



生物催化不对称还原制备氟代手性醇*

乌雅罕 吴晶晶** 吴范宏**

(上海应用技术大学化学与环境工程学院, 上海绿色氟代制药工程技术研究中心, 上海 201418)

摘要 由于氟原子的特殊性质, 化合物中引入氟原子可显著改变其物理化学性质。因此, 氟原子在药物中的应用越来越广。此外, 80% 药物分子结构属于手性分子。其中, 氟代手性醇常见于手性药物结构中, 该类结构的合成方法研究具有重要的意义。不对称还原含氟酮是合成此结构的常见方法。与化学还原方法相比, 生物催化还原具有对映选择性强、产率高和易于分离纯化等优点。生物催化, 特别是酶催化还原含氟酮类化合物成为手性药物合成领域的研究热点。本文从纯化酶催化和全细胞催化两个方面, 综述了近年来含氟酮生物催化还原合成氟代手性醇的研究进展, 并分析总结了氟代对酮生物催化还原的影响, 最后对生物催化还原法未来的发展进行了展望。

关键词 氟代手性醇, 含氟酮, 手性药物, 生物催化, 不对称还原

中图分类号 Q554, O621, R914

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0322

多种药物及药物活性成分中间体中含有氟代手性醇结构, 例如化疗止吐药物阿瑞吡坦^[1-2]、新型降血脂药物依替米贝^[3-5]、治疗非小细胞肺癌药物克唑替尼 (Crizotinib)^[6-7]、新型 DP1 拮抗剂^[8] 和抗凝剂替格瑞洛^[9] 等药物前体结构中都有氟代手性醇片段 (表1)。因此, 氟代手性醇类化合物的合成在手性药物合成中具有很高的应用价值。

酮的不对称还原制备光学活性醇类化合物的一类基本反应, 通过不对称催化还原前手性氟代酮类化合物是合成氟代手性醇类化合物的高效方法之一^[10], 近年来取得显著进展。根据催化剂的种类不同, 可以将不对称还原方法分为化学催化还原法和生物催化还原法。与化学催化还原法相比, 生物催化还原法, 特别是酶催化法具有立体选择性高、副反应少、反应条件温和、无衍生产物、无需复杂的分离纯化、减少资源消耗及废物的产生、节能环保

等优点^[11], 是合成氟代手性醇的理想方法^[12]。生物催化还原法目前已广泛应用于药物合成领域, 例如抗癌药物克唑替尼^[13]、降血脂药物依替米贝^[14]、白三烯受体拮抗剂孟鲁司特钠^[15]、降脂药物瑞舒伐他汀^[16] 等药物的关键手性中间体都可通过生物催化还原法高效获得。本文对近几年来生物催化还原氟代酮类化合物的研究工作, 包括纯化酶催化法和全细胞催化法进行梳理和总结, 旨在为高效、高立体选择性合成手性氟代醇类药物的研究提供新思路和新方法。

* 国家自然科学基金 (21672151) 资助项目。

** 通讯联系人。

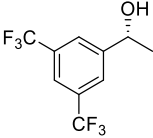
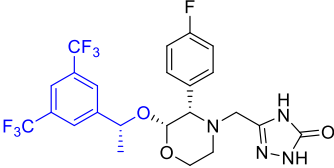
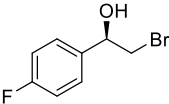
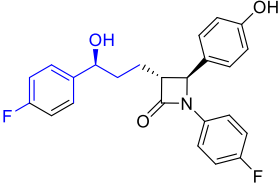
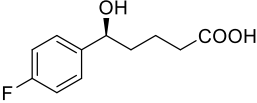
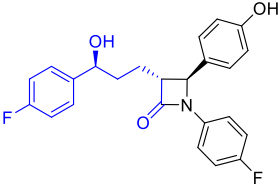
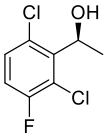
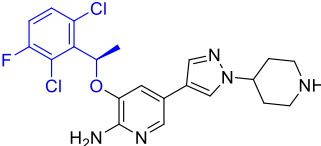
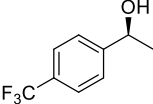
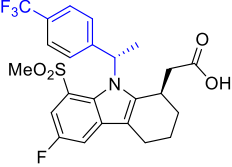
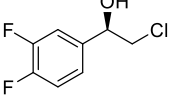
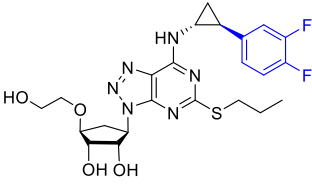
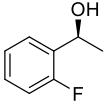
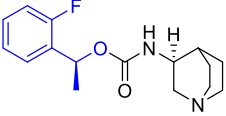
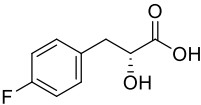
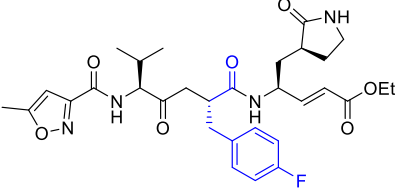
吴范宏 Tel: 021-60877220, E-mail: wfh@sit.edu.cn

吴晶晶 Tel: 021-60877220, E-mail: wujj@sit.edu.cn

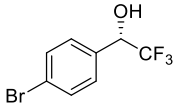
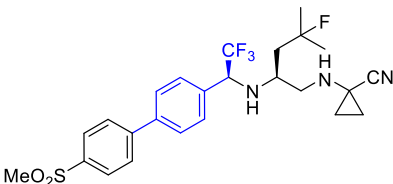
收稿日期: 2022-07-12, 接受日期: 2022-09-08

Table 1 Application of fluorine-containing chiral alcohols in pharmaceutical synthesis

表1 氟代手性醇在药物合成中的应用

中间体	药物结构	药物	作用
		阿瑞吡坦 (Aprepitant)	抗恶心想吐 ^[1-2]
		依替米贝 (Ezetimibe)	降血脂 ^[3-4]
		依替米贝 (Ezetimibe)	降血脂 ^[5]
		克唑替尼 (Crizotinib)	抗癌 ^[6-7]
		DP1拮抗剂 ^[8]	
		替格瑞洛 (Ticagrelor)	抗凝剂 ^[9]
		烟碱乙酰胆碱受体 激动剂JN403 ^[17]	
		鼻病毒蛋白酶抑制剂AG7088 ^[18]	

续表1

中间体	药物结构	药物	作用
		奥达那卡替布 (Odanacatib)	治疗骨质疏松症 ^[19]

1 纯化酶催化法

纯化酶催化法是一种使用分离纯化或过表达的酶催化还原底物的方法。经过分离纯化的纯化酶催化的还原反应对映选择性高,可耐受高底物浓度,且体系干净,易于分离产物^[20-21]。

1.1 脱氢酶催化不对称还原氟化酮

短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)中的乙醇脱氢酶LbADH曾被用于还原各类前手性酮^[22]。LbADH的分子质量为105 ku,由4个相同的亚基组成,属于短链脱氢酶。2013年,Borzecka等^[23]研究了LbADH催化还原各类氟代芳香酮的活性,得到了一系列具有高光学纯度的(*S*)-氟化醇(表2,条目1)。在此基础上,Rodríguez等^[24]进一步研究发现,单卤代化合物活性最强,三卤代化合物活性最低(表2,条目2)。但是低(酶)活性并不一定意味着低转化率, α 取代的单氟,偕二氟及三氟苯乙酮均有高转化率(转化率(*con.*)>90%)及高对映选择性(对映体过量(*e.e.*)值>99%)。

最早,Noling等^[25]发现,丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)的乙醇脱氢酶(CaADH)可不对称催化还原羰基。2015年,Panigrahi等^[26]利用CaADH对映选择性地催化还原了 β -酮- α,α -二氟烷基膦酸盐(表2,条目3),该化合物是在化学生物学和药物化学中具有相当大价值的磷酸酶惰性磷酸盐替代物^[27]。结果显示,CaADH表现出良好的产率(72%~93%)及较高的对映选择性(*e.e.*值93%~99%)。且通过葡萄糖脱氢酶循环再生辅酶NADPH。2020年,Kudalkar等^[28]又发现了CaADH还可以催化还原另一类含氟化合物,即对取代芳基三氟甲基酮(表2,条目4),其中 α,α,α -三氟苯乙酮在CaADH催化下还原得到(*S*)-醇,其*e.e.*值为99%,产率为95%。

此外,赤红球菌(*Rhodococcus ruber*)也具有催化还原酮的活性^[29]。其中具有该活性的酶为乙醇脱氢酶ADH-A,该酶是由38 ku的亚基组成的同

型二聚体,与来源于红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)的乙醇脱氢酶ReADH显示出相似的亚单位大小(38 ku),并且含有中链脱氢酶所述的紧密结合的锌^[30]。金属在稳定酶的三级结构以抵抗热、极端pH和变性方面起着重要作用。2013年,Borzecka等^[23]利用ADH-A催化还原得到了各类光学纯(*R*)-氟化醇(表2,条目5)。通过该方法得到的产物(*R*)-2-溴-1-(4-氟苯基)乙醇是胆固醇吸收抑制剂(CAI)的前体^[31]。随后,Kędziora等^[32]进一步研究了ADH-A对 α -氯- α -氟代苯乙酮的催化活性(表2,条目6)。结果显示,ADH-A提供了良好的对映体选择性,但非对映选择性较低。非对称催化还原得到二卤代醇是许多有价值化合物的化学合成前体。2021年,Liu等^[33]提出利用亲水性聚多巴胺(PDA)壳包裹住源于红色红球菌的乙醇脱氢酶ADH及疏水性树枝状有机硅纳米颗粒(DON)获得两亲性核壳催化剂DON@ADH@PDA。用DON@ADH@PDA还原对氟苯乙酮和对三氟甲基苯乙酮得到其*S*型醇,具有良好的产率(86%~95%)和优异的对映选择性(*e.e.*值为99%)(表2,条目7)。内疏水核提高了选择性和催化活性,外亲水壳提高了稳定性和分散性。此外DON@ADH@PDA可以通过离心很容易地回收,5次循环后其催化产率仍然达到70%左右,有效提高了生物酶的利用率,降低成本。

