

효소를 이용한 광학분할

이 은 교 · †정 봉 현
생명공학연구소 미생물공정연구실
(접수 : 2000. 9. 1., 게재승인 : 2000. 10. 23.)

Chiral Resolution Using Enzymes

Eun Gyo Lee and Bong Hyun Chung†

Microbial and Bioprocess Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. BOX 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
(Received : 2000. 9. 1., Accepted : 2000. 10. 23.)

Enzymatic resolution is becoming increasingly important in the production of optically active pharmaceutical drugs and is now challenging the traditional synthetic methods for production of a variety of chiral intermediates and products. This article reviews the recent advances in chirotechnology using enzymes as a catalyst to resolve chiral compounds. The review focuses on the recent trends in chirotechnology and the application of enzymes to the production of industrially valuable pharmaceutical drugs.

Key Words : enzymatic resolution, chiral resolution, chirotechnology

서 론

광학활성 (optically active)이란 편광을 일정각도만큼 회전시키는 능력을 말하며 이는 분자의 키랄성 (chirality)에 기인하는 것이다. 광학이성질체 (stereoisomer)는 키랄 중심 (chiral center)의 수에 따라 2ⁿ개의 광학이성질체가 존재할 수 있으며, 이 중 서로 거울상을 이루는 이성질체를 거울상 이성질체 (enantiomer)라 부르고 거울상을 이루지 않는 이성질체를 부분 입체이성질체 (diastereomer)라 부른다(1). 부분입체이성질체의 경우 이성질체간의 생물학적 성질은 물론 물리화학적 성질도 다르고, 거울상이성질체는 물리화학적 성질은 동일하지만 생물학적 성질이 달라 생체내에서 흡수 및 대사뿐 아니라 수용체와의 상호작용과정에서도 서로 다른 성질을 나타내며 의약품 개발에 있어 중요한 인자가 되고 있다.

1993년에 세계적으로 판매된 1850종의 의약품중 절반 이상이 광학활성 의약품이며 이중 절반 이상이 단일 이성질체로 시판되었다. 현재 광학활성 의약품의 총매출액은 연간 천 억불을 넘을 것으로 예상되고 있으며 키랄 분리기술을 보유하고 있는 ChiroTech Technology, Chirex, Sepracor, Oxford Asymmetry 등은 신기술을 개발하기 위한 연구를 활발히 진행하고 있다(2). Single enantiomer drug 시장은 매년 큰 폭으

로 증가하고 있으며, 1998년 964억불, 2000년에는 1000억불 이상이 될 것으로 확실시되고 있다(Table 1). 항생제 및 심혈관계 의약품 시장이 상당히 크며 호흡기 및 항바이러스 약품 시장이 급격히 성장중인 것을 알 수 있다. 또한, 세계 10대 의약품중 소염진통제인 Ibuprofen과 항우울제인 Fluoxetine을 제외하고는 모두 순수한 광학활성을 갖는 의약품이었다 (Table 2).

미국 FDA(US Food and Drug Association)에서는 단일 거울상 이성질체만을 의약품으로 허가한다는 정책을 발표하지는 않았지만 대부분의 키랄 의약품에 있어 단일 이성질체만을 선호하고 있으며 라세미체 의약품은 예외(거울상 이성질체 사이의 상호변환 또는 상호보완적인 경우)적인 경우에 속하는 것으로 보고 있다. 제약회사들은 FDA에 의해 이미 승인된 라세미체 의약품의 경우 single enantiomer drug로서 신약 승인을 획득하기 쉽다는 이점 때문에 기존에 개발된 라세미체 의약품으로부터 광학적으로 순수한 single enantiomer drug을 얻기 위한 racemic switch 기술을 획득하기 위해 활발한 연구를 진행 중에 있으며, 새로운 의약품의 개발시 라세미체 또는 단일 거울상 이성질체 의약품으로 개발해야할 것인가를 결정해야만 하는 시점에 이르렀다(4).

키랄 의약품개발 전문 회사들은 국제적인 협력 또는 회사간의 공동개발을 통하여 기술축적을 이루고 있으며 비대칭합성을 통한 신기술이 계속적으로 개발되고 있음에도 불구하고 산업적으로 가장 많이 활용되고 있는 기술은 광학분할기술이다(5). 현재 가장 많은 관심을 끌고 있는 광학분할기술로는 액체크로마토그래피를 이용한 광학분할 및 dynamic kinetic

†Corresponding Author : Microbial and Bioprocess Eng. Lab., KRIBB, P.D. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea
Tel : +82-42-860-4442, Fax : +82-42-860-4594
E-mail : chungbh@mail.kribb.re.kr

Table 1. Worldwide chiral drug sales (3)

	Total drug sales		Sales of single-enantiomer chiral drugs		Annual change
	1997	1996	1997	1996	1997-1998
Antibiotic	26,752	19,527	20,064	19,527	11%
Cardiovascular	36,580	17,530	20,046	17,530	8%
Hormones/endocrinology	14,703	8,006	8,528	8,006	17%
Oncology	11,558	6,803	7,513	6,803	10%
Hematology	14,970	5,199	6,033	5,199	4%
Antiviral	13,630	1,815	5,537	1,815	27%
Central nervous system	36,069	4,065	5,231	4,065	3%
Respiratory	29,088	1,201	2,327	1,201	35%
Immunosuppressant	3,386	1,475	1,998	1,475	
Anti-inflammatory/analgesic	18,309	895	1,483	895	
Ophthalmic	6,432	675	1,087	675	
Dermatology	14,789	545	843	545	
Gastrointestinal	60,818	-	669	-	8%
Benign prostate hyperplasia	8,026	450	626	450	
Other	15,000	3,790	5,934	3,790	
Total	310,110	72,900	87,919	72,900	

Table 2. The top ten chiral drugs (6)

