3] Yokoh H, Kobayashi K, Sato Y, *et al.* Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin compared with alpha-glucosidase inhibitor in japanese patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin or pioglitazone alone (study for an ultimate combination therapy to control diabetes with sitagliptin-1): a multicenter, randomized, open-label, non-inferiority trial [J]. *J Diab Inves*, 2015, **6**(8): 182-191.
- [4] Zeng L L, Ding Y J, Zhang G C, *et al.* A practical synthesis of trifluorophenyl *R*-amino acid: The key precursor for the new anti-diabetic drug sitagliptin[J]. *Chin Chem Lett*, 2009, **20**(12): 1397-1399.
- [5] Tasnádi G, Forró E, Fülöp F. Improved enzymatic syntheses of valuable β -arylalkyl- β -amino acid enantiomers [J]. *Org Biomol Chem*, 2010, **8**(4): 793-799.
- [6] a. Kim D, Wang L, Beconi M, *et al.* (2*R*)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-*a*]pyrazin-7(8*H*)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *J Med Chem*, 2005, **48**(1): 141-151.
b. Li Wei-xiang (李伟翔), Li Chun (李春), Liu Gui-yan (刘桂艳), *et al.* Advances of enzyme catalyzed asymmetric synthesis system (酶促不对称催化手性合成系统研究进展) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(6): 581-594.
c. Xu Hong-mei (徐红梅), He Cong-lin (何从林), Xiong Wen-juan (熊文娟), *et al.* Preparation of (R)-o-chloromandelic acid via dynamic kinetic resolution of o-chloromandelonitrile by whole cells of *alcaligenesfaecalis* CGMCC1.2006 (*Alcaligenesfaecalis*CGMCC1.2006 整细胞催化邻氯扁桃腈动态动力学拆分制备(R)-邻氯扁桃酸) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(2): 174-181.
d. Zhou Ya (周亚), Zhang Jing (张劲), Liu Yan-lin (刘艳玲), *et al.* The graft of chiral amino alcohol onto poly(menthyl vinyl ketone) and their asymmetric induction in the Henry reaction (接枝于聚薄荷基丙烯醇的手性氨基醇的合成及其对 Henry 反应的不对称催化作用的研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(6): 493-501.
e. Yang Chao-fen (杨朝芬), Yang Jun (杨俊), Zhu Yan-qin (朱艳琴), *et al.* Asymmetric hydrogenation of acetophenone and its derivatives catalyzed by L-proline modified Ir/ γ -Al₂O₃ (L-脯氨酸修饰的铱催化苯乙酮及其衍生物不对称加氢反应) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(6): 507-514.
- [7] a. Hansen K B, Balsells J, Dreher S, *et al.* First generation process for the preparation of the DPP-IV Inhibitor sitagliptin [J]. *Org Pro Res Dev*, 2005, **9**(5): 634-639.
b. Jiang He-yan (蒋和雁), Chen Hu (陈华). Asymmetric hydrogenation of aromatic ketones catalyzed by cinchona and PPh₃-modified Ru/ γ -Al₂O₃ (金鸡纳碱衍生物修饰的负载钌催化剂催化芳香酮不对称加氢) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(2): 99-106.
c. Ding Hao (丁浩), Gao Bao-jiao (高保娇), Cheng Wei (程伟). Studies on characters of catalytic asymmetric epoxidation of styrene by new polymer-immobilized chiral salen Mn(III) complex (新型聚合物固载的手性 Salen Mn(III) 配合物催化的苯乙烯不对称环氧化反应特性研究) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2013, **27**(2): 115-123.
d. Wang Xiao-e (王晓娥), Miao Cheng-xia (苗成霞), Wang Shou-feng (王寿峰), *et al.* Mn(III) complex bearing non-hemeN₄ ligand for the asymmetric epoxidation of olefins (非血红素 N₄ 配体 Mn(III) 配合物催化烯烃的不对称环氧化反应) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(3): 204-209.
e. Miao Xiao (苗晓), Wang Lai-lai (王来来). New progress of transition metal/phosphorous Ligands catalyzed asymmetric hydrogenation (过渡金属/磷配体催化不对称氢化反应研究进展) [J]. *J Mol Catal (China)* (分子催化), 2014, **28**(3): 282-293.
- [8] a. Hansen K B, Hsiao Y, Xu F, *et al.* Highly efficient asymmetric synthesis of sitagliptin [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, **131**(47): 8798-8804.
b. Miao Xiao (苗晓), Li Hai-feng (李海峰), Pang

- Zeng-bo(逢增波), *et al.* Chiral diphosphite ligands derived from D-mannitol: synthesis and their application in the Rh-catalyzed enantioselective hydrogenation of α -dehydroamino acid Esters(D-甘露醇衍生的手性亚磷酸酯配体:合成及应用于铑催化 α -脱氢氨基酸酯不对称氢化) [J]. *J Mol Catal(China)* (分子催化), 2014, **28** (5): 393–399.
- [9] Davies S G, Ai M F, Lv L, *et al.* Asymmetric synthesis of (–)-(R)-sitagliptin [J]. *Tetra Lett*, 2012, **53** (24): 3052–3055.
- [10] Pan X H, Li X J, Lu Q L, *et al.* Efficient synthesis of sitagliptin phosphate, a novel DPP-IV inhibitor, via a chiral aziridine intermediate [J]. *Tetra Lett*, 2013, **54** (50): 6807–6809.
- [11] Liu F, Yu W S, Ou W H, *et al.* The asymmetric synthesis of Sitagliptin, a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *J Chem Res*, 2010, **34**(4): 230–232.
- [12] Savile C K, Janey J M, Mundorff E C, *et al.* Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture [J]. *Sci*, 2010, **329** (5989): 305–309.
- [13] Mendirata S K, Pandey B, Joshi R, *et al.* Process for preparing an intermediate of sitagliptin via enzymatic conversion [P]. US 2013/0289276 A1, 2013-10-31.
- [14] Kothari H M, Dave M G, Pandey B, *et al.* Improved process for preparation of (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]-triazolo[4,3- α]pyrazin-7(8H)-yl]-L-(2,4,5-trifluorophenyl) butan-2-amine & new impurities in preparation thereof [P]. WO 2010/032264A2, 2010-03-25.
- [15] Ni Y, Xu J H. Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS 2. 2241 [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2002, **18**(4): 233–241.
- [16] Soni P, Banerjee U C. Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis* [J]. *Appl Micro Biotechnol*, 2005, **67**(6): 771–777.

Highly Enantioselective Bioreduction of Prochiral Ketone to a Chiral Intermediate of Sitagliptin by Whole Cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40

WEI Yan-chan, XIA Shi-wen*, HE Cong-lin, XIONG Wen-juan,

XU Hong-mei, HE Xiang-yu

(College of Bio-informatics, Chongqing University of Posts and Telecommunications, Chongqing 400065, China)

Abstract: A bacterial strain isolated from soil with acetophenone as the sole carbon source, identified by 16S rDNA and designated as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40, is capable of reducing enantioselectively 4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro-[1,2,4] triazolo[4,3-a] pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl) butan-2-one (**2**) to (S)-3-hydroxy-1-(3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4] triazolo[4,3-a] pyrazin-7(8H)-yl)-4-(2,4,5-trifluorophenyl) butan-1-one ((S)-**1**), a chiral intermediate for the production of sitagliptin. The effects of bioreduction conditions such as water-soluble cosolvents, temperature, pH, substrate concentration, cell concentration and reaction time on the conversion and enantioselectivity were studied. The whole cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40 is tolerant towards prochiral ketone **2** at concentration as high as 10 g/L. Under the optimal conditions, the preparative-scale reaction yield (S)-**1** in 90% isolated yield and >99% ee.

Key words: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* XW-40; carbonyl reductase; bioreduction; chiral alcohol; sitagliptin