(*S*)-3,5-双三氟甲基苯乙醇已被纳入目前正在临床评估的许多拮抗剂中。早在2006年,Pollard等^[34]就曾利用ReADH催化还原3,5-双三氟甲基苯乙酮,得到(*S*)-3,5-双三氟甲基苯乙醇(表2,条目8),转化率>98%和*e.e.*值>99.9%。ReADH的分子质量为160 ku,是由4个相同亚基组成的中链脱氢酶。该方法对辅酶再生系统进行了优化,早期以甲酸脱氢酶为辅酶再生酶^[35],而葡萄糖脱氢酶(GDH)的热稳定性更好、活性更强,有效提高了底物浓度及时空产率。

在异丙醇作为氢供体的情况下,赖氏菌

(*Leifsonia* sp.) 的乙醇脱氢酶 LsADH 可对酮进行不对称还原^[36]。LsADH 的分子质量为 100 ku, 由 4 个相同的亚基组成。氨基酸序列与已知的短链醇脱氢酶具有 30%~50% 的同源性。LsADH 序列和 LbADH 近似, 在 37 位具有天冬氨酸残基, 该残基在决定脱氢酶对 NADH 的偏好中起着关键作用, 因此 LsADH 是 NADH 依赖型脱氢酶。2012 年, Itoh 等^[37]报道了 LsADH 在异丙醇 (IPA) - 水介质中进行对映选择性生物催化还原氟化酮的例子。使用异丙醇辅酶再生系统, 成本低、底物范围广、对映体选择性高。LsADH 催化还原 α,α,α -三氟苯乙酮得到相应的 *S* 型醇, 其 *e.e.* 值为 99%, 转化率为 100% (表 2, 条目 9)。这种光学纯度和转化率水平足以满足工业应用。

早期, Machielsen 等^[38]在超高温古生菌 (*hyperthermophilic archaeon*) 强烈炽热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 中发现了一种新的 NADH 依赖型乙醇脱氢酶 PfADH。随后, Zhu 等^[39]进一步探索了 PfADH 催化还原氟代酮的对映选择性 (表 2, 条目 10), 该体系利用葡萄糖脱氢酶和葡萄糖实现辅酶再生。结果显示, PfADH 催化还原各类氟取代芳香酮均具有极好的对映选择性 (*e.e.* 值 > 99%)。在此基础上, Zhu 等^[40]以更加经济的异丙醇作为氢供体实现辅酶 NADH 再生。通过该方法催化还原 2-氯-4'-氟代苯乙酮和 2-氯-2',4'-二氟苯乙酮得到了其相应的 (*R*)-醇 (表 2, 条目 11), 该方法具有高产率 (89%~92%) 及高立体选择性 (*e.e.* 值为 98%~99%)。不对称还原得到的氯醇是合成具有医药和农业用途的生物活性化合物的重要中间体^[41-45]。

Pennacchio 等^[46]曾在极端嗜热耐盐的嗜热栖热菌 (*Thermus thermophilus*) HB27 中发现了一种新型乙醇脱氢酶 TtADH。TtADH 是一种四聚体酶, 由 256 个氨基酸组成, 属于短链脱氢酶。该生物酶具有显著的嗜热性和热稳定性, 且对常见有机溶剂有良好的耐受性。利用 TtADH 催化还原 2,2,2-三氟苯乙酮得到高光学纯度的 (*R*)-2,2,2-三氟苯乙醇 (*e.e.* 值为 93%) (表 2, 条目 12)。辅酶 NADH 可以通过嗜热杆菌 ADH (BsADH) 高效原再生。

Lavandera 等^[47]从矢野鞘氨醇菌 (*Sphingobium yanoikuyae*) 中分离出一种 NADPH 依赖型短链脱氢酶 SyADH, 也可用来还原一些常见羰基化合物 (丙酮、乙醛、甲基异丁基酮 (methyl isobutyl ketone, MIBK)、丙酮酸)。随后,

Kędziora 等^[32]发现 SyADH 催化还原 α -氯- α -氟代苯乙酮时, 相较于其他乙醇脱氢酶 (ADH-A、RasADH、LbADH) 可提供最高的 *de* 值 (45%), 但是 *e.e.* 值较低 (59%) (表 2, 条目 13)。 α -氯- α -氟代醇在有机合成中有许多应用^[48]。

2019 年 González-Martínez 等^[49]发现, Ras-ADH 可催化还原一系列 1-芳基-2,2,2-三氟乙酮, 以高转化率和高选择性获得 (*R*)-醇。Ras-ADH 为来源于罗尔斯通氏菌属 (*Ralstonia* sp.) DSM 6428 的 NADPH 依赖型乙醇脱氢酶^[50]。该体系通过葡萄糖脱氢酶实现辅酶 NADPH 的再生。通过该方法可还原得到组织蛋白酶 K 抑制剂奥达那卡替布 (Odanacatib (MK-0822)) 的重要片段 1-(4-溴苯基)-2,2,2-三氟乙醇 (表 2, 条目 14)。

如上述所示, 在药物合成领域中, 乙醇脱氢酶的应用十分广泛, 并已应用到许多药物关键中间体的催化还原制备过程。例如, 克唑替尼是一种常见的抗癌药物^[51], 合成该药物时最关键的一步为不对称还原制备 (*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)。用常规化学方法还原时, 需要利用硼氢化钠还原后再进行手性拆分, 过程复杂、收率较低 (32%)^[52]。为进一步提高收率、简化反应过程, 郭红颜^[53]提出了利用乙醇脱氢酶偶联甲酸脱氢酶催化还原制备 (*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基) 乙醇的方法 (表 2, 条目 15)。通过该催化体系有效地将收率提高至 50%, 且产物纯度为 100%。体系中的甲酸脱氢酶用于辅酶 NADH 的再生。在此基础上, 邵雷课题组^[54]进一步优化了辅酶再生系统, 以葡萄糖脱氢酶为辅酶再生酶。用该方法催化还原 2,6-二氯-3-氟苯乙酮, 得到高转化率 (93.75%)、高光学纯度 (*e.e.* 值为 99%) 的 (*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基) (表 2, 条目 16)。2019 年, 林涛等^[55]发明了一种新的分离纯化方法, 通过此方法可有效地从酶转化液中分离目标产物, 具有高收率及高除菌率, 整个提取过程中只用到水作为溶剂, 并且使用了更加廉价易得的异丙醇作为氢供体再生辅酶, 使反应更加经济。还原 1-(2,6-二氯-3-氟苯基) 乙酮, 得到高纯度 (99% 以上) 的 (*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基) (表 2, 条目 17)。

大多数生物酶具有不耐高温的缺点, 为了寻找适用于极端条件的乙醇脱氢酶, Friest 等^[56]对能够承受高温的超嗜热古菌展开了研究, 并从中分离出了 NADH 依赖型乙醇脱氢酶 SsADH10。该酶的最佳反应温度为 80°C, 可催化还原氟比洛芬醛得到

相应S型醇(表2, 条目18), 具有高对映选择性(*e.e.* 值97%), 但是收率一般(70%)。该体系以乙醇作为助溶剂及辅酶再生的氢供体。反应完成后, 冷却至室温可使产物沉淀并通过过滤收集。回收的SsADH10可以循环利用(经历5次循环, *e.e.* 值仍为94%~96%)。

1.2 还原酶催化不对称还原氟化酮

研究发现, 芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) EU0013中的酮还原酶具有良好的立体选择性和高底物浓度耐受性^[57]。为进一步提高对映选择性, Ni等^[58]从菌株中分离出一种NADPH依赖型醛酮还原酶(YtbE), 该体系以葡萄糖脱氢酶为辅酶再生酶。YtbE属于醛酮还原酶(AKR)超家族, 其一级结构与其他AKR超家族的还原酶具有47%~34%的同源性。YtbE作为一种通用的还原酶, 对含氟酮类化合物也有良好的产率及光学选择性。其中, α,α,α -三氟苯乙酮被还原得到相应的R型醇, 其*e.e.* 值为99%, 产率为100%。4,4,4-三氟乙酰乙酸乙酯被还原为高光学纯度(*e.e.* 值为99%)的(R)-4,4,4-三氟-3-羟基丁酸酯(表2, 条目19), 该化合物为抗抑郁药物贝氟沙通的中间体。

与从土壤样本中进行耗时费力的传统筛选相比, 基因组挖掘是一种更有效、更有前途的方法。2011年, Wang等^[59]通过对羰基还原酶的基因组挖掘, 从天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中发现了一种NADH依赖型还原酶(ScCR)。以异丙醇作为NADH再生的氢供体, 该酶对含氟酮类化合物具有极高的对映选择性(*e.e.* 值>99%) (表2, 条目20)。ScCR可催化底物浓度高达600 g/L, 显示出非常高的底物耐受性和优异的立体选择性, 表明ScCR具有工业应用潜力。