Drug	Therapeutic class	Sales (\$ million per year)
Amoxicillin	Antibiotic	2,200
Enalapril	Anti-hypertensive	2,100
Ampicillin	Antibiotic	2,000
Captopril	Anti-hypertensive	1,800
Pravastatine	Anti-hypercholesteraemic	1,700
Diltiazem	Anti-hypertensive	1,500
Ibuprofen	Anti-inflammatory	1,500
Lovastatin	Anti-hypercholesteraemic	1,300
Naproxen	Anti-inflammatory	1,200
Fluoxetine	Anti-depressant	1,200

resolution방법이다. 액체 크로마토그래피를 이용한 광학분할 기술은 Chiral Technologies사, Regis Technologies사, Universal Pharma Technologies사 등에서 광학분할을 위한 고정상 연구 및 simulated moving bed (SMB) 크로마토그래피 시스템과 같은 공정기술을 개발하고 있으며 이와 관련하여 cGMP (current Good Manufacturing Practice) 시설도 갖춘 것으로 알려졌다(2). 이런 크로마토그래피 기술의 가장 큰 장점은 제약회사의 의뢰에 의한 시험 테스트가 용이하고 톤 규모의 대량생산을 위한 파일럿 규모의 시설을 개발회사들이 갖추고 있어 언제든 상업화가 가능하다는 것이다. 물리화학적 방법인 크로마토그래피 기술과 더불어 기존의 효소에 의한 광학분할공정을 개선하기 위해 제안된 방법은 dynamic kinetic resolution방법이다. 기존의 효소에 의한 광학분할과 동시에 화학촉매에 의한 라세미화 반응을 결합하여 이론 수율을 50%에서 100%로 끌어올림과 동시에 효소의 광학선택성을 매우 높게 유지하는 방법으로서 최근 많은 관심이 모아지고 있다.

본 논문에서는 키랄 의약품과 관련하여 광학활성 화합물의 제조방법 및 최근 개발된 효소 고정화 방법을 소개하고, 이와 더불어 상업적으로 개발된 광학분할 사례 등을 정리하여 연구동향을 살펴보고자 한다.

광학활성 화합물의 제조기술 및 경제성

프랑스의 과학자 Louis Pasteur는 1853년에 포도주가 발효

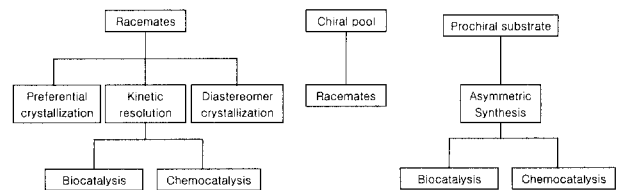


Figure 1. Synthetic routes to pure enantiomers (8)

할 때 포도주통에 가라앉은 두 가지 산 (주석산, racemic tartaric acid)을 diastereomeric salt crystallization방법을 사용하여 (+)/(-)-tartaric acid로 분리하는 데 성공하였고, 그 후 미생물 발효를 이용한 실험을 통하여 (-)-tartaric acid만을 생산함으로써 키랄성과 생물학적 활성사이의 연관관계를 파악하는 데 큰 기여를 하였다(1,6).

100년이 넘게 지난 지금에도 Pasteur의 방법은 산업적으로 가장 중요한 방법으로 사용되고 있으며, 출발물질에 따라 광학적으로 순수한 물질을 얻기 위한 방법을 Figure 1에서 볼 수 있듯이 크게 세 가지로 나눌 수 있다(6). 결정화나 광학분할을 통해 라세미체를 분리하는 방법, 광학활성을 지닌 천연물로부터 목적 화합물을 합성하는 방법, 광학활성을 지닌 물질을 생성시킬 수 있는 이중결합이나 알데히드기 등의 기능성 부분을 가진 키랄 선구물질을 비대칭 합성하여 순수한 광학활성물질을 얻는 방법이다. 광학분할이나 키랄 풀(chiral pool), 키랄 보조제(chiral auxiliaries)를 이용하는 방법이 1세

대의 합성법이라면 비대칭 촉매반응을 이용하는 방법이 보다 진보된 형태라 할 수 있다. 100%의 수율로 원하는 이성질체만을 얻을 수 있는 장점 때문에 최근 비대칭 합성법에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다(7).

일반적으로 비대칭 합성법과 광학분할의 장단점을 비교하게 되면 이론수율에 있어서 비대칭합성법의 1/2 밖에 되지 않는 광학분할법이 상대적으로 비효율적인 것처럼 보이나 이는 전체 공정의 단순·복잡성 및 원료/효소 가격 등을 전반적으로 살펴보아야 두 공정의 공정한 비교가 가능해진다. 효소를 이용한 광학분할공정에 있어 경제성을 결정짓는 주요인자는 효소의 재사용 여부 및 수율을 높이기 위한 라세미화 공정의 효율성이다(8).

광학분할에 사용되는 효소

생물전환에 사용되는 효소로는 리파제, 에스테라제, protease, oxidoreductase, oxygenase, nitrilase 등이 있으며, 그 중에서 리파제, 에스테라제, protease가 절반이상을 차지하고 있다(9,10). 이처럼 가수분해효소 (protease, esterase, lipase)가 폭넓게 이용되는 이유를 살펴보면, 첫째 이들 효소는 cofactor를 필요로 하지 않는다는 것이다. 산화 환원 반응에서처럼 NADH/ NADPH와 같은 cofactor의 필요는 산업화를 불가능하게 한다. 둘째, 이 효소들은 여러 곳에서 쉽게 얻을 수 있는 장점이 있고, 세째로 수상계뿐 아니라 유기상에서도 활성 유지가 가능하다는 것이다. 마지막으로, 이들 효소가 갖는 가장 중요한 특징은 높은 광학특이성과 더불어 넓은 기질수용성이다(11).

