

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 3556-97

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26. 06. 90**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 06. 98**  
(Věstník č. 6/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

C 12 P 41/00  
C 12 P 7/26  
C 07 C 209/04  
C 07 C 211/03  
C 07 C 211/26

(71) Přihlášovatel:

CELGENE CORPORATION, Warren, NJ, US;

(72) Původce:

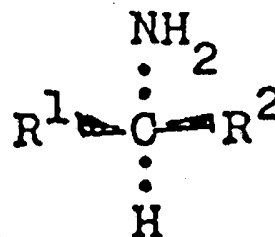
Stirling David L., Fanwood, NJ, US;

Zeitlin Adrew L., Green Brook, NJ, US;

Matcham George W., Bridgewater, NJ, US;

(74) Zástupce:

Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,  
10100;

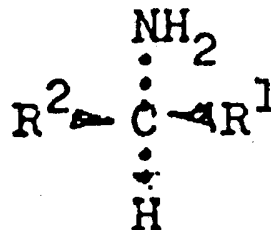


(54) Název přihlášky vynálezu:

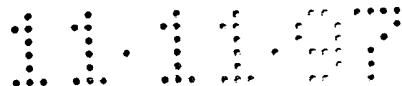
**Způsob stereoselektivní syntézy jedné  
chirální formy aminu**

(57) Anotace:

Způsob stereoselektivní syntézy jedné chirální formy aminu obecného vzorce IA nebo IB, kde R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> představují alkyl nebo arylskupiny, popřípadě substituované enzymaticky ne-inhibující skupinou, přičemž R<sup>1</sup> se odlišuje od R<sup>2</sup> strukturou nebo chiralitou, v množství podstatně převyšujícím množství druhé chirální formy, při němž se keton obecného vzorce R<sup>1</sup>-C(=O)-R<sup>2</sup>, kde R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> mají stejný význam jako u připravovaného aminu; uvádí do styku s omega-amino-kyselina transaminázou v přítomnosti aminodonoru přinejmenším tak slouho, dokud se nevytvoří podstatné množství jednoho z uvedených chirálních aminů.



CZ 3556-97 A3



~~/vyloučeno z MF 766-90-He/~~

Způsob stereoselektivní syntézy jedné chirální formy aminu

### Oblast techniky

Vynález se týká způsobu stereoselektivní syntézy chirálních aminů.

### Dosavadní stav techniky

Nositelům biologické aktivity chemických sloučenin, jako jsou farmaceutické produkty a produkty aplikovatelné v zemědělství, které obsahují centrum chiralit, je často převážně jedna z možných chirálních forem. Vzhledem k tomu, že většina chemických syntéz není ve své podstatě stereoselektivní, způsobuje tento jev vážný problém z hlediska chemické výroby. V některém stupni výroby, buď až po získání výsledných chirálních sloučenin, nebo po připravení jejich chemických prekursorů se stejným centrem chiralit je zapotřebí provádět obohacení produktu ve prospěch jedné chirální formy. Ať již se zvolí pro obohacování kterýkoliv stupeň reakce, je tento postup svou vlastní podstatou omezen tím, že se při něm může dosáhnout maximálního teoretického výtěžku 50 % požadovaného enantiomeru (pokud není k dispozici způsob recyklování nežádoucího enantiomeru).

Mnohé z chirálních sloučenin tohoto typu jsou aminy. Kromě toho, vzhledem k všestrannosti jejich reakcí jsou dobrými kandidáty pro štěpení na enantiomery, po němž lze provést stereoselektivní konverzi na chirální sloučeniny. Chemická výroba chirálních aminů

neobsahujících druhý enantiomer se až dosud spoléhá zejména na štěpení směsi dvou chirálních forem prostřednictvím vytvoření diasteromerických derivátů, jako jsou soli s chirální kyselinou, stereoselektivní syntetické postupy a použití chirálních chromatografických kolon (viz například US patent č. 3 944 608 a EP A 36 265).

Některé strukturální typy aminů je možno štěpit na enantiomery enzymaticky. Jsou dobře známy enzymatické reakce zahrnující  $\alpha$ -aminokyseliny a jejich použití bylo navrženo pro stereospecifické preparace. Tak například v US patentu č. 3 871 958 je popsána enzymatická příprava derivátů  $\alpha$ -aminokyseliny serinu kopulací aldehydu s glycinem v přítomnosti threoninaldolázy odvozené od druhu *E. coli* a příbuzná syntéza serotoninu za použití ethanolaminu.

Poměrně málo bylo publikováno o enzymatických reakcích aminokyselin, u nichž aminoskupina není ve vicinální poloze vůči skupině karboxylové kyseliny. Yonaha a další, *Agric. Biol. Chem.* 42, (12), 2363 - 2367 (1978) popisují omega-aminokyselina: pyruvát transaminázu z druhu *Pseudomonas*, pro níž je pyruvát výlučným aminoakceptorem. Tento enzym, který byl nedávno před tím vyroben v krystalické formě a charakterizován (viz Yonaha a další, *Agric. Biol. Chem.*, 41 (9), 1701 - 1706 (1977)), měl nízkou substrátovou specificitu pro omega-amino kyseliny, jako je hypotaurin, 3-aminopropansulfonát,  $\beta$ -alanin, 4-aminobutyryát

a 8-aminooktanoát a katalyzoval transeminace mezi primárními aminoalkany a pyruvát<sup>em</sup>.