2015年, Xu等^[60]发现了一种羰基还原酶, 即汉逊德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*)中的DhCR。DhCR属于SDR家族, 是由34 ku亚基组成的同型二聚体。此酶为具有足够活性且足够稳定的NADPH依赖型羰基还原酶, 用于还原三氟苯乙酮得到其S型醇, 产率为90%, *e.e.* 值大于99% (表2, 条目21)。使用葡萄糖及葡萄糖脱氢酶实现辅酶再生。还原酶DhCR在合成有价值的药用 α 卤代醇方面具有潜力。

之后, Contente等^[61]从非传统酵母毕赤酵母CBS 5766的基因组中鉴定出一种新的NADPH依赖性苯二酰还原酶(KRED1-Pglu)。该酶有效地将苯偶酰对映选择性还原为(S)-安息香。随后Contente

等^[62]发现, KRED1-Pglu催化还原2,2,2-三氟-1-苯基乙酮和2,2,2-三氟-1-(噻吩-2-基)乙酮均显示较高的转化率和对映选择性(表2, 条目22)。2021年Rabuffetti等^[63]发现KRED1 Pglu可用于选择性催化还原1,2-二酮衍生物。当酮的对位有一个氟原子时, 表现出高反应性, 产率高于97%, 两个羰基的反应性相似, 均具有高对映选择性(*e.e.* 值>98%) (表2, 条目23)。这使得KRED1-Pglu成为一种适合制备光学纯 α 羟基酮的催化剂。

2016年, 赵志强等^[64]介绍了一种用于合成(S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇的新酮还原酶KRED82(表2, 条目24), 此酶具有高对映选择性(*e.e.* 值>99.9%)且可催化底物浓度高达621 g/L。(S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇是合成克唑替尼(Crizotinib)的中间体。该工艺开创了酶法合成(S)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇的新途径, 具有非常高的应用价值。

2018年, 陈恬等^[65]开发了一种新型羰基还原酶, 可特异性还原2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)乙酮(CLK)得2-氯-1-(6-氟-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基)乙醇(CLA)。CLA是合成心血管药物盐酸奈必洛尔的前体。以异丙醇作为氢供体, 所有还原酶均为NADH依赖型, (R)-CLK在R-羰基还原酶的作用下, 得到(R,R)-CLA产物; 在S-还原酶的作用下, 得到(R,S)-CLA产物; (S)-CLK在(R)-羰基还原酶的作用下, 得到(S,R)-CLA产物; (S)-CLK在(S)-羰基还原酶的作用下, 得到(S,S)-CLA产物(表2, 条目25)。上述4种构型得到的产物CLA纯度 $\geq 98\%$, *e.e.* 值 $\geq 99\%$, 收率 $\geq 95\%$ 。该方法简单易操作, 避免了化学还原法所需的复杂分离过程, 适合工业化生产。

(R)-2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙醇(CFPL)是合成抗凝剂替格瑞洛的重要手性中间体, 替格瑞洛用于预防成人急性冠脉综合征动脉粥样硬化^[66]。2019年, 竺伟等^[67]首次报道了合成(R)-2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙醇的生物催化还原方法(表2, 条目26)。使用来自芳香新鞘氨醇菌的KRED突变体可以达到180 g/L的底物浓度, 但是反应时间过长。因此, 为了提高合成效率, 2022年, He等^[68]在副布尔霍尔德菌(*Paraburkholderia phymatum*) STM815中发现了一种新的NADH依赖型还原酶PpKR8。将PpKR8和葡萄糖脱氢酶在大肠杆菌中的共表达可催化还原高达300 g/L的2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙酮(CFPO)完全转化为(R)-CFPL,

e.e. 值大于 99.9% (表 2, 条目 27)。此外, 该方法的反应速率快, 辅酶用量低, 表明 PpKR8 介导的生物还原技术具有极好的工业潜力。

(*R*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇((*R*)-3,5-BTPE)是合成NK-1受体拮抗剂安普立坦、罗拉平坦和福萨平坦的关键手性中间体^[69]。2019年, Tang等^[70]开发了一种高效且经济的酶法合成(*R*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇的方法, 即利用 *Leifsonia* sp. S749 中的羰基还原酶 KR01 将 3,5-双(三氟甲基)苯乙酮(BTAP)转化为(*R*)-3,5-BTPE (表 2, 条目 28), 具有良好的活性和对映选择性。在最优反应条件下, KR01 可将 600 g/L 3,5-BTAP 生物还原为(*R*)-3,5-BTPE (*e.e.*>99.9%), 转化率为 98.3%, 产率为 59 g/L/h。此酶为 NADPH 依赖型羰基还原酶, 利用异丙醇再生辅酶 NADPH。此外, KR01 可在含有 90% 异丙醇的反应混合物中重复使用多达 7 次。这是迄今为止报道的羰基还原酶生物还原 3,5-BTAP 的最高底物负荷和生产率, 该方法是一种高效且经济的(*R*)-3,5-BTPE 生产工艺。

2020 年, Raynbird 等^[71]利用商用酮还原酶 KRED 催化还原了一系列用于合成药物活性成分的关键手性醇中间体, 以异丙醇作为共基质, 以实现辅酶 NADPH 的再生。其中酮还原酶将 2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙酮还原为相应(*S*)-醇(转化率 96%, *e.e.* 值>99.5%) (表 2, 条目 29); 3,5-双(三氟甲基)苯乙酮还原为相应(*R*)-醇(转化率 90%, *e.e.* 值>99.5%), 该化合物用于合成阿瑞吡坦。这有力地证明了商用 KRED 在用于合成手性氟代醇类药物时的潜在价值。

2 全细胞催化法

全细胞生物催化剂与纯化酶相比省去了酶的分离纯化步骤, 且无需添加额外的辅助因子, 因此操作过程简单、反应成本低^[72]。不仅如此, 许多微生物中的酶在细胞外容易失活, 仅在胞内有较强的活性, 直接全细胞催化可规避此类问题^[73]。

2.1 微生物细胞催化不对称还原氟化酮

近一个世纪以来, 人们一直在探索利用面包酵母进行生物催化还原反应^[74], 在用于不对称还原前手性羰基的生物催化剂中, 面包酵母(*baker's yeast*)表现出广泛的底物特异性和良好的对映选择性^[75]。早期, Yadav 等^[76]使用发酵的面包酵母制备了(*R*)-2-叠氮-1-(4-氟苯基)乙醇, 产率为 90%, *e.e.* 值为 98% (表 2, 条目 30)。叠氮醇是肾

上腺素能药物的关键中间体^[77], 其不对称合成十分重要。

同样, 白地霉(*G. candidum*)在催化还原酮类化合物中的应用也十分广泛, 它具有对映选择性好、粗酶制备容易、易保存、实验操作简便等优点^[78]。最早, Nakamura 等^[79]报道了白地霉催化还原 2,2,2-三氟乙酰丙酮, 获得相应的(*S*)-醇, *e.e.* 值为 98%、产率>99%。随后, Matsuda 等^[80]利用白地霉催化还原各类氟代酮化合物, 得到了具有优异光学纯度的手性氟化醇(表 2, 条目 31)。在此基础上, de Oliveira Lopes 等^[81]将白地霉在固定化后, 在连续流动条件下进行了实验, 明显缩短了反应时间, 提高了反应效率。白地霉催化还原 4'-Br-2,2,2-三氟苯乙酮和 2,2,2-三氟苯乙酮时均表现出高转化率和较好的对映选择性(表 2, 条目 32)。2018 年, 王普等^[82]利用白地霉催化还原 2,6-二氯-3-氟苯乙酮合成(*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇(表 2, 条目 33), 产率为 93%, *e.e.* 值>99.9%。(*S*)-1-(2,6-二氯-3-氟苯基)乙醇是克唑替尼的关键中间体。

依替米贝(Ezetimibe)是用于治疗原发性高胆固醇血症的有效药物, 可降低冠心病风险^[83-84]。合成依替米贝的关键步骤即为不对称催化还原氟代酮。2010 年, Kyslíková 等^[85]首次发现了红球菌(*Rhodococcus fascians*) M022 可不对称还原底物(3*R*, 4*S*)-1-(4-氟苯基)-3-[3-(4-氟苯基)-3-氧代丙基]-4-(4-羟基苯基)氮杂环丁烷-2-酮制备((3*R*, 4*S*)-1-(4-氟苯基)-3-[(3*S*)-3-(4-氟苯基)-3-羟基丙基]-4-(4-羟基苯基)-2-氮杂环丁烷酮(依替米贝), 转化率可达 95%, *e.e.* 值为 99.9% (表 2, 条目 34)。这是首次报道利用微生物不对称催化还原制备依替米贝。通过该方法, 成功地将两个化学步骤简化成一个单一的生物转化。

同年, Świzdor 等^[86]首次发现了点火双孢菌(*Didymosphaeria igniaria*) KCH 6670 菌株的脱氢酶活性。该菌株将三氟苯乙酮还原为相应的*S*型醇, 产率为 100%, *e.e.* 值为 82% (表 2, 条目 35)。

生物催化法的一个明显的缺点是反应时间较长, 而微波辐射是一种可用于缩短反应时间的有效工具^[87-89]。Araujo 等^[90]报道了脂肪酶可以通过微波显著缩短反应时间, 获得类似于轨道振荡的产率。以此为灵感, Ribeiro 等^[91]提出了微波条件下用嗜热细菌(芽孢杆菌 FPZSP005、枯草杆菌 FPZSP088、地衣芽孢杆菌 FPZSP055 和

BC-FPZSP051) 生物还原氟代苯乙酮(表2, 条目36), 以此来缩短反应时间。还原反应在微波辐射下进行, 芽孢杆菌属的嗜热细菌可适度地催化还原氟代酮, 产率在26%~42%范围内, *e.e.* 值为5%~62%。当反应在常规加热下进行, 它们显示出高转化率和高对映选择性(*e.e.* 值>99%)。这是首次将微波辐射与嗜热细菌应用于生物催化的研究。虽然微波辐射法反应性一般, 但是有效缩短了反应时间, 是一个很有潜力的方法。

(*S*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇(*(S)*-BTPE)是合成受体拮抗剂和抗抑郁剂的关键中间体, 用于治疗一系列中枢和树枝神经抑制^[92]。2020年, Wang等^[93]从土壤样品中分离到鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas*) LZ1菌株, 该菌株可不对称催化还原3,5-双(三氟甲基)苯乙酮得到(*S*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇, 收率为94%, *e.e.* 值为99.6%。鞘氨醇单胞菌LZ1还可以不对称地将多种前手性氟化酮还原为相应的光学醇, 并具有良好的对映选择性(*e.e.* 值>97%) (表2, 条目37)。2021年, Wang等^[94]又从土壤样品中分离到新的菌株, 即胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*) NQ1菌株, 该菌株可以更高的产率催化还原得到(*S*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇(*(S)*-BTPE), 产率为99%, *e.e.* 值为99% (表2, 条目38)。对于其他大多数氟代酮类化合物也具有更高的产率及对映选择性(*e.e.* 值93%~99%)。鉴于上述结果, 胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*) NQ1可以高产率及高对映选择性获得重要医药中间体(*S*)-[3,5-双(三氟甲基)苯基]乙醇, 且具有较广泛含氟化合物的底物范围, 在手性氟代醇的合成方面显示出很高的潜力, 可用于重要医药中间体的工业生产。

(*S*)-1-[2-(三氟甲基)苯基]乙醇是用于合成GSK461364的关键手性中间体, GSK461364是一种有效、选择性的ATP竞争型Plk1抑制剂^[95]。2021年, Xiong等^[96]利用林地霉(*Geotrichum silvicola*) ZJPH1811在深共晶溶剂/环糊精体系中高效地生物催化还原合成了(*S*)-1-[2-(三氟甲基)苯基]乙醇, 产率为75.6%, *e.e.* 值>99.2% (表2, 条目39)。在反应体系中加入深共晶溶剂乙酰胆碱/半胱氨酸(ChAc/Cys)作为共溶剂, 可加速传质, 保护细胞免受底物抑制, 从而提高产率。与传统有机溶剂相比, 深共晶溶剂是更环保、更有效的助溶剂^[97]。此外, 甲基化- β -环糊精(MCD)和ChAc/

Cys在生物还原过程中具有协同效应, 进一步提高了底物浓度和细胞膜通透性。与普通缓冲体系相比, 新开发的ChAc/Cys-MCD体系的底物负载量和产物收率分别提高了6.7倍和2.4倍。这是首次报道利用林地霉生产(*S*)-1-[2-(三氟甲基)苯基]乙醇, 并对深共晶溶剂和环糊精在生物催化中的协同效应提供了有价值的见解。

(*R*)-1-[3-(三氟甲基)苯基]乙醇(*(R)*-MTF-PEL)是制备(*R*)-3-(1-(3-(三氟甲基)苯基)乙氧基)氮杂环丁-1-甲酰胺等神经保护化合物的关键手性砌块^[98]。2021年, Zhuang等^[99]开发了一种全细胞催化还原制备(*R*)-MTF-PEL的方法。采用可提供羰基还原酶的重组大肠杆菌BL21(DE3)-pET28a(+)-LXCAR-S154Y突变体将3'-(三氟甲基)苯乙酮还原为*e.e.* 值>99.9%的(*R*)-MTF-PEL(表2, 条目40)。羰基还原酶基因来自雷弗松氏菌(*Leifsonia xyli*) HS0904。添加表面活性剂吐温-20可增加疏水化合物的水溶性, 底物浓度比纯缓冲溶液中的浓度增加了4.0倍。在反应介质中引入天然深共晶溶剂(NADES)氯化胆碱: 赖氨酸(ChCl: Lys, 摩尔比为1:1), 进一步提高了生物催化效率。在构建的吐温-20/ChCl: Lys体系中, 底物浓度为200 mmol/L时, 产物产率达到91.5%, 这是(*R*)-MTF-PEL生产中有史以来最高产率。表面活性剂和天然深共晶溶剂的组合策略在生物催化过程和手性醇的合成中具有巨大潜力。

2.2 植物细胞催化不对称还原氟代酮

除了微生物全细胞催化还原, 还可以利用植物细胞催化。使用植物作为催化剂的主要优势在于使用后易于处理(因为它们在温和的反应条件下可生物降解), 以及以极低的成本获得广泛的适用性。此外, 这些反应系统不需要进行费力的培养或开发操作, 这些操作常见于微生物全细胞催化反应^[100]。

植物是分离酶的极好替代品, 因为氧化还原酶、辅助因子及其再生系统都位于植物内部, 可以避免添加昂贵的辅助因子。然而, 这种方法的一个问题是实验的再现性, 因为这些生物催化剂的性质可能取决于它们的来源。此外, 即使来自同一地区, 也很难在一年内获得性能一致的生物催化剂。2010年, Suraz-Franco等^[101]发现了意大利甘蓝(西兰花)具有还原芳香醛的能力。在此基础上, 为了避免由于材料来源和年龄的变化而导致还原反应的潜在不可再生性, Mohammadi等^[102]使用了

发芽的意大利甘蓝种子代替新鲜切下的意大利甘蓝茎来还原不同的前手性酮 (表2, 条目41)。因为种子可以从任何地点获得, 并且可以在一年中的任何时间在合适的条件下发芽, 该方法是可重复的。结果显示, 发芽的意大利甘蓝种子催化还原各类氟取代芳香酮均具有较好的对映选择性 (*e.e.* 值87%~95%)。这个过程比传统的化学试剂或微生物更有效, 产生的废物更少。这些生物催化剂的低成本和易获得性表明了它们可以用于大规模制备重要的手性醇。

一般常用于不对称催化还原羰基化合物的植物细胞都来自胡萝卜^[103]、芹菜^[104]、小茴香^[105]、黄瓜^[106]、马铃薯^[107]、豌豆^[108]等植物, 而使用入侵植物细胞催化不仅原料更加廉价易得, 还可以进一步解决生态问题。入侵植物是目前最重要的现代生态问题之一, 其扩散影响了生物多样性的保护^[109]。女贞是阿根廷中部分布最广的入侵树种之一, 现在已经成为森林中非常成功的入侵者, 消灭了大部分原生植被^[110]。考虑到这些因素, Aimar等^[111]启动了一个研究外来植物果实的项目, 即探索外来入侵植物的果实能否成为新型生物催化剂, 以便为它们找到一些实际用途。其中女贞的果实将对氟苯乙酮催化还原为相应(*S*)-醇(转化率90%, *e.e.* 值97%), 将对三氟甲基苯乙酮同样催化还原为相应(*S*)-醇(转化率84%, *e.e.* 值78%) (表2, 条目42)。研究结果表明, 女贞的果实有望成为生产关键中间体的生物催化剂。通过对野生外来植物的研究, 为外来植物建立了一种新的应用, 尤其是那些没有任何其他实际用途的物种。目前正在进一步的, 探索这种新型廉价生物催化剂的新催化活性。

Table 2 Asymmetric reduction of fluorinated ketones using biocatalyst

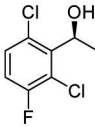
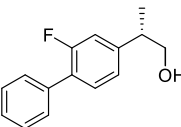
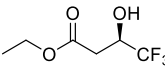
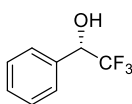
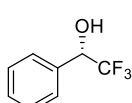
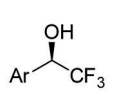
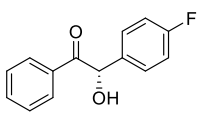
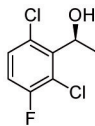
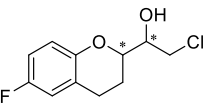
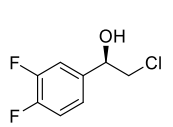
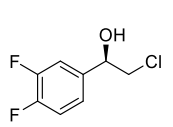
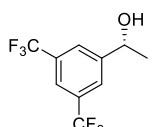
表2 利用生物催化剂不对称还原氟代酮

条目	产物	生物催化剂	辅酶	文献
1		LbADH	NADPH	[23]
2		LbADH	NADPH	[24]
3		CaADH	NADPH	[26]

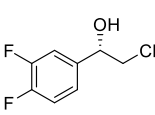
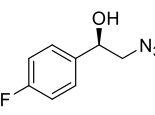
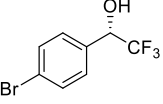
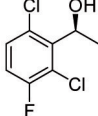
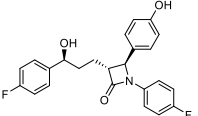
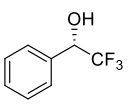
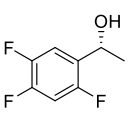
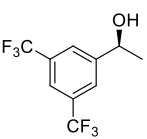
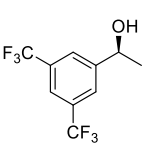
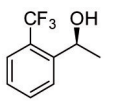
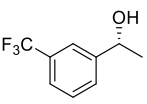
续表2

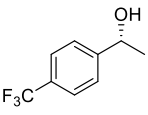
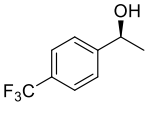
条目	产物	生物催化剂	辅酶	文献
4		CaADH	NADPH	[28]
5		ADH-A	NADH	[23]
6		ADH-A	NADH	[32]
7		DON@ADH@PDA	NADPH	[33]
8		ReADH	NADH	[34]
9		LsADH	NADH	[37]
10		PfADH	NADH	[39]
11		PfADH	NADH	[40]
12		TtADH	NADH	[46]
13		SyADH	NADPH	[32]
14		Ras-ADH	NADPH	[49]
15		ADH	NADH	[53]
16		ADH	NADPH	[54]

续表2

条目	产物	生物催化剂	辅酶	文献
17		ADH	NADPH	[55]
18		SsADH10	NADH	[56]
19		YtbE	NADPH	[58]
20		ScCR	NADH	[59]
21		DhCR	NADPH	[60]
22		KRED1-Pglu	NADPH	[62]
23		KRED1-Pglu	NADPH	[63]
24		KRED82	NADPH	[64]
25		CR	NADH	[65]
26		KRED	NADPH	[67]
27		PpKR8	NADH	[68]
28		KR01	NADPH	[70]

续表2

条目	产物	生物催化剂	辅酶	文献
29		KRED	NADPH	[71]
30		面包酵母		[74]
31		白地霉		[80]
32		白地霉		[81]
33		白地霉		[82]
34		红球菌		[85]
35		点火花孢菌KCH6670		[86]
36		嗜热细菌		[91]
37		鞘氨醇单胞菌LZ1		[93]
38		胶红酵母NQ1		[94]
39		林生地霉ZJPH1811		[96]
40		雷弗松氏菌 HS0904		[99]

续表2				
条目	产物	生物催化剂	辅酶	文献
41		发芽的意大利 甘蓝种子		[102]
42		女贞果实		[111]

3 酮类底物的酶催化还原活性受氟取代基的影响

氟原子的原子半径与氢原子类似, 且氟为电负性最强的元素, 由于氟原子的这些特殊性质, 化合物中引入氟原子可显著改变其物理化学性质^[112]。下面讨论将氟原子引入芳香酮及脂肪酮时, 对它们生物催化还原反应的影响。

3.1 芳香酮类底物的酶催化还原活性受氟取代基的影响

利用 PfADH 作为生物催化剂还原取代 α 氟代芳香酮时, 4'位和 2',4'位氟代可以提高产率及 *e.e.* 值, 原因可能是酶的活性受电子和空间因素以及底物在水缓冲液中溶解度的影响^[40]。利用 LbADH 催化还原苯乙酮类化合物时, α 单氟代的还原效率约为苯乙酮的 32 倍, α,α -二氟代的还原效率约为苯乙酮的 7.8 倍, 而 α,α,α -三氟代苯乙酮的还原水平约为苯乙酮的 0.2 倍^[24]。氟原子的吸电子效应显著增加了生物催化剂的反应性, 而空间位阻可能会导致反应性降低。 α,α,α -三氟代苯乙酮虽酶催化活性低, 但是其转化率 (*con.*>99%) 及对映选择性 (*e.e.*>99%) 都极好。将 α -单氟代苯乙酮的苯环对位或间位进行氟代时, 不影响转化率和对映选择性, 均具有极好的转化率 (*con.*>99%) 和对映选择性 (*e.e.*>99%)^[23]。同样, ScCR 催化还原苯乙酮时, α,α,α -三氟代后产率明显提高, 对映选择性也有所提高^[56]。相较于苯乙酮, DhCR 催化还原 α,α,α -三氟代苯乙酮的活性也同样增强, 且 DhCR 催化还原的产率及对映选择性都较高^[59]。

这种规律同样存在于植物细胞催化还原中, 发芽的甘蓝种子催化还原苯乙酮类化合物时, 对比苯乙酮与对氟苯乙酮和对三氟甲基苯乙酮发现, 氟代可提高转化率及对映选择性。对比苯乙酮和 α,α,α -三氟代苯乙酮发现了同样的规律^[102]。而利用女贞

的果实催化还原苯乙酮, 却发现将苯乙酮进行对氟取代或对三氟甲基取代后, 其转化率和对映选择性都有所降低^[111]。

通过微生物细胞白地霉催化还原苯乙酮及 α,α,α -三氟代苯乙酮时, 都具有较好的对映选择性^[80]。当苯乙酮的苯基被对氯苯基、噻吩基取代时, 其对应的三氟代酮的对映选择性更强。单氟代苯乙酮及三氟代苯乙酮的催化还原产物的构型相反, 均具有较高的 *e.e.* 值 (>99%), 而二氟代的 *e.e.* 值较低 (63%)。利用点火双孢菌 KCH6670 催化还原苯乙酮及 α,α,α -三氟代苯乙酮可得到构型不同的醇, 氟代使反应速率变快, 产率增加, 但立体选择性稍有降低^[86]。

3.2 脂肪酮类底物的酶催化还原活性受氟取代基的影响

相较于乙酰乙酸乙酯, DhCR 催化还原 α,α,α -三氟乙酰乙酸乙酯的活性降低, 但是仍具有较高的产率及对映选择性^[60]。ScCR 的催化还原活性及转化率和对映选择性不受氟取代的影响^[59]。

白地霉催化还原甲基己基酮、甲基庚基酮、甲基辛基酮及甲基壬基酮等脂肪酮时发现, 将甲基三氟代后产率明显提高, *e.e.* 值有些下降, 但是仍然具有很好的对映选择性 (*e.e.* 值为 96%~99%)^[80]。

综上所述, 对于大对数生物催化剂, 催化还原芳香酮及脂肪酮时, 氟代酮的转化率及对映选择性更高。氟代底物可增加酶活性, 使反应速率提高, 缩短反应时间。只有少数的生物催化剂催化还原氟代酮时产率及对映选择性稍有降低。

4 结论与展望

手性氟代醇片段常见于药物及药物前体结构中, 不对称合成是这些药物中间体合成过程中最关键的一步, 因此如何高效绿色地进行不对称还原成为了近年研究的热点。自 20 世纪 50 年代, 生物催化法开始运用于药物合成领域, 因其绿色高效的特性引起了广泛关注。生物催化酶分为 6 大类, 分别为氧化还原酶、转移酶、水解酶、裂合酶、异构酶和合成酶。本文综述的氧化还原酶具有高立体选择性、区域选择性和化学选择性且较其他化学催化剂绿色环保, 所以生物酶成为了不对称还原氟化酮的一种首选催化剂。但是大多数酶催化反应时间较长, 生物酶及辅酶价格昂贵, 因此未来酶催化反应发展趋势是缩短反应时间, 生物酶循环利用及开发更高效经济的辅酶再生系统等。植物细胞相较于微

生物细胞更加廉价易得, 绿色环保, 应进一步研究探索其不同部位的催化活性, 提高催化稳定性。

参 考 文 献

- [1] Isoda A, Saito R, Komatsu F, *et al.* Palonosetron, aprepitant, and dexamethasone for prevention of nausea and vomiting after high-dose melphalan in autologous transplantation for multiple myeloma: a phase II study. *Int J Hematol*, 2017, **105**(4): 478-484
- [2] Yu S, Li H, Lu Y, *et al.* A catalyst from *Burkholderia cenocepacia* for efficient anti-Prelog's bioreduction of 3, 5-bis (trifluoromethyl) acetophenone. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, **184**(4): 1319-1331
- [3] Ji M S, Jeong M H, Keun Ahn Y, *et al.* Clinical outcome of statin plus ezetimibe versus high-intensity statin therapy in patients with acute myocardial infarction propensity-score matching analysis. *Int J Cardiol*, 2016, **225**: 50-59
- [4] Dražić T, Molčanov K, Sachdev V, *et al.* Novel amino- β -lactam derivatives as potent cholesterol absorption inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2014, **87**: 722-734
- [5] Hua Y Y, Bin H Y, Wei T, *et al.* Iridium-catalyzed asymmetric hydrogenation of γ - and δ -ketoacids for enantioselective synthesis of γ - and δ -lactones. *Org Lett*, 2020, **22**(3): 818-822
- [6] Xu F, Chen J, Xie X, *et al.* Synthesis of a crizotinib intermediate via highly efficient catalytic hydrogenation in continuous flow. *Org Process Res Dev*, 2020, **24**(10): 2252-2259
- [7] De Koning P D, Mcandrew D, Moore R, *et al.* Fit-for-purpose development of the enabling route to crizotinib (PF-02341066). *Org Process Res Dev*, 2011, **15**(5): 1018-1026
- [8] Li L, Beaulieu C, Carriere M C, *et al.* Potent and highly selective DP1 antagonists with 2, 3, 4, 9-tetrahydro-1H- carbazole as pharmacophore. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(24): 7462-7465
- [9] Springthorpe B, Bailey A, Barton P, *et al.* From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y₁₂ receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**(21): 6013-6018
- [10] Patel R N. Biocatalysis: synthesis of key intermediates for development of pharmaceuticals. *ACS Catal*, 2011, **1**(9): 1056-1074
- [11] 白东亚, 何军邀, 欧阳斌, 等. 手性芳基醇的生物催化不对称合成. *化学进展*, 2017, **29**(5): 491-501
Bai Y D, He J Y, OuYang B, *et al.* *Prog Chem*, 2017, **29**(5): 491-501
- [12] Schmid A, Dordick J, Hauer B, *et al.* Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 2001, **409**(6817): 258-268
- [13] Martinez C A, Keller E, Meijer R, *et al.* Biotransformation-mediated synthesis of (1S) -1- (2, 6-dichloro-3-fluorophenyl) ethanol in enantiomerically pure form. *Tetrahedron Asymmetry*, 2010, **21**(19): 2408-2412
- [14] Liu Z Q, Dong S C, Yin H H, *et al.* Enzymatic synthesis of an ezetimibe intermediate using carbonyl reductase coupled with glucose dehydrogenase in an aqueous-organic solvent system. *Bioresour Technol*, 2017, **229**: 26-32
- [15] Liang J, Lalonde J, Borup B, *et al.* Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-)-DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. *Org Process Res Dev*, 2010, **14**(1): 193-198
- [16] Liu Z Q, Hu Z L, Zhang X J, *et al.* Large-scale synthesis of tert-butyl (3R, 5S) -6-chloro-3, 5- dihydroxyhexanoate by a stereoselective carbonyl reductase with high substrate concentration and product yield. *Biotechnol Prog*, 2017, **33**(3): 612-620
- [17] Jiang X, Prasad K, Repič O. Concise synthesis of JN403, a novel nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ selective agonist. *Synth Commun*, 2009, **39**(15): 2640-2646
- [18] Tao J, McGee K. Development of a continuous enzymatic process for the preparation of (R) -3- (4-fluorophenyl) -2-hydroxy propionic acid. *Org Process Res Dev*, 2002, **6**(4): 520-524
- [19] De Oliveira Lopes R, De Miranda A S, Reichart B, *et al.* Combined batch and continuous flow procedure to the chemo-enzymatic synthesis of biaryl moiety of Odanacatib. *J Mol Catal B Enzym*, 2014, **104**: 101-107
- [20] Wei T Y, Tang J W, Ni G W, *et al.* Development of an enzymatic process for the synthesis of (S) -2-chloro-1- (2, 4-dichlorophenyl) ethanol. *Org Process Res Dev*, 2019, **23**(9): 1822-1828
- [21] Li Z, Wang Z, Wang Y, *et al.* Substituent position - controlled stereoselectivity in enzymatic reduction of diaryl - and aryl (heteroaryl) methanones. *Adv Synth Catal*, 2019, **361**(8): 1859-1865
- [22] Hummel W. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1997, **58**: 145-184
- [23] Borzecka W, Lavandera I, Gotor V. Synthesis of enantiopure fluorohydrins using alcohol dehydrogenases at high substrate concentrations. *J Org Chem*, 2013, **78**(14): 7312-7317
- [24] Rodríguez C, Borzęcka W, Sattler J H, *et al.* Steric vs. electronic effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-catalyzed bioreduction of ketones. *Org Biomol Chem*, 2014, **12**(4): 673-681
- [25] Nolling J, Breton G, Omelchenko M V, *et al.* Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(16): 4823-4838
- [26] Panigrahi K, Applegate G A, Malik G, *et al.* Combining a clostridial enzyme exhibiting unusual active site plasticity with a remarkably facile sigmatropic rearrangement: rapid, stereocontrolled entry into densely functionalized fluorinated phosphonates for chemical biology. *J Am Chem Soc*, 2015, **137**(10): 3600-3609
- [27] Panigrahi K, Fei X, Kitamura M, *et al.* Rapid entry into biologically relevant α , α -difluoroalkylphosphonates bearing allyl protection - deblocking under Ru (II)/(IV) -catalysis. *Org Lett*, 2019, **21**(24): 9846-9851
- [28] Kudalkar G P, Tiwari V K, Lee J D, *et al.* A Hammett study of *Clostridium acetobutylicum* alcohol dehydrogenase (CaADH): an enzyme with remarkable substrate promiscuity and utility for organic synthesis. *Synlett*, 2020, **31**(03): 237-247

- [29] Stampfer W, Kosjek B, Moitzi C, *et al.* Biocatalytic asymmetric hydrogen transfer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, **114**(6): 1056-1059
- [30] Kosjek B, Stampfer W, Pogorevc M, *et al.* Purification and characterization of a chemotolerant alcohol dehydrogenase applicable to coupled redox reactions. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **86**(1): 55-62
- [31] Burnett DA. β -Lactam cholesterol absorption inhibitors. *Curr Med Chem*, 2004, **11**(14): 1873-1887
- [32] Kędziora K, Bisogno F R, Lavandera I, *et al.* Expanding the scope of alcohol dehydrogenases towards bulkier substrates: stereo- and enantioselectivity for α, α -dihalogenated ketones. *Chem Cat Chem*, 2014, **6**(4): 1066-1072
- [33] Liu Y, Wang Z, Guo N, *et al.* Polydopamine-encapsulated dendritic organosilica nanoparticles as amphiphilic platforms for highly efficient heterogeneous catalysis in water. *Chin J Chem*, 2021, **39**(7): 1975-1982
- [34] Pollard D, Truppo M, Pollard J, *et al.* Effective synthesis of (S)-3, 5-bis(trifluoromethyl)phenyl ethanol by asymmetric enzymatic reduction. *Tetrahedron Asymmetry*, 2006, **17**(4): 554-559
- [35] Hummel W, Abokitse K, Drauz K, *et al.* Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: expression of an (S)-alcohol dehydrogenase in *E. coli* and studies on the synthetic potential of this biocatalyst. *Adv Synt Catal*, 2003, **345**(1-2): 153-159
- [36] Inoue K, Makino Y, Itoh N. Purification and characterization of a novel alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* sp. strain S749: a promising biocatalyst for an asymmetric hydrogen transfer bioreduction. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(7): 3633-3641
- [37] Itoh N, Isotani K, Nakamura M, *et al.* Efficient synthesis of optically pure alcohols by asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis: application of engineered enzymes in a 2-propanol-water medium. *Appl Environ Microbiol*, 2012, **93**(3): 1075-1085
- [38] Machielsen R, Uria A R, Kengen S W, *et al.* Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72**(1): 233-238
- [39] Zhu D, Malik H T, Hua L. Asymmetric ketone reduction by a hyperthermophilic alcohol dehydrogenase. The substrate specificity, enantioselectivity and tolerance of organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*, 2006, **17**(21): 3010-3014
- [40] Zhu D, Hyatt B A, Hua L. Enzymatic hydrogen transfer reduction of α -chloro aromatic ketones catalyzed by a hyperthermophilic alcohol dehydrogenase. *J Mol Catal B Enzym*, 2009, **56**(4): 272-276
- [41] Yang W, Xu J H, Xie Y, *et al.* Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2. 2241 and synthesis of the β -blocker (R)-nifenalol. *Tetrahedron Asymmetry*, 2006, **17**(12): 1769-1774
- [42] Inoue K, Makino Y, Itoh N. Production of (R)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). *Tetrahedron Asymmetry*, 2005, **16**(15): 2539-2549
- [43] Ema T, Moriya H, Kofukuda T, *et al.* High enantioselectivity and broad substrate specificity of a carbonyl reductase: toward a versatile biocatalyst. *J Org Chem*, 2001, **66**(25): 8682-8684
- [44] Itoh N, Mizuguchi N, Mabuchi M. Production of chiral alcohols by enantioselective reduction with NADH-dependent phenylacetaldehyde reductase from *Corynebacterium* strain, ST-10. *J Mol Catal B Enzym*, 1999, **6**(1-2): 41-50
- [45] Poessl T M, Kosjek B, Ellmer U, *et al.* Non-racemic haloalcohols via biocatalytic hydrogen-transfer reduction of halo-ketones and one-pot cascade reaction to enantiopure epoxides. *Adv Synt Catal*, 2005, **347**(14): 1827-1834
- [46] Pennacchio A, Pucci B, Secundo F, *et al.* Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-chain NAD (H)-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(13): 3949-3958
- [47] Lavandera I, Kern A, Resch V, *et al.* One-way biohydrogen transfer for oxidation of sec-alcohols. *Org Lett*, 2008, **10**(11): 2155-2158
- [48] Shibatomi K, Narayama A, Soga Y, *et al.* Enantioselective gem-chlorofluorination of active methylene compounds using a chiral spiro oxazoline ligand. *Org Lett*, 2011, **13**(11): 2944-2947
- [49] González-Martínez D, Gotor V, Gotor-Fernández V. Chemoenzymatic synthesis of an Olanacatib precursor through a Suzuki-Miyaura cross-coupling and bioreduction sequence. *Chem Cat Chem*, 2019, **11**(23): 5800-5807
- [50] Lavandera I, Kern A, Ferreira-Silva B, *et al.* Stereoselective bioreduction of bulky-bulky ketones by a novel ADH from *Ralstonia* sp. *J Org Chem*, 2008, **73**(15): 6003-6005
- [51] 陈少波, 张厚德. 克唑替尼抗肿瘤的研究进展. *中国现代医生*, 2015, **14**: 156-160
Chen S B, Zhang H D. *Mod Chin Doct*, 2015, **14**: 156-160
- [52] 张广艳, 李鹏程, 刘地发, 等. 克唑替尼的合成工艺研究. *中国药物化学杂志*, 2014, **24**(6): 445-449
Zhang G Y, Li P C, Liu D F, *et al.* *Chin J Med Chem*, 2014, **24**(6): 445-449
- [53] 郭红颜. 酶偶联法催化还原手性酮类化合物的研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2015
Guo H Y. Study on Catalytic Reduction of Latent Chiral Ketones by Enzyme Coupling[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2015
- [54] 刘丽勤, 张俊梁, 谭俊, 等. 乙醇脱氢酶与葡萄糖脱氢酶偶联催化制备(S)-1-(2, 6-二氯-3-氟苯基)乙醇. *工业微生物*, 2016, **46**(3): 8-12
Liu L Q, Zhang J L, Tan J, *et al.* *Ind Microbiol*, 2016, **46**(3): 8-12
- [55] 林涛, 徐明文, 戴端芳, 等. 一种S-手性中间体的提取方法: 中国, 110156564A, 2019-08-23
Lin T, Xu M W, Dai D F, *et al.* Extracting method of s-chiral alcohol intermediate from enzyme transformation liquid Jiang: China, 110156564A, 2019-08-23
- [56] Friest J A, Maezato Y, Broussy S, *et al.* Use of a robust dehydrogenase from an archaeal hyperthermophile in asymmetric

- catalysis – dynamic reductive kinetic resolution entry into (S) - Profens. J Am Chem Soc, 2010, **132**(17): 5930-5931
- [57] Xie Y, Xu J H, Xu Y. Isolation of a *Bacillus* strain producing ketone reductase with high substrate tolerance. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(3): 1054-1059
- [58] Ni Y, Li C X, Ma H M, *et al.* Biocatalytic properties of a recombinant aldo-keto reductase with broad substrate spectrum and excellent stereoselectivity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, **89**(4): 1111-1118
- [59] Wang L J, Li C X, Ni Y, *et al.* Highly efficient synthesis of chiral alcohols with a novel NADH-dependent reductase from *Streptomyces coelicolor*. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(14): 7023-7028
- [60] Xu G C, Yu H L, Shang Y P, *et al.* Enantioselective bioreductive preparation of chiral halohydrins employing two newly identified stereocomplementary reductases. *RSC Adv*, 2015, **5**(29): 22703-22711
- [61] Contente M L, Serra I, Brambilla M, *et al.* Stereoselective reduction of aromatic ketones by a new ketoreductase from *Pichia glucozyma*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**(1): 193-201
- [62] Contente M L, Serra I, Molinari F, *et al.* Preparation of enantiomerically enriched aromatic β -hydroxynitriles and halohydrins by ketone reduction with recombinant ketoreductase KRED1-Pglu. *Tetrahedron*, 2016, **72**(27-28): 3974-3979
- [63] Rabuffetti M, Cannazza P, Contente M L, *et al.* Structural insights into the desymmetrization of bulky 1, 2-dicarbonyls through enzymatic monoreduction. *Bioorg Chem*, 2021, **108**: 104644
- [64] 赵志强. 新型酮还原酶的挖掘及其在合成(S)-1-(2, 6-二氯-3-氟苯基)乙醇中的应用研究[D]. 上海:华东理工大学, 2015
Zhao Z Q. Excavation of Novel Ketoreductases and Its Application Research in Synthesis of (S) -1- (2, 6-dichloro-3- fluorophenyl) ethanol[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2015
- [65] 陈恬, 王家洪, 王乃星, 等. 羰基还原酶应用于合成手性2-氯-1-(6-氟-3, 4-二氢-2H-1-苯并吡喃-2-基) 乙醇. 南昌大学学报(理科版), 2018, **42**(5): 461
Chen T, Wang J H, Wang N X, *et al.* Journal of Nanchang University(Natural Science), 2018, **42**(5): 461
- [66] 姚佳颖. 替格瑞洛的合成工艺及有关物质研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2020
Yao J Y. Study on Synthesis Process and Related Substances of Ticagrelor[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2020
- [67] 竺伟, 包蕾, 胡集斌. 一种制备(R)-2-氯-1-(3,4-二氟苯基)乙醇的方法: 中国, 109439696A. 2019-03-08
Zhu W, Bao L, Hu J C. Preparation method for (R) -2-chloro-1-(3,4-difluorophenyl)ethanol under ketoreductase catalysis: China, 109439696A. 2019-03-08
- [68] He L, Ye W, Xie Y, *et al.* Efficient biocatalytic synthesis of (R)-2-chloro-1- (3, 4-difluorophenyl) ethanol by the short-chain dehydrogenase Pp KR8 from *Paraburkholderia phymatum* STM815. *Org Process Res Dev*, 2022, **26**(2): 278-287
- [69] Hargreaves R, Ferreira J C A, Hughes D, *et al.* Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, **1222**(1): 40-48
- [70] Tang J, Wei T, Ni G, *et al.* Development of an efficient and cost-effective enzymatic process for production of (R) - [3, 5-bis (trifluoromethyl)phenyl]ethanol using carbonyl reductase derived from *Leifsonia* sp. S749. *Appl Biochem Biotechnol*, 2019, **188**(1): 87-100
- [71] Raynbird M Y, Sampson J B, Smith D A, *et al.* Ketone reductase biocatalysis in the synthesis of chiral intermediates toward generic active pharmaceutical ingredients. *Org Process Res Dev*, 2020, **24**(6): 1131-1140
- [72] Shen L, Cang R, Yang G, *et al.* Aureobasidium subglaciale F134 is a bifunctional whole-cell biocatalyst for Baeyer-Villiger oxidation or selective carbonyl reduction controllable by temperature. *Chin J Chem Eng*, 2020, **28**(12): 3044-3051
- [73] 欧玲, 谢彦, 许建和. 还原酶催化羰基不对称还原的应用进展. 生物加工过程, 2011, **9**(2): 72-78
Ou L, Xie Y, Xu J H. *Chin J Bioprocess Eng*, 2011, **9**(2): 72-78
- [74] Servi S. Baker's yeast as a reagent in organic synthesis. *Synthesis*, 1990, **1**(1): 1-25
- [75] Stewart J D. Organic transformations catalyzed by engineered yeast cells and related systems. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**(4): 363-368
- [76] Yadav J, Reddy P T, Nanda S, *et al.* A facile synthesis of (R)-(-)-2-azido-1-arylethanol from 2-azido-1-arylketones using baker's yeast. *Tetrahedron Asymmetry*, 2001, **12**(1): 63-67
- [77] Lu S F, Herbert B, Haufe G, *et al.* Syntheses of (R)-and (S)-2-and 6-fluoronorepinephrine and (R)-and (S)-2-and 6-fluoropinephrine: effect of stereochemistry on fluorine-induced adrenergic selectivities. *J Med Chem*, 2000, **43**(8): 1611-1619
- [78] Nakamura K, Kitano K, Matsuda T, *et al.* Asymmetric reduction of ketones by the acetone powder of *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron Lett*, 1996, **37**(10): 1629-1632
- [79] Nakamura K, Matsuda T, Itoh T, *et al.* Different stereochemistry for the reduction of trifluoromethyl ketones and methyl ketones catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Geotrichum*. *Tetrahedron Lett*, 1996, **37**(32): 5727-5730
- [80] Matsuda T, Harada T, Nakajima N, *et al.* Two classes of enzymes of opposite stereochemistry in an organism: one for fluorinated and another for nonfluorinated substrates. *J Org Chem*, 2000, **65**(1): 157-163
- [81] De Oliveira Lopes R, Ribeiro J B, De Miranda A S, *et al.* Continuous flow whole cell bioreduction of fluorinated acetophenone. *Tetrahedron*, 2014, **70**(20): 3239-3242
- [82] 王普, 弓添添, 肖美娟. 一种克唑替手性中间体的制备方法及菌株: 中国, 201711155979, 2018-03-13
Wang P, Gong T T, Xiao M J. Method for preparing crizotinib chiral intermediate (S) -1- (2, 6-dichloro-3- fluorophenyl)ethanol with *Geotrichum candidum* ZJPH1704: China, 201711155979, 2018-03-13
- [83] Catapano A. Ezetimibe: a selective inhibitor of cholesterol

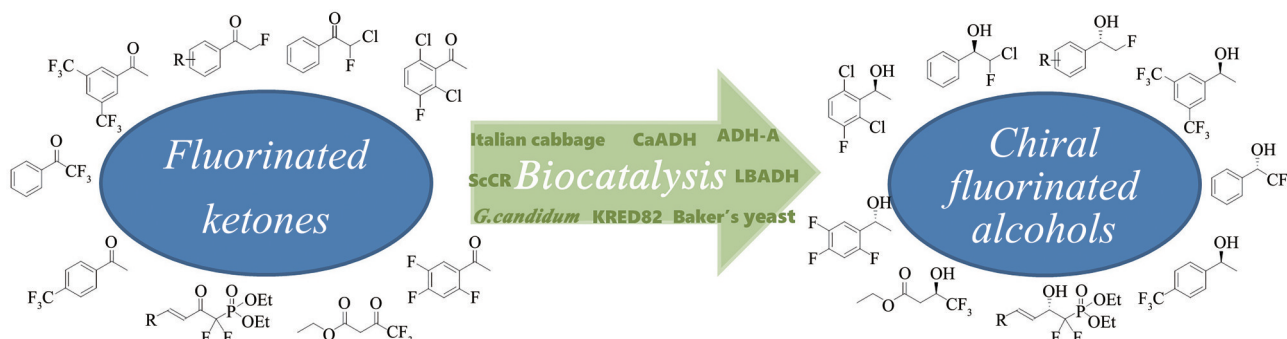
- absorption. Eur Heart J Suppl, 2001, **3**(suppl_E): E6-E10
- [84] Clader J W. The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor. J Med Chem, 2004, **47**(1): 1-9
- [85] Kyslíková E, Babiak P, Marešová H, *et al.* Diastereoselective reduction of 1-(4-fluorophenyl)-3 (R)-[3-oxo-3-(4-fluorophenyl)-propyl]-4 (S)-(4-hydroxyphenyl) azetidin-2-one to Ezetimibe by the whole cell catalyst *Rhodococcus fascians* MO22. J Mol Catal B Enzym, 2010, **67**(3-4): 266-270
- [86] Świzdor A, Janeczko T, Dmochowska-Gładysz J. *Didymosphaeria igniaria*: a new microorganism useful for the enantioselective reduction of aryl-aliphatic ketones. J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, **37**(11): 1121-1130
- [87] Young D D, Nichols J, Kelly R M, *et al.* Microwave activation of enzymatic catalysis. J Am Chem Soc, 2008, **130**(31): 10048-10049
- [88] Pilissão C, Carvalho P D O, Nascimento M D G. The influence of conventional heating and microwave irradiation on the resolution of (RS)-sec-butylamine catalyzed by free or immobilized lipases. J Braz Chem Soc, 2012, **23**(9): 1688-1697
- [89] Valizadeh H. Efficient combination of task-specific ionic liquid and microwave dielectric heating applied to synthesis of a large variety of nitrones. Heteroat Chem, 2010, **21**(2): 78-83
- [90] Araujo Y J K, Porto A L M. Aza-Michael addition of primary amines by lipases and microwave irradiation: a green protocol for the synthesis of propanenitrile derivatives. Curr Microwave Chem, 2014, **1**(2): 87-93
- [91] Ribeiro S S, de Vasconcellos S P, Ramos P L, *et al.* Application of conventional heating and microwave irradiation for the biocatalytic reduction of fluoroacetophenones by thermophilic bacteria. Curr Microwave Chem, 2016, **3**(1): 9-13
- [92] Zhang F, Xue Y, Li L, *et al.* Asymmetric reduction of 3, 5-bistrifluoromethyl acetophenone with NADH regeneration by immobilized cells of *Saccharomyces rhodotorula* in aqueous-organic solvent biphasic system. Chin J Process Eng, 2011, **11**(5): 840-845
- [93] Wang N, Luo Z, Li K, *et al.* Identification of a newly isolated *Sphingomonas* sp. LZ1 and its application to biosynthesize chiral alcohols. J Gen Appl Microbiol, 2020, **66**(5): 289-296
- [94] Wang N, Xu Y, Peng C, *et al.* Identification of a newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* NQ1 and its development for the synthesis of bulky carbonyl compounds by whole-cell bioreduction. Lett Appl Microbiol, 2021, **72**(4): 399-407
- [95] Giordano A, Liu Y, Armeson K, *et al.* Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibition synergizes with taxanes in triple negative breast cancer. PLoS One, 2019, **14**(11): e0224420
- [96] Xiong L, Kong X, Liu H, *et al.* Efficient biosynthesis of (S)-1-[2-(trifluoromethyl) phenyl] ethanol by a novel isolate *Geotrichum silvicola* ZJPH1811 in deep eutectic solvent/cyclodextrin-containing system. Bioresour Technol, 2021, **329**: 124832
- [97] Mourelle-Insua Á, Lavandera I, Gotor-Fernández V. A designer natural deep eutectic solvent to recycle the cofactor in alcohol dehydrogenase-catalysed processes. Green Chem, 2019, **21**(11): 2946-2951
- [98] Snape M, Monck N J, Fletcher A, *et al.* Preparation of azetidine-1-carboxamide derivatives as neuroprotectants: UK, WO 0107023A2. 2001-02-01
- [99] Zhuang W, Liu H, Zhang Y, *et al.* Effective asymmetric preparation of (R)-1-[3-(trifluoromethyl) phenyl] ethanol with recombinant *E. coli* whole cells in an aqueous Tween-20/natural deep eutectic solvent solution. AMB Express, 2021, **11**(1): 118
- [100] Bohman B, Cavonius L, Unelius C R. Vegetables as biocatalysts in stereoselective hydrolysis of labile organic compounds. Green Chem, 2009, **11**(11): 1900-1905
- [101] Suárez-Franco G, Hernández-Quiroz T, Navarro-Ocaña A, *et al.* Plants as a green alternative for alcohol preparation from aromatic aldehydes. Biotechnol Bioprocess Eng, 2010, **15**(3): 441-445
- [102] Mohammadi M, Yousefi M, Habibi Z. Highly enantioselective bioreduction of prochiral ketones by stem and germinated plant of Brassica oleracea variety italica. Biocatal Biotransform, 2011, **29**(6): 328-336
- [103] Omori A T, Lobo F G, Do Amaral A C G, *et al.* Purple carrots: better biocatalysts for the enantioselective reduction of acetophenones than common orange carrots (*D. carota*). J Mol Catal B Enzym, 2016, **127**: 93-97
- [104] Liu X, Pan Z G, Xu J H, *et al.* Enantioselective reduction of acetophenone analogues using carrot and celeriac enzymes system. Chin Chem Lett, 2010, **21**(3): 305-308
- [105] Bruni R, Fantin G, Medici A, *et al.* Plants in organic synthesis: an alternative to baker's yeast. Tetrahedron Lett, 2002, **43**(18): 3377-3379
- [106] Yang Z H, Zeng R, Yang G, *et al.* Asymmetric reduction of prochiral ketones to chiral alcohols catalyzed by plants tissue. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, **35**(9): 1047
- [107] Chang X, Zhonghua Y, Rong Z, *et al.* Production of chiral aromatic alcohol by asymmetric reduction with vegetable catalyst. Chin J Chem Eng, 2010, **18**(6): 1029-1033
- [108] Yadav J S, Reddy B V S, Sreelakshmi C, *et al.* Enantioselective reduction of prochiral ketones employing sprouted *Pisum sativa* as biocatalyst. Synthesis, 2009, **2009**(11): 1881-1885
- [109] Pauchard A, Cavieres L, Bustamante R, *et al.* Increasing the understanding of plant invasions in southern South America: first symposium on Alien Plant Invasions in Chile. Biol Invasions, 2004, **6**(2): 255-257
- [110] Hoyos L E, Gavier-Pizarro G I, Kuemmerle T, *et al.* Invasion of glossy privet (*Ligustrum lucidum*) and native forest loss in the Sierras Chicas of Córdoba, Argentina. Biol Invasions, 2010, **12**(9): 3261-3275
- [111] Aimar M L, Bordón D L, Formica S M, *et al.* Fruits of the glossy privet (*Ligustrum lucidum*—Oleaceae) as biocatalysts for producing chiral aromatic alcohols. Biocatal Biotransform, 2014, **32**(5-6): 348-357
- [112] Egami H. Fluorofunctionalizations of C-C multiple bonds and C-H bonds. Chem Pharm Bull, 2020, **68**(6): 491-511

Preparation of Chiral Fluorinated Alcohols by Biocatalytic Asymmetric Reduction*

WU Ya-Han, WU Jing-Jing**, WU Fan-Hong**

(Shanghai Engineering Research Center of Green Fluoropharmaceutical Technology, School of Chemical and Environmental Engineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Graphical abstract



Abstract Due to the remarkable properties of fluorine atoms, the physicochemical properties of many molecules can be significantly improved after introducing the fluorine atoms. Therefore, fluorine atom is more and more widely used in pharmaceutical field. In addition, 80% of pharmaceutical compounds are chiral molecules. It should be mentioned that chiral fluorinated alcohols are commonly used to build chiral pharmaceutical ingredients. Hence, the research exploring the synthesis methods of such structures is of great importance. Asymmetric reduction of fluorinated ketones is a common method for obtaining this structure. Compared with chemical reduction, biocatalytic reduction shows many advantages, such as high enantioselectivity and yield, easy separation and purification. Biocatalysis, especially enzyme-catalyzed reduction of fluorinated ketones, has grown a research hotspot in the field of preparing chiral compounds. At present, biocatalysis methods have some disadvantages. The reaction time is relatively long and the price of biological enzymes and coenzymes is expensive. Accordingly, the scientists should work on shortening the reaction time, recycling biological enzymes and developing more efficient and economical coenzyme regeneration systems. In this paper, the recent development of biocatalytic reduction of fluorine-substituted ketones to fluorinated chiral alcohols is reviewed from the aspects of purified enzyme catalysis and whole-cell catalysis. Moreover, the effect of fluorination on the biocatalytic reduction of ketones is highlighted and the prospect of catalytic reduction method is also put forward in this review.

Key words chiral fluorinated alcohols, fluorinated ketones, chiral drug, biocatalysis, asymmetric reduction

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0322

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (21672151).

** Corresponding author.

WU Fan-Hong. Tel: 86-21-60877220, E-mail: wfh@sit.edu.cn

WU Jing-Jing. Tel: 86-21-60877220, E-mail: wujj@sit.edu.cn

Received: July 12, 2022 Accepted: September 8, 2022