생물전환에 사용되는 효소중 광학분할연구에 사용되는 효소를 살펴보면 대부분의 효소는 리파제(E.C.3.1.1.3.)이다. 이 효소는 동물, 식물, 미생물등 대부분의 생물에 존재하며 triglyceride를 글리세롤이나 지방산으로 수화시키는 능력을 가진다(12-15). Table 3에서는 대표적인 리파제와 이들의 공급회사를 요약하였다(16). 리파제는 넓은 기질수용성과 더불어 매우 뛰어난 광학선택성도 갖추고 있어 키랄 의약품 및 중간체의 합성 등 산업적으로 가장 널리 이용되고 있으며 계면활성능 (interfacial activation) 또한 뛰어나 에멀전 형태의 기질을 효과적으로 이용할 수 있는 능력이 있다. 리파제의 대표적 응용예를 들어보면 비스테로이드 소염진통제인 (S)-Profen

Table 3. Source of commercial lipases (16)

Source	Suppliers
<i>Alcaligenes</i> sp.	Amano
<i>Achromobacter</i> sp.	Meito Sangyo
<i>Aspergillus niger</i>	Amano
<i>Bacillus subtilis</i>	Towa Koso
<i>Candida rugosa</i>	Sigma, Amano, Meito Sangyo, Boehringer-Mannheim
<i>Candida lipolytica</i>	Amano
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Sigma, Toyo Jozo
<i>Geotrichum candidum</i>	Sigma, Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano
<i>Mucor miehei</i>	Amano, NOVO
<i>Penicillium camemberti</i>	Rhone-Poulenc
<i>Phycomyces nitens</i>	Takeda Yakuhin
Porcine pancreas	Sigma, Amano, Boehringer-Mannheim
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Pseudomonas</i> sp.	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Sigma, Boehringer-Mannheim
<i>Rhizopus delemar</i>	Sigma, Amano, Tanabe Seiyaku
<i>Rhizopus japonicus</i>	Amano, Nagase Sangyo, Osaka Saiken Lab.
<i>Rhizopus oryzae</i>	Amano
<i>Rhizopus</i> sp.	Amano, Serva
Wheat germ	Sigma

drug 생산(17-25), 고혈압 치료제인 Captopril 중간체(7) 및 Diltiazem 중간체(26,27), 베타 블로커(β -bloker)의 중간체 생산(28,29), Roche사의 항우울제 중간체 생산, 비타민 E 생산, 광학활성 lactone 생산(15) 등 수많은 광학분할반응이 개발되었으며 최근 리파제를 이용하여 연구하고 있는 여러 반응들에 대해 Table 4에 정리하였다(30-46).

광학분할연구를 위해 사용되는 리파제외의 효소로 소염진통제중 하나인 (S)-Ibuprofen의 합성에 사용되는 nitrilase, Cilastatin (Carbapenem계 항균제인 Imipenem과 함께 사용되는 dehydropeptidase I 저해제) 중간체인 (S)-amide를 생산하는 Lonza사의 nitrile hydratase가 있다. 전통적인 아미노산 합성방법으로서 Tanabe사의 aminoacylase에 의해 L-methionine과 L-valine을 생산하는 공정이 있으며, 베타락탐계 항생제 중간체인 6-APA를 얻기 위해 사용되는 penicillin acylase가 있다(47). DSM Andeno사는 ACE저해제의 전구물질인 L-homophenylalanine을 얻기 위해 aminopeptidase를 사용하는 방법을 개발하였으며, ICI사

Table 4. Enzymes used for enzymatic resolution

Enzymes	Target	Solvent	Ref.
Aminoacylase	N-Acetyl-DL-amino acid	Water	30
<i>Aspergillus niger</i> lipase	Acyloxy ester	Isooctane + benzene	31
<i>Candida antarctica</i> lipase	Lactone	tert-Butyl methyl	32, 33
	Ibuprofen	CO2	34
	Taxol intermediate	Isopropylacetate/hexane	35
<i>Candida rugosa</i> lipase	Suprofen	Isooctane	36
	Trifluoromethyl hydroxycarboxylic acid	Water	37
	Linaloxymethyl butanoate	Hexadecane	38
	Hydroxy ketone	Vinyl acetate	39
CLEC (Altus 20)	Pantolactone	Vinyl acetate	40
Lipozyme	Hydroxycyclopent-2-en-1-one	Diisopropyl ether	41
<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	Nitro-cycloalkenyl acetate	Water	42
	Phenylethanol	Dichloromethane	43
<i>Pseudomonas</i> sp. (Amano AK)	Methylenecycloalkane	Vinyl acetate	44
<i>Pseudomonas</i> sp.(Chirazyme L-6)	Halohydrin	Vinyl acetate	45
<i>Pseudomonas</i> sp. (Lipase AK)	Solketal	Diisopropyl ether	46

는 (S)-2-chloropropionic acid 합성을 위해 dehalogenase를 사용한 방법들을 개발하였다.

효소 고정화를 위한 방법들

키랄 의약품의 생산에 있어 효소는 매우 높은 광학선택성을 가지고 있다는 장점과 함께 고가이며 안정성이 떨어진다는 커다란 단점을 가지고 있다. 따라서 효소공정의 상업화를 이루기 위해서는 효과적인 효소의 고정화가 도입되어야 한다(48-51). 최근에 성공적인 고정화 방법으로 눈길을 끄는 효소 고정화 방법은 cross-linked enzyme crystal (CLEC), sol-gel encapsulation, lipid-coated enzyme 등이 있다(51).

결정화 효소를 이용하는 CLEC 방법은 St. Clair와 Navia의 thermolysin CLEC 제조 성공에 힘입어 급속도로 발전하였고, Altus Biologics사의 Margolin에 의해 CLEC 대량제조가 가능해지면서 상업화 가능성을 한층 높였다(10,52). Margolin에 의해 제조된 리파제 CLEC은 프로펜계 의약품 등 여러 의약품의 광학분할에 적용되었고, (S)-Ibuprofen (95% ee), (S)-Naproxen (97% ee), (S)-Ketoprofen (91% ee), (-)-Methol (95% ee)의 생산에 성공적으로 응용될 수 있음을 보였으며, 반복적 회분식 반응을 통해 장기조업의 가능성도 확인하였다. CLEC의 장점은 타 고정화 방법과는 달리 고정화 후 활성 증가가 일어나며 수상 및 유기상 모두에서 뛰어난 활성 및 안정성을 유지하고 쉽게 회수가 가능하여 반복사용하기 편리하다는 데 있다.

Sol-gel encapsulation은 전통적으로 많이 쓰이는 실리카 담체 위에 다양한 종류의 소수성 실란을 붙임으로써 리파제의 흡착능을 강화시키는 동시에 실리카 흡착으로 인한 활성감소를 줄이고자 하는데 그 목적이 있다. Reetz (53) 등은 두 개의 실란 precursor의 조합을 통해 활성이 증가하는 것을 보고하였다. 실란 precursor에 붙는 알킬기의 소수성 크기에 따라 리파제의 활성이 증가하는 것을 발견하였으나 실란 precursor의 혼합비에 의한 영향 및 실란 precursor 선택을 위한 조건 등은 앞으로 연구가 되어야 할 부분이다.

Okahata (54) 등에 의해 개발된 lipid-coating 법은 효소 주위를 약 150개의 lipid 분자가 단층으로 둘러싼 형태를 가지기 때문에 유기상 반응에 있어 효소의 안정화 및 용해도를 높이는 효과를 가져온다. 한 예로 lipid-coated lipase B를 이용하여 rac-1-phenylethanol을 lauric acid와 반응시키면 phenylethanol은 (R)-형태로 매우 빠르게 광학분할된다 ((S)-형태를 생산하는 속도의 260배 빠르기). 양쪽성이온, 음이온, 양이온 등의 glycolipid를 테스트한 결과 리파제의 활성은 didodecyl N-D-glucono-L-glutamate와 didocyl-N-D-glucono-D-glutamate가 (R)-1-phenylethanol의 생산을 위해 가장 높은 광학선택성을 보임을 보고하였다.

Kinetic Resolution과 Dynamic Kinetic Resolution

효소에 의한 광학분할은 Pasteur의 실험 이후 100년이 넘도록 연구되고 있으며 산업적으로 매우 중요한 방법임에도 불구하고 가장 큰 문제점으로 지적되고 있는 것은 이론 수율이 50%밖에 되지 않는다는 것이다. 그 이유는 라세미체 중 한가지 거울상 이성질체만이 효소반응을 통해 반응이 일어나고 나머지 하나는 거의 반응이 일어나지 않아 미반응물로 남아있기 때문이다. 라세미체 중 한가지 이성질체만이 원하는

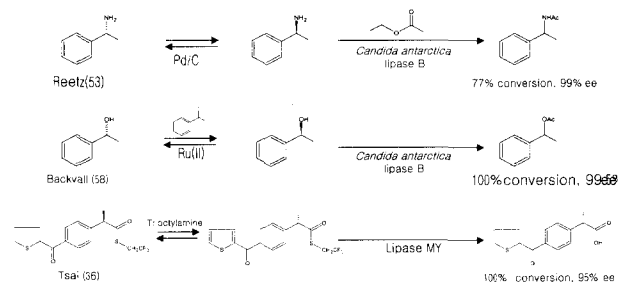


Figure 2. Enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution with in situ racemization

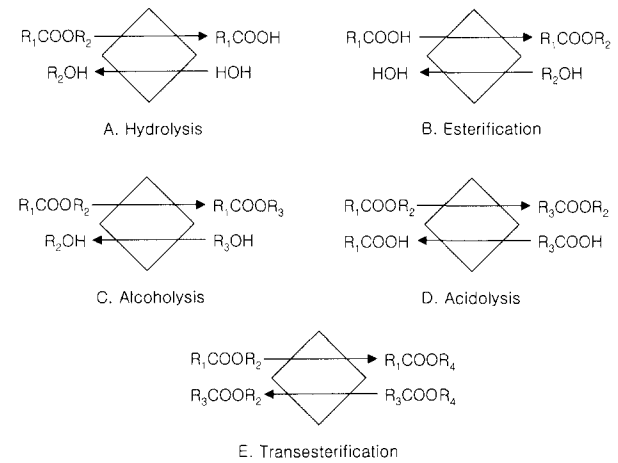


Figure 3. Schematic representation of the reactions catalysed by lipase (48)

물질이기 때문에 생성물로부터 미반응 기질을 회수하여 다시 라세미화 반응을 시켜야 하는 번거로움이 있었다. 이는 낮은 생산성 및 반응의 복잡성을 초래하게 된다. Dynamic kinetic resolution은 광학분할반응이 일어나는 동시에 빠른 라세미화 반응을 지속적으로 행하여 원하는 생성물을 100% 회수하기 위해 개발되었다. 가장 간단한 예로서 Inagaki (55,56) 등의 *in situ* racemization 효소반응을 들 수 있다. 라세미체 Cyanohydrin을 (S)-Cyanohydrin acetate로 acetylation하는데 있어 음이온교환수지를 이용하여 매우 높은 수율(96%)을 얻을 수 있었다. 이런 dynamic kinetic resolution은 라세미화 반응이 급속히 이루어져 효소반응이 속도결정단계가 되어야만 비로소 효과적이게 된다(57). Dynamic kinetic resolution에 있어 가장 핵심은 *in situ* racemization (9)으로서 *Candida antarctica* lipase B에 의한 Phenylethylamine의 광학분할에 있어서는 납촉매(57)를, 이차알코올의 광학분할에 있어서는 Ruthenium촉매(43,58)를, Suprofen의 광학분할에 있어서는 trioctylamine(36)을 사용한 연구사례가 보고되고 있다(Figure 2).

광학분할 효소반응의 종류

효소(리파제)에 의한 광학분할에 있어 효소와 기질간 상호작용하는 반응기작에 따라 수화반응, 에스테르화반응, 상호에스테르화반응 등 세가지로 크게 나눌 수 있다.