Nakano a další, J. Biochem., 81, 1375 - 1381 (1977) identifikovali dvě omega-amino kyselinové transeminázy v *B. cereus*:  $\beta$ -alanin transeminázu, která odpovídá Yonahově omega-amino kyselina:pyruvát transemináze a -aminobutyrate transeminázu. Tyto dvě transeminázy je možno rozlišit na základě výrazně odlišné aktivity vůči  $\beta$ -alaninu (100 : 3) -aminobutyrate (43 : 100) a na základě jejich odlišných požadavků na aminoakceptory.

Burnett a další, J. C. S. Chem. Comm., 1979, 826 - 828, uvedli, že omega-amino kyselina:pyruvát transemináza a -aminobutyrate transemináza vykazují odlišné preference vůči dvěma terminálním atomům vodíku v třetí<sup>m</sup> značeném -aminobutyrate.

Tanizawa a další, Biochem. 21, 1104 - 1108 (1982) zkoumali bakteriální L-lysin- $\epsilon$ -aminotransferázu a L-ornithin- $\delta$ -aminotransferázu a uvedli, že i když jsou oba tyto enzymy specifické pro L-amino kyseliny, působí distálně a se stejnou stereospecifitou jako -aminobutyrate transemináza studovaná Burnettem a dalšími, viz shora.

Yonaha a další, Agric. Biol. Chem., 47 (10), 2257 - 2265 (1983) dodatečně charakterizovali omega-amino kyselina:pyruvát transeminázu a -aminobutyrate transeminázu (EC 2.6.1.18 a EC 2.6.1.19) a dokumentovali

jejich distribuci v různých organismech.

Waters a další, FEMS Micro, Lett., 34 (1986) 279 - 282, ve zprávě o úplném katabolismu  $\beta$ -alaninu a  $\beta$ -aminoisobutyrátu působením *P.aeruginosa*, uvedli, že první stupeň zahrnuje transaminaci  $\beta$ -alanin:pyruvát aminotransferázou.

Enzymatické metody jsou až dosud považovány za metody pro dělení směsí chirálních aminů, které nejsou aminokyselinami, jako například 2-aminobutanolu. Většina z těchto metod zahrnuje derivatizaci; zejména aminoskupiny a využití této chráněné skupiny nebo jiné skupiny v molekule pro vlastní separaci. Tak například v EP-A 222561 je popsán postup, při němž se racemický 2-aminobutanol převede na N-karbamoylderivát, který se pak uvede do styku s alkylalkanoátem v přítomnosti enzymu lipázy. Esterifikace volné hydroxyskupiny je zřejmě omezena na S-enantiomer N-karbamoylderivátu, který se potom hydrolyzuje. Tento postup je samozřejmě omezen na aminy, nesoucí esterifikovatelnou hydroxyskupinu a kromě toho specificky vyžaduje předchozí chránění aminoskupiny vytvořením karbamoylskupiny (-NH-CO-) za účelem dosažení stereospecificity při enzymatické reakci.

EP-A 239 122 popisuje podobný postup aplikovatelný na širší třídu 2-amino-1-alkanolů.

Japonská publikace Kokai JP 55-138 389 popisuje přípravu viciálních aminoalkoholů tak, že se na alkyl- nebo aralkyl substituovaný ethylenimin působí mikroorganismy rodu Bacillus, Proteus, Erwinia nebo Klebsiella.

Japonská patentová publikace Kokai JP 58-198 296 uvádí postup, při němž se d,l N-acyl-2-aminobutanol podrobí působení aminoacylázy odvozené od různých druhů Asperigillus, Penicillium a Streptomyces, která hydrolyzuje pouze d-N-acyl-2-aminobutanol.

Japonská patentová publikace Kokai JP 59-39 294 popisuje způsob štěpení racemického 2-aminobutanolu tak, že se tato látka převede na N-acetylderivát, na který se působí Micrococcus acylázou za vzniku l-2-aminobutanolu a d-N-acetyl-2-aminobutanolu, přičemž d-N-acetyl-2-aminobutanol se chemicky hydrolyzuje na d-2-aminobutanol.

Japonská patentová publikace Kokai JP 63-237796 popisuje způsob, při němž se R,S-l-methyl-3-<sup>za</sup>-fenylpropylamin zpracovává/aerobních podmínkách kultivací specifických mikroorganismů. Přitom se přednostně metabolizuje S-forma. Nejvyšších výtěžků a optické čistoty se dosahuje za použití kvasinek druhu Candida humicola a Trichosporon melibiosaceum. Neuvádí se zde enzymatická povaha metabolismu S-formy, k níž dochází v těchto aerobních kulturách, například oxidáza, dehydrogenáza, amoniak lysáza atd., *není uvedena.*

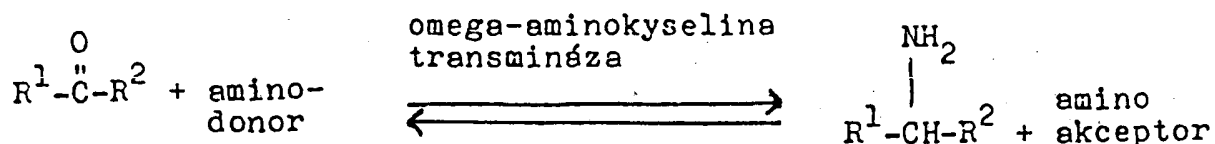
V abstraktu japonské patentové publikace Kokai JP 63-273486 je zveřejněna mikrobiální syntéza 1-(4-methoxyfenyl)-2-aminopropanu s R-konfigurací na jednom ze dvou chirálních center z 1-(4-methoxyfenyl)-2-propanu za použití *Sarcina lutea*.

### Podstata vynálezu

V nejširším smyslu zahrnuje vynález použití omega-aminokyselina transaminázy v přítomnosti aminodonoru pro stereoselektivní syntézu chirálních aminů, v nichž je aminoskupina vázána k neterminálnímu chirálně substituovanému atomu uhlíku. Vynález je tedy založen na objevu, že omega-aminokyselina transaminázy působí stereoselektivně na aminoskupiny, které nejsou v poloze omega a že tohoto působení je možno použít pro stereoselektivní syntézu chirálního aminu v pouze jedné konfiguraci.

Pod pojmem omega-aminokyselina transaminázy se rozumějí jakékoliv enzymy, které jsou schopné převádět terminální skupinu vzorce  $-CH_2-NH_2$  omega-aminokyseliny na skupinu vzorce  $-CH=O$  a naopak.

Enzymatickou rovnovážnou reakci, které se využívá při způsobu podle vynálezu, je možno znázornit takto:



11111

kde

každý ze symbolů

$R^1$  a  $R^2$  jednotlivě představuje alkyl- nebo arylskupinu popřípadě substituovanou jednou nebo více enzymaticky neinhibujícími skupinami a  $R^1$  se liší od  $R^2$  buď strukturou, nebo chiralitou nebo

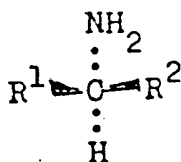
$R^1$  a  $R^2$  dohromady představují uhlovodíkový řetězec se 4 nebo více atomy uhlíku obsahující centrum chiralitity.

Pod označením "aminodonor" se rozumějí různé aminosloučeniny podrobněji charakterizované dále, které jsou schopny poskytnout aminoskupinu znázorněnému ketonu, čímž se z nich stanou karbonylové sloučeniny, působením omega-aminokyselina transaminázy.

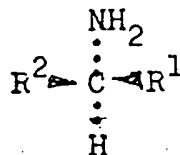
Pod výrazem "aminoakceptor" se v tomto popisu rozumějí různé karbonylové sloučeniny podrobněji charakterizované dále, které jsou schopny přijmout aminoskupinu ze znázorněného aminu rovněž působením stejné omega-aminokyselina transaminázy.

Pro enzymatické reakce znázorněné výše je charakteristické především to, že aminoskupina v získaném primárním aminu není v terminální (omega) poloze a že se nemusí jednat o aminokyselinu.

Předmětem vynálezu je způsob stereoselektivní syntézy jedné chirální formy aminu obecného vzorce IA nebo IB



(IA)



(IB)

kde

$\text{R}^1$  a  $\text{R}^2$  představují alkyl nebo arylskupiny, popřípadě substituované enzymaticky neinhibující skupinou, přičemž  $\text{R}^1$  se odlišuje od  $\text{R}^2$  strukturou nebo chiralitou,

v množství podstatně převyšujícím množství druhé chirální formy, jehož podstata spočívá v tom, že se keton obecného vzorce II



kde  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^2$  mají stejný význam jako u připravovaného aminu; uvádí do styku s omega-aminokyselina transaminázou v přítomnosti aminodonoru přinejmenším tak dlouho, dokud se nevytvoří podstatné množství jednoho z uvedených chirálních aminů.

Vynález je založen na objevu, že omega-aminokyselina transamináza převádí keton, který není chirální (přinejmenším s ohledem na karbonylový atom uhlíku) v podstatě na pouze jedinou chirální formu aminu.



$$ee = \frac{E^1 - E^2}{E^1 + E^2} \times 100$$

kde

$E^1$  představuje množství první chirální formy aminu a  
 $E^2$  představuje množství druhé chirální formy stejného aminu.

Je-li tedy počáteční poměr obou chirálních forem 50 : 50 a dosáhne se enantiomerického obohