

Grøn kemi via hvid bioteknologi

I såvel den farmaceutiske som i mange andre industrier støder kemikere og procesingeniører konstant på krav om nye idéer og produkter. Samtidig er der krav om rene og grønne processer. Anvendelse af bioteknologi til den type af processer kaldes for hvid bioteknologi, og den er i voldsom stigning. Biokatalyse til syntese af farmaceutika ventes således at stige markant de kommende år

Af John M Woodley, Center for BioProcess Engineering, DTU Kemiteknik

I de sidste ti år er efterspørgslen efter rene og grønne processer steget signifikant. Det gælder indenfor hele den kemiske sektor, fødevarerindustrien såvel som i den farmaceutiske industri. Mange virksomheder anvender nu bioteknologiske løsninger til at gøre deres processer mere miljøvenlige, mindre energiforbrugende og for at mindske dannelsen af drivhusgasser. Anvendelse af bioteknologi til sådanne industrielle, miljøvenlige processer betegnes i dag »hvid bioteknologi«. Nogle af de helt store fremskridt indenfor »hvid bioteknologi« og herunder i udviklingen af ny processteknologi kan fremover forventes at ske indenfor anvendelsen af biokatalyse til syntese af komplekse farmaceutiske molekyler.

Enzymer til kemisk syntese i den farmaceutiske industri

Enzymer er ideelle katalysatorer til at assistere syntesen af komplekse farmaceutiske produkter. Dette skyldes først og fremmest enzymernes katalytiske selektivitet – en selektivitet, som langt overgår hvad der kan opnås med konventionel organisk syntese. Mange enzym-katalyserede reaktioner er allerede

Tabel 1:

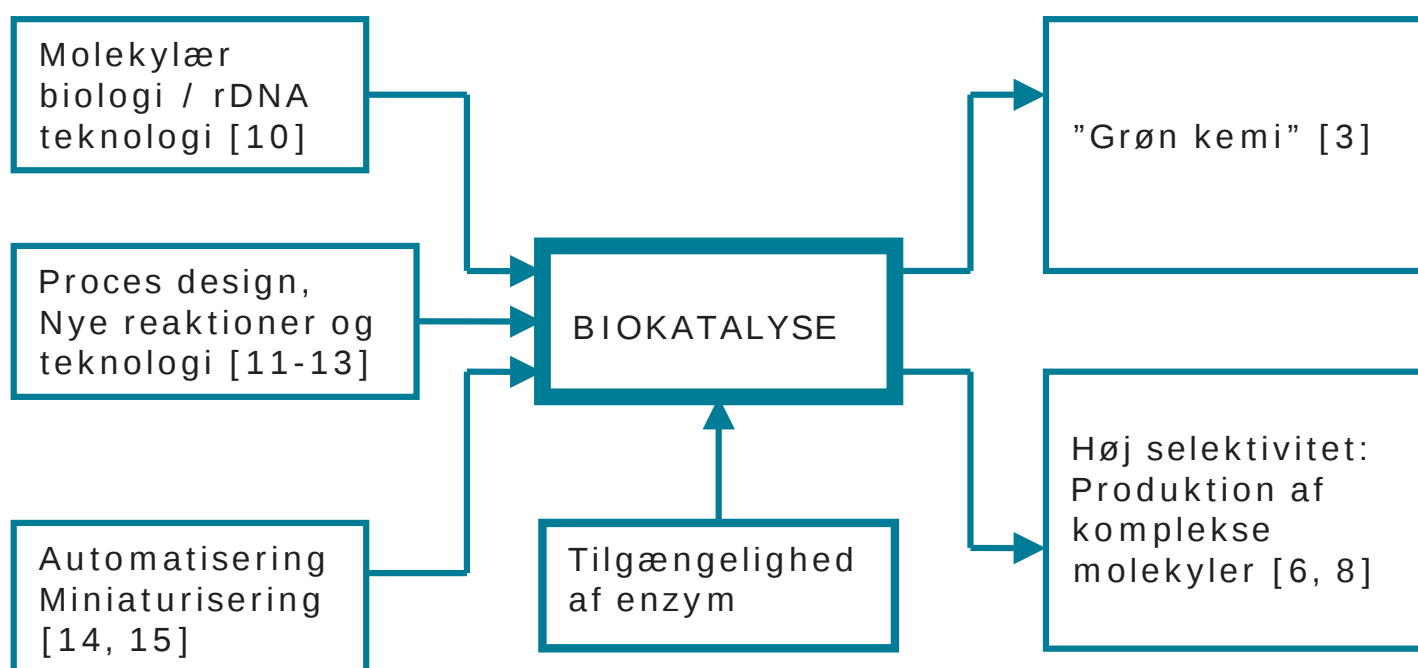
Enzymers »grønne« fordele

- Katalyse med høj selektivitet (stereo- og regio selektivitet)
- Katalyse under skånsomme procesbetingelser (bl.a. relativt lav temperatur)
- Katalyse i vandig opløsning (mulighed for også at anvende organiske solventer, ioniske væsker, superkritiske væsker og tofase-medier)
- Giver mulighed for at modificere katalysatorens egenskaber (via protein engineering eller anden målrettet udvikling)
- Kan produceres fra fornybare ressourcer

blevet introduceret i den farmaceutiske industri netop på grund af enzymernes selektivitet.

Hovedparten af de store farmaceutiske virksomheder – både danske og internationale - arbejder i dag på at undersøge mulighederne for at anvende enzymkatalyse som et middel til at effektivisere produktionen af det endelige farmaceutiske produkt.

INDUSTRIELLE ØNSKER



Udviklingssammenhænge indenfor anvendelse af biokatalyse til syntese af komplekse farmaceutiske produkter. (Referencer henviser til eksempler på publikationer indenfor området).

Tabel 2:

Biokatalyse kemi til pharmaceutisk syntese. »Etablerede«, »Ekspanderende« og »På vej« refererer til status af tilgængelige kommercielle enzymer (ref. 6).

Status	Reaktion	Enzym
Etablerede	Resolution	Lipaser / protease
	Hydrolyse	Lipaser / protease
	Keton reduktion	Ketoreduktase
Ekspanderende	Nitril reduktion	Nitrilase
	Cyanohydrin syntese	Oxynitrilase
»På vej«	Transaminering	Transaminase
	Enoat reduktion	Enoat reduktase
	Hydroxylering	Cytochrom P450
	Dihydroxylering	Dioxygenase
	Baeyer-Villiger (B-V)	B-V monooxygenase
	Epoxid hydrolyse	Epoxid hydrolase
	Epoxidering	Haloperoxidase
		Cytochrome P450
		Haloperoxidase
	Halohydrin dannelse	

Denne udvikling er forløbet stille og roligt de sidste 20 år, og der er eksempler på anvendelse af både hele celler og isolerede enzymer til katalyse af bestemte syntesetrin. Hovedparten af de industrielle anvendelser af enzymer til organisk syntese har hidtil især fundet sted indenfor racemisk katalyse, herunder asymmetrisk (enantiosektiv) syntese, i produktionen af optisk rene produkter [1, 2].

Udover selektiviteten byder anvendelsen af enzymer på mulighed for indførelse af ren og grøn kemi [3]. Netop behovet for at finde grønne, kemiske veje til syntese af farmaceutiske molekyler åbner op for helt nye udviklingsmuligheder indenfor enzymkatalyse og -teknologi. Forskellige internationale reviews indenfor »hvid bioteknologi« har for nylig understreget enzyms og enzymkatalyses fordele i denne sammenhæng: se Tabel 1.

Mens grundpillen i farmaceutisk syntese stadig vil være klassisk organisk syntese er der ingen tvivl om, at biokatalyse vil komme til at spille en stadig større rolle fremover. Miljøbelastningen af nye processer i de farmaceutiske virksomheder bliver allerede nu rutinemæssigt undersøgt [4, 5] og det vurderes bl.a. om enzymkatalyse kan være et relevant alternativ i den enkelte proces.

Nye reaktioner

I et nyligt review blev forskellige typer biokatalytiske reaktioner til farmaceutisk syntese kategoriseret i forhold til tilgængeligheden af kommercielle enzymer, se tabel 2.

Denne inddeling blev brugt til at kategorisere forskellige typer reaktioner i klasser, hhv. »etablerede«, »ekspanderende« og »på vej« [6]. Der er de senere år sket signifikante fremskridt med hensyn til forskelligheden af reaktioner der kan katalyseres ved hjælp af enzymer i en relevant, dvs. stor, skala.

Der ligger dog stadig et stort arbejde forude før det fulde potentiale af eksisterende enzymer udnyttes fuldt ud. Efterhånden som der kommer viden om stadig flere enzymer og enzymkatalyserede reaktioner indenfor den type reaktioner, der kategoriseres som »på vej« (Tabel 2), bliver det muligt at identificere helt nye synteseveje, herunder nye startpunkter. Det vil bl.a. blive muligt at integrere chiralitet på nye steder i syntesevejene [7]. Mange nye og potentielle terapeutiske produkter indeholder flere chirale centre, hvilket normalt er en stor udfordring i den konventionelle organiske syntese [8].

Udvikling

Den farmaceutiske industri støder konstant på nye krav om hurtig udvikling af nye produkter og nye processer. Disse krav lægger et stort pres på kemikere og procesingeniører, som hele tiden skal udvikle nye processer til fremstilling af ny medicin på mindst mulig tid.

Der stilles samtidig stigende krav til sikkerheden og effektiv-



Vi har mange produkt nyheder.... her et par af dem..

Mikrobiologisk analyse på 4 min !
Måling af UV-spektra direkte i pipettespidsen !

Interesseret i at vide mere ?
 Kontakt os på 86212866 eller sales@biolab.dk.
 Se flere detaljer på www.biolab.dk



Biolab A/S · Sindalsvej 29
 DK-8240 Risskov
 Telefon 8621 2866
 Telefax 8621 2301
 E-mail: sales@biolab.dk

Kalibrering af pipetter.
 DANAK akkreditering nr. 482.
 Specialister i :
 SPE * HPLC * GPC * LC * FLASH
 * Spektrofotometre * TLC * CE *
 Pipetter * SPR * mikrobiologisk
 analyse * syntese

teten af de nye produkter og processer. Introduktionen af et eller flere enzymatiske trin, som er trin, der ofte finder sted under milde reaktionsbetingelser (og i øvrigt i vandige solventer), kan eliminere behovet for adskillige syntesetrin. Samtidig kan et enzymatisk trin – sammen med kromatografisk oprensning – ofte være et afgørende element i hurtig fremstilling af produkter til klinisk afprøvning.

På dét stadi kan kommercielt tilgængelige enzymer, som reagerer i opløsning og inaktiveres efter endt reaktion, sommetider bruges. For at spare på enzymomkostningerne er det imidlertid i selve procesimplementeringen i fabrikksskala normalt nødvendigt at bruge et immobiliseret enzym, dels for at sikre, at enzymet genbruges, dels for at sikre, at produktet er enzymfrit. Et andet alternativ er brugen af hele celler, hvor enzymet, der skal bruges slet ikke er oprenset, men hvor det sikres, at kun den relevante aktivitet virker pga. de særlige reaktionsbetingelser og/eller pga. tilstedeværelsen af det bestemte substrat, som skal omdannes [9]. Denne løsning sparer på enzymomkostningerne ved at udgifterne til oprensning af enzymet udgår [9].

Molekylærbiologisk enzymmodifikation

Modifikation af enzymer ved hjælp af moderne molekylærbiologiske metoder kan målrettes således, at f.eks. et enzyms robusthed eller effektivitet på et givet substrat ændres under givne reaktionsbetingelser [10]. Når der er tale om specifikke farmaceutiske molekyler og deres omdannelser er det oftest usandsynligt, at det pågældende substrat og de industrielle reaktionsbetingelser svarer til det, som findes i naturen, og som derfor svarer til den naturlige enzymreaktion.

Derfor kan sådan molekylærbiologisk proteinmodifikation være en forudsætning for at få enzymprocessen til at køre effektivt nok. Hertil kommer, at brug af protein engineering til f.eks. at øge den specifikke aktivitet af et enzym også har vist sig brugbart til at implementere særlige enzymatiske trin, som ellers ikke kunne lade sig gøre ved brug af det native enzym. Anvendelsen af rekombinant DNA teknologi (rDNA teknologi) til at få over-udtrykt enzymet i en passende værtsorganisme har også længe været etableret teknologi, og er i dag en selvfølgelig forudsætning for at nedbringe omkostningerne til selve enzymproduktionen. Parallelt med udviklingen af disse molekylærbiologiske teknikker er der sket betydelige fremskridt indenfor udvikling af nye, hurtige enzymassays og såvel som indenfor automatisering, bl.a. robotteknologi, til screening af nye enzymaktiviteter og f.eks. til identifikation af særlig enzymspecificitet og -stabilitet.

Procesimplementering

Andre udfordringer ved implementeringen af biokatalytiske trin og processer i industrielle farmaproceser inkluderer i mange tilfælde indførelsen af alternative procestekniske løsninger. Det kan f.eks. være, at processen kræver kontrol med substrattilførslen og/eller hurtig fjernelse af produktet under reaktionen [11]

Tabel 3:

Procestekniske principper til procesimplementering af biokatalyse

- In-situ produkt fjernelse
- Reaktor engineering inklusive design af membran reaktorer
- Substrat tilførsningsmetoder inklusive to-fase reaktioner
- Proces modellering til prediktion og kontrol af proces- og enzymændringer
- Proces integration

– begge dele for at sikre, at reaktionen ikke hæmmes af tilstedeværelsen af hverken substrat eller produkt. En række forskellige innovative reaktionsmetoder og -løsninger er blevet taget i brug eller er ved at blive undersøgt (se Tabel 3).

Især integrationen af selve enzymreaktionen med samtidig produktfjernelse, såkaldt *in-situ* produktfjernelse (Tabel 3), ved brug af forskellige fysisk-kemiske principper, har vist sig at byde på store muligheder for at øge rentabiliteten og effektiviteten af nye biokatalytiske trin. Disse nye tiltag har i mange tilfælde vist sig at være det afgørende element i procesimplementeringen for at opnå kommercielt levedygtige produktniveauer på > 50 g produkt/L reaktor og 1000 g produkt/g enzym [12, 13]. Hvis der bruges hele celler til katalysen er kravet omkring 15 g produkt /g celle [12,13].

For nylig har anvendelsen af såkaldt miniature-teknologi, dvs. mikrobioreaktorer og mikrofluidsystemer, indenfor både konventionelle kemiske processer og enzymkatalyserede processer gjort, at relevante procesdata kan tilvejebringes ekstremt hurtigt. Denne udvikling danner basis for udvikling af nye løsningsmetoder indenfor procesoptimering, da der hurtigere kan bygges relevante modeller til at forudsige reaktionsforløb i stor skala [14, 15]. Det forventes, at den industrielle implementering af disse metoder vil muliggøre hurtigere procesudvikling.

Fremtidig udvikling og anvendelser

Det synes klart, at der i fremtiden vil opstå flere muligheder og yderligere udvikling indenfor anvendelsen af enzymer i vigtige trin også i den farmaceutiske industri. I de kommende år kan vi bl.a. forvente udvikling indenfor:

- Brug af enzymer til syntesereaktioner - hvor der er et behov for alternativer til eksisterende metoder
- Indføring af multiple enzym systemer, dvs. hvor flere enzymer er bragt til at agere sekventielt eller parallelt
- Integration af metoder, som i højere grad kobler enzymatisk(e) omdannelse(r) og kemisk katalyse
- Nye procesintegrationsmetoder og -principper til substrattilførsel og produktfjernelse

De relevante værktøjer og teknologier er på vej, og det sker i takt med, at der generelt er øget fokus på biokatalyse og procesteknologi – »hvid bioteknologi« – både på universiteterne og i industrien (Figur 1). Det synes derfor at være en rimelig forventning, at anvendelsen af biokatalytiske løsninger også vil øges i den farmaceutiske industri i de kommende år.

jw@kt.dtu.dk

Referencer

- [1] Bommarius A.S. and Riebel B.R.: Biocatalysis (Vol 1), Wiley-VCH (2004)
- [2] Buchholtz K. *et al.*: Biocatalysts and Enzyme Technology, Wiley-VCH (2005)
- [3] Constable D.J.C. *et al.*: Green Chem. 9, 411-420 (2007)
- [4] Jimenez-Gonzalez *et al.*: Clean Prod. Proc. 3, 35-41 (2001)
- [5] Jimenez-Gonzalez *et al.*: Clean Tech. Environ. Policy. 4, 44-53 (2002)
- [6] Pollard D.J. and Woodley J.M.: Trends Biotechnol. 25, 66-73 (2007)
- [7] Hailles H.C. *et al.*: J. Chem. Tech. Biotechnol. 82, 1063-1066 (2007)
- [8] Rouchi M.A.: Chem. Eng. News. 80, 43-50 (2002)
- [9] Woodley J.M.: Adv. Appl. Microbiol. 60, 1-15 (2006)
- [10] Hibbert E.G. *et al.*: Biomolec. Engng. 22, 11-19 (2005)
- [11] Kim P-Y. *et al.*: Biotechnol. Prog. 23, 74-82 (2007)
- [12] Yazbeck D.R. *et al.*: Tet. Asymm. 15, 2757-2763 (2004)
- [13] Rozzell J.D.: Bioorg. Med. Chem. 7, 2253-2261 (1999)
- [14] Lye G.J. *et al.*: Org. Proc. Res. Dev. 6, 434-440 (2002)
- [15] Lye G.J. *et al.*: Trends Biotechnol. 21, 29-37 (2003)