수화반응 (Hydrolysis)

가장 일반적인 반응으로서 수상계에서의 효소반응을 통하여 에스테르를 카르복실산으로 변환시키는 반응(Figure 3-A)

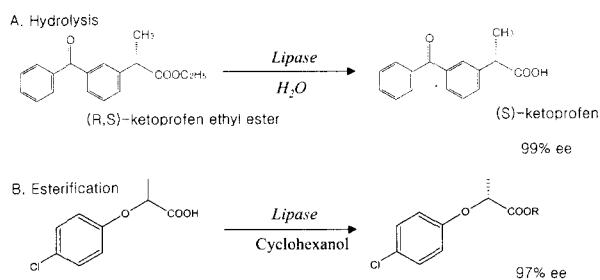


Figure 4. Resolution of racemic Ketoprofen using hydrolysis and esterification

이다. 리파제 특유의 계면활성(Interfacial activation)능력에 의해 산업적으로 많은 응용이 이루어졌다. 대부분의 수화반응은 수상계에서 행하여지는데 그 이유는 유기상 반응보다 속도면에서 빠르기 때문이다. 가장 대표적인 응용예로서 Figure 4-A에 보인 바와 같이 *Candida rugosa* lipase를 이용하여 비스테로이드 소염진통제인 Ketoprofen ethyl ester의 수화반응을 통한 (S)-Ketoprofen 생산 연구를 들 수 있다(25).

에스테르화반응 (Esterification)

산(지방산)과 알코올사이의 에스테르화반응(Figure 3-B)을 통하여 에스터 결합을 가진 glyceride를 생성하는 반응으로서 수화반응의 역반응에 해당되며 주로 유기상에서 행해진다. 대표적인 예로서 Figure 4-B에서 볼 수 있는 바와 같이 *Candida rugosa* lipase를 이용한 2-(p-chlorophenoxy)-propionic ester와 cyclohexanol사이의 에스테르화반응이 있다(16).

상호에스테르화반응 (Interesterification)

상호에스테르교환반응은 에스테르와 알코올, 카르복실산, 에스테르 등 다른 관능기를 가진 물질과의 상호교환반응으로 원하는 키랄성 알코올이나 산, 에스테르를 얻는 데 주로 이용된다. 이를 세분하여 알코올과 반응하면 가알코올반응(alcoholysis; Figure 3-C), 카르복실산과 반응하면 가산반응(acidolysis; Figure 3-D), 에스테르와 반응하면 에스테르교환반응(transesterification; Figure 3-E)이라 정의할 수 있다(48). 에스테르교환반응은 두가지 종류의 에스테르를 반응시켜 원하는 치환체를 갖는 에스테르를 합성하는 방법으로 두가지 에스테르를 기질로 사용하기 때문에 double-sieving효과를 발휘함으로써 광학선택성면에서 뛰어난 장점을 지닌다(57).

광학분할반응의 응용에

비스테로이드계 소염진통제

앞 절에서도 살펴본 바와 같이 세계 Top 10에 드는 Naproxen과 Ibuprofen은 대표적인 비스테로이드계 소염진통제(non-steroidal anti-inflammatory drugs)로서 생체내 프로스타글란딘(prostaglandin) 촉매의 활성을 감소시킴으로서 통증을 완화시키는 작용을 한다(21). 이와 같은 약품의 공통점은 한 개의 키랄 중심을 가지고 있으며 키랄 중심의 한쪽에 벤젠고리가 다른 한편에는 메틸기 및 카르복실기가 있는 것이 특징이다. 그 예로 Naproxen과 Ibuprofen이외에도 Ketoprofen, Flurbiprofen, Suprofen 등이 있다. Naproxen 및 Ibuprofen의 약리작용은 대부분 (S)-Naproxen에 의한 것으로 (R)-Naproxen은 약리활성이 없는

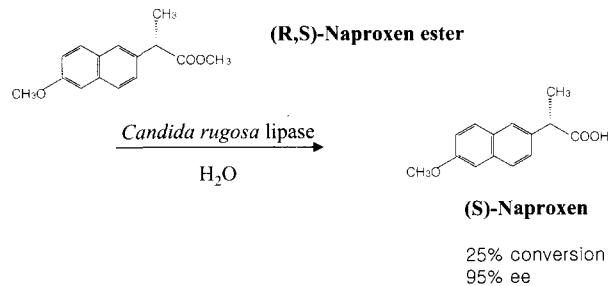


Figure 5. Resolution of racemic Naproxen by *Candida rugosa* lipase

것으로 알려져 있다(20). 따라서, 순수한 거울상 이성질체의 프로펜 의약품을 얻기 위한 여러 방법들이 연구되었다. Naproxen의 주요 생산사는 Syntex사로서 diastereomeric salt (N-alkylglucamine)를 이용한 결정법을 이용하여 생산하고 있으며, 회수된 (R)-Naproxen은 라세미화를 시킴으로써 수율을 높이는 방법을 채택하고 있다. Zambon사의 chiral auxiliary를 이용한 방법 역시 개발되었으나 Syntex사의 방법보다 복잡한 것으로 알려져 있다. 리파제 및 에스테라제 효소를 이용한 라세미체 Naproxen ester의 수화반응에 의한 광학분할방법에 관하여도 많은 연구결과가 발표되었으며 (Figure 5), 높은 수율 및 광학선택성을 보이는 결과를 보고하였다(17,20). (S)-Ibuprofen을 생산하기 위한 두가지 방법 (Hoechst-Cleanese법과 Ethyl법)이 고안되었고, 시안화 Ibuprofen을 기질로 하여 *Acinetobacter* sp. nitrilase를 이용한 방법 및 Trifluoroethyl 에스테르를 기질로 하여 *Candida rugosa* lipase를 이용한 방법 등이 연구되었다(23). (S)-Ketoprofen의 경우 Chiroscience에서 개발하여 판매 단계에 있으며, Sepracor에서는 (S)-와 (R)-을 분리하여 (S)-형태는 의약품, (R)-형태는 치약첨가제로 사용하고자 하는 연구를 추진하고 있다. 효소자체의 광학특이성 능력을 개선시킴으로써 리파제의 광학선택성을 증가시키는 방법으로서 Celite와 같은 담체에 흡착을 시키는 방법(48), 계면활성제를 이용하는 방법(59), 유기용매에 의한 효소의 개량법(18,19,25) 등의 방법들이 연구되었는데, 특히 Kim (25) 등은 아세톤을 이용한 침전법을 통하여 광학분할능이 향상된 *Candida rugosa* lipase를 사용하여 (S)-Ketoprofen생산에 관한 연구를 보고하였다. 약 40%의 ee값을 보이는 리파제 (crude lipase)를 아세톤 처리 후 99%이상으로 향상시킬 수 있었고, 효소반응을 통해 순수한 (S)-Ketoprofen을 대량으로 생산·정제할 수 있음을 보고하였다.

고혈압치료제인 Captopril 합성

Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 저해제는 고혈압제제로서 널리 알려져 있고 현재 순수 이성질체로만 생산되어 판매되어지고 있다. Angiotensin I은 폐혈관의 내피세포와 혈관, 혈장에 존재하는 것으로 알려진 Angiotensin전환효소(ACE; kininase II)의 작용에 의해 amino acids 2개가 잘려지고 Angiotensin II로 전환된다. Angiotensin II는 강력한 혈관수축작용을 가지고 있으며 aldosterone 분비를 증가시킴으로써 염분과 수분의 저류를 유발하여 혈압이 상승하게 되므로 Angiotensin II receptor의 차단은 혈압을 감소시키는 역할을 한다. 따라서 ACE 저해제는 Angiotensin II의 생성을 방해함으로써 고혈압을 치료하는 의약품이다. 가장 대표적인 ACE

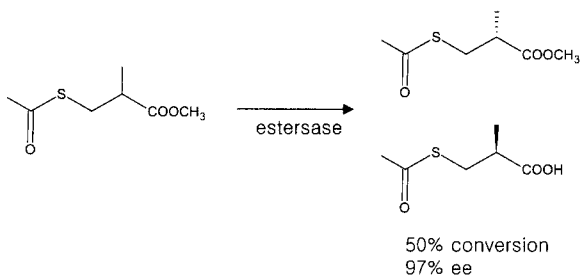


Figure 6. Kinetic resolution of Captopril intermediate by esterase (Mitsubishi)

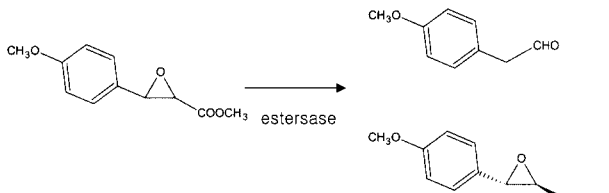


Figure 7. Kinetic resolution of Diltiazem intermediate by lipase (DSM-Andeno)

저해제로서 Enalapril과 Captopril이 있다. 이들 의약품은 울혈성 심부전 (Congestive Heart Failure) 환자의 생존율을 증가시키고, 좌심실 부전으로 인한 심부전환자의 유병률과 사망률을 감소시키는 역할을 한다.

Captopril은 두개의 키랄 중심을 갖고 building block으로 (R)- β -mercaptoisobutyric acid를 이용하게 된다. Mitsubishi사에 의해 개발된 방법(47)은 Porcine pancreas lipase 또는 에스테라제를 사용하여 라세미체 methyl ester를 카복실화시켜 (R)- β -mercaptoisobutyric acid만을 분리하는 방법으로 매우 높은 수율(50%) 및 광학선택성 (ee > 97%, E > 100)을 보임으로써 기존의 결정법을 이용한 DSM-Andeno방법과 경쟁할 수 있을 것으로 보고 있다 (Figure 6).

협심증 및 고혈압치료제인 Diltiazem 합성

칼슘채널 차단제인 Diltiazem은 협심증 및 고혈압의 치료에 이용되는 약품으로서 Captopril과 마찬가지로 10대 의약품중 하나이다. Diltiazem의 개발은 Tanabe사에서 성공하였고 합성법은 diastereomeric salt crystallization 방법을 사용하였다. 그 후 효소반응을 이용한 공정이 포함되어 있는 공정으로 개선되었으며, 대표적인 예(26,27)가 리파제를 사용하여 p-methoxy phenylglycidic acid methyl ester를 합성하고, 다시 리파제를 이용하여 가수분해반응을 행함으로써 매우 중요한 Diltiazem 중간체인 glycidyl 유도체를 얻는 DSM-Andeno방법이 있다 (Figure 7).

항암치료제인 Taxol의 중간체 합성

Taxol (Bristol-Myers사 개발)은 주목나무에서 추출한 항암제로서 매우 복잡하지만 고기능성을 갖는 알칼로이드로 자궁암, 유방암, 폐암 중 일부, AIDS 관련 암 등의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Taxol의 화학합성법은 1994년에 이르러서 Holton과 Nicolaou에 의해 개발되었다. Johnson 등은 재조합 변형 *Candida antarctica* lipase B (SP-435)를 아크릴 합성수지에 흡착하여 고정화 효소로 만든 후, 에스테르

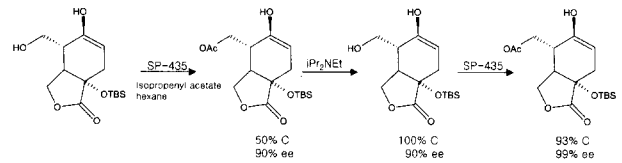


Figure 8. Kinetic resolution of (-)-Taxol intermediate by lipase (35)

의 수화반응 및 유기상 합성반응에 이용하여 Taxol 중간체를 광학분할하는 데 성공하였다(10,35). Acylating agent로는 isopropenyl acetate를 사용하였고, 효소반응결과 90%의 ee값을 갖는 중간체를 얻을 수 있었다 (Figure 8). 효소의 경우 입체장애의 영향이 크기 때문에 중간체인 pentyl alcohol을 가진 경우 낮은 광학선택성 및 수율을 보이는 경향이 있어 이를 해결하기 위하여 메탄올에서 탈아세틸 반응후 다시 효소반응을 행하여 최종적으로 47%의 수율로 99%이상의 ee값을 갖는 중간체를 생산할 수 있음을 보고하였다.

향후 전망

80년대 말부터 90년대는 유기상 효소반응에 대한 연구가 주류를 이루었고, 효소에 의한 광학분할반응은 기존의 리파제 및 에스테라제의 고유성질을 응용한 연구가 대부분이었다. 아직까지 효소의 활성, 안정화 문제는 산업화의 큰 걸림돌이 되고 있고, 효소-기질간의 상호작용에 대한 이해도 미미한 형편이다. 그럼에도 불구하고 많은 연구자들이 기대하고 있는 효소의 장점은 화학촉매와는 다른 높은 선택성에 있다고 볼 수 있다. 의약품 산업의 경쟁력은 고부가가치의 고도의 기술요구성 공정개발을 통해서만 이루어지게 되며 특히 광학적으로 순수한 광학활성물질의 제조기술 (chirotechnology)은 신약개발과 비전력 만큼 전세계 선진국들이 연구경쟁을 하는 분야로서 자리를 잡았으며, 의약품 제조에 있어서 꼭 보유하여야 할 기초기반기술로 점차 변모하고 있다. 현재 화학합성을 이용한 비대칭 합성기술에 있어 많은 성과가 이루어지고 있지만, 향후 단백질 공학기술의 진보에 의해 기존의 화학공정은 보다 효과적인 효소공정으로 대체될 것으로 예상되며 효소-기질간 상호작용연구, 효소 생산기술, 효소 고정화기술, 효소 반응기 개발 등을 포함하는 전반적인 효소공학기술의 정착에 의해 효소 및 화학촉매공정이 조화를 이루는 혼합공정이 일반화 되리라 예상된다.

요약

광학적으로 순수한 의약품의 생산이 중요해짐에 따라 광학분할기술은 향후 급속도로 발전할 것으로 예상되고 있으며 향후 신약개발 만큼이나 중요한 분야가 될 것으로 예상된다. 특히 생명공학의 급속한 발전으로 효소를 이용한 광학분할기술은 기존의 화학합성공정을 빠른 속도로 대체할 것으로 예상된다. 따라서 본 총설은 효소에 의한 광학분할의 중요성과 특성, 최근 연구동향, 그리고 산업적 응용 예에 초점을 맞추어 기술하였다.

REFERENCES

- Hart, H. (1995), Organic Chemistry, 9th ed., Houghton

- Mifflin, Boston.
- Stinson, S. C. (1999), Chiral drug interactions, *C&EN*, **11**, 101-120.
 - Stinson, S. C. (1998), Counting on chiral drugs, *C&EN*, **21**, 83-104
 - Stinson, S. C. (1997), FDA may confer new status on enantiomers, *C&EN*, **2**, 28-29.
 - McCoy M. (1999), Biocatalysis grows for drug synthesis, *C&EN*, **4**, 10-14.
 - Sheldon, R. A. (1993), *Chirotechnology*, Marcel Dekker, New York.
 - Ghosez, L. (1995), Strategies for asymmetric synthesis. What is the role of heterogeneous catalysis?, In *Chiral reactions in heterogeneous catalysis*, p. 21, Plenum Press, New York.
 - Sheldon, R. A. (1996), Chirotechnology: Designing economic chiral syntheses. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **67**, 1-14.
 - Faber K. and M. C. R. Franssen (1993), Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations, *TIBTECH*, **11**, 461-470.
 - Roberts, S. M. (1999), Biocatalysts for fine chemicals synthesis, John Wiley & Sons, Chichester.
 - Faber, K. (1993), Selectivity-enhancement of hydrolase reactions, *Biocatalysis*, **8**, 91-132
 - Benjamin S. and A. Pandey (1998), *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology, *Yeast*, **14**, 1069-1087.
 - Verger, R. (1997), Interfacial activation of lipases: facts and artifacts, *TIBTECH*, **15**, 32-38.
 - John, V. T. and G. Abraham (1991), Lipase catalysis and its application, In *Biocatalysts for industry*, J. S. Dordick ed., p193, Plenum Press, New York.
 - McKay, A. M. (1993), Microbial carboxylic ester hydrolase in food biotechnology, *Lett. Appl. Microb.*, **16**, 1-6.
 - Chen, C. S. and C. J. Sih (1989), General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents : The use of lipases, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 695-707.
 - Battistel, E., D. Bianchi, P. Cesti, and C. Pina (1991), Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 659-664.
 - Chamorro, S., J. M. Sanchez-Montero, A. R. Alcantara, J. V. Sinisterra (1998), Treatment of *Candida rugosa* lipase with short-chain polar organic solvents enhances its hydrolytic and synthetic activities. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 499-505.
 - Colton, I. J., S. N. Ahmed, and R. J. Kazlauskas (1995), A 2-propanol treatment increases the enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward esters of chiral carboxylic acids. *J. Org. Chem.*, **60**, 212-217.
 - Giordano, C. and G. Castaldi (1990), A Stereoconvergent strategy for the synthesis of enantiomerically pure (R)-(-) and (S)-(+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)-propionic acid (naproxen). *Tetrahedron*, **45**, 4243-4252.
 - Hayball, P. J. (1996) Chirality and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*, **52**, 47-58.
 - Mauleon, D., R. Artigas, M. L. Garcia, and G. Carganico (1996), Preclinical and clinical development of dexketoprofen. *Drugs*, **52**, 24-46.
 - McConville, F. X., J. L. Lopez, and S. A. Wald (1990), Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor, In *Biocatalysis*, D. A. Abramowicz ed., p167, Von Nostrand Reinhold, New York.
 - Kim, M. G., S. J. Choi, W. A. Choi, C. H. Kim, and B. H. Chung (1999), *Candida rugosa* lipase-catalyzed production of optically pure S-(+)-ketoprofen. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 225-229
 - Kim, M. G., E. G. Lee, and B. H. Chung (2000), Improved enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase towards ketoprofen ethyl ester by a simple two-step treatment, *Process Biochem.*, **35**, 977-982.
 - Braun, B., E. Klein, and J. L. Lopez (1996), Immobilization of *Candida rugosa* lipase to nylon fibers using its carbohydrate groups as the chemical link, *Biotechnol. & Bioeng.*, **51**
 - Desai, S. B., N. P. Argade, and K. N. Ganesh (1996), (+/-)-Threo-ethyl 3-(4-methoxyphenyl)-2,3-diacetoxypropionate leading to chiral intermediates of (+)-diltiazem, *J. Organic Chem.*, **61**
 - Wunsche, K., U. Schwaneberg, U. T. Bornscheuer, and H. Meyer (1996), Chemoenzymatic route to beta-blockers via 3-hydroxy esters, *Tetrahedron: Asymmetry*, **7**
 - Mohapatra, S. C., J. T. Hsu (1999), Optimizing lipase activity, enantioselectivity, and stability with medium engineering and immobilization for beta-blocker synthesis, *Biotechnol. & Bioeng.*, **64**, 213-220.
 - Bodalo, A., J. L. Gomez, E. Gomez, J. Bastida, G. Leon, M. F. Maximo, A. M. Hidalgo, and M. C. Montiel (1999), Kinetic calculations in the enzymatic resolution of DL-amino acids, *Enzyme. Microb. Technol.*, **24**, 381-387.
 - Akita, H., I. Umezawa, and H. Matsukura (1997), Enzymatic hydrolysis in organic solvents for kinetic resolution of water-insoluble α -acyloxy esters with immobilized lipases, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 272-278.
 - Adam, W., P. Groer, and C. R. Saha-Moller (1997), Enzymatic preparation of optically active α -methylene β -lactones by lipase-catalyzed kinetic resolution through asymmetric transesterification, *Tetrahedron:Asymmetry*, **8**, 833-836.
 - Adam, W., P. Groer, and C. R. Saha-Moller (2000), Synthesis of optically active α -methylene γ -lactones through lipase-catalyzed kinetic resolution, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 2239-2243.
 - Overmeyer, A., S. Schrader-Lippelt, V. Kasche, and G. Brunner (1999), Lipase-catalyzed kinetic resolution of racemates at temperatures from 40°C to 160°C in supercritical CO₂, *Biotechnol. Lett.*, **21**, 65-69.
 - Johnson, C. R. and Y. Xu (1995), Enzymatic resolution of a key stereochemical intermediate for the synthesis of (-)-Taxol, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3291-3294.
 - Lin, C. N. and S. W. Tsai (2000), Dynamic kinetic resolution of suprofen thioester via coupled triethylamine and lipase catalysis, *Biotechnol. Bioeng.*, **69**, 31-38.
 - Konigsberger, K., K. Prasad, and O. Repic (1999), The synthesis of (R)- and (S)- α -trifluoromethyl- α -hydroxycarboxylic acids via enzymatic resolutions, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 679-687.
 - Franssen, M. C. R., E. L. V. Goetheer, H. Jonejan, and A. Groot (1998), Enzymatic alcoholysis of alkoxyethyl alkanoylates: a possible approach for the kinetic resolution of tertiary alcohols, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 8345-8348.
 - Nair, M. S. and S. Joly (2000), Lipase catalyzed kinetic resolution of aryl β -hydroxy ketones, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 2049-2052.

40. Haughton, L., J. M. J. Williams, and J. A. Zimmermann (2000), Enzymatic kinetic resolution of pantolacton: relevance to chiral auxiliary chemistry, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 1697-1701.
41. Ghorpade, S. R., K. B. Bastawade, D. V. Gokhale, P. D. Shinde, V. A. Mahajan, U. R. Kalkote, and T. Ravindranathan (1999), Enzymatic kinetic resolution studies of racemic 4-hydroxycyclopent-2-en-1-one using Lipozyme IM, *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 4115-4122.
42. Doussot, J., A. Guy, R. Garreau, A. Falguieres, and C. Ferroud (2000), Efficient kinetic resolution of racemic 3-nitro-cyclopent(or hex)-2-en-1-yl acetates, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 2259-2262.
43. Koh, J. H., H. M. Jung, M. J. Kim, and J. W. Park (1999), Enzymatic resolution of secondary alcohols coupled with ruthenium-catalyzed racemization without hydrogen mediator, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 6281-6284.
44. Laval, G., G. Cardillo, H. Monti, A. Tolomelli, G. Audran, and J. M. Galano (2000), Lipase-mediated kinetic resolution of allylic(hydroxymethyl)methylenecyclopentane building blocks, *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 1289-1294.
45. Adam, W., L. Blancafort and C. R. Saha-Moller (1997), Kinetic resolution of racemic halohydrins, precursors of optically active di and trialkyl-substituted epoxides, with lipase from *Pseudomonas* sp., *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 3189-3192.
46. Vanttinen, E. and L. T. Kanerva (1997), Optimized double kinetic resolution for the preparation of (S)-solketal, *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 923-933.
47. Korea Drug Research Association (1998), R&D Report for production of chiral drugs and their intermediates.
48. Malcata, F. X., H. R. Reyes, H. S. Garcia, C. G. Hill, and C. H. Amundson (1992), Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalysed by Immobilized Lipases, *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 426-446.
49. Katchalski-Katzir, E. (1993), Immobilized enzymes-learning from past successes and failures, *TIBTECH*, **11**, 471-478.
50. Tischer, W. and V. Kasche (1999), Immobilized enzymes: crystals or carriers?, *TIBTECH*, **17**, 326-335.
51. Jaeger K. E., M. T. Reetz (1998), Microbial lipase form versatile tools for biotechnology, *TIBTECH*, **16**, 396-403
52. Margolin A. L (1996), Novel crysalline catalysts, *TIBTECH*, **14**, 223-230.
53. Reetz M. T., A. Zonta, J. Simpelkamp (1996), Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 527-534.
54. Okahata Y, and T. Mori (1997), Lipid-coated enzymes as efficient catalysts in organic media, *TIBTECH*, **15**, 50-54
55. Ward, R. S. (1995), Dynamic kinetic resolution, *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 1475-1490.
56. Inagaki, M., J. Hiratake, T. Nishioka, and J. Oda (1991), *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9360
57. Berglund P. and K. Hult (2000), Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases, In *Stereoselective biocatalysis*, R. M. Patel ed., p633, Marcel Dekker, New York.
58. Persson, B. A., F. F. Huerta, and J. E. Backvall (1999), Dynamic kinetic resolution of secondary diols via coupled ruthenium and enzyme catalysis, *J. Org. Chem.*, **64**, 5237-5240.
59. Bornemann S, D. H. G. Crout, H. Dalton, and D. W. Hutchinson, (1994), The effects of surfactants on lipase-catalysed hydrolysis of esters: activities and stereoselectivity. *Biocatalysis*. **11**, 191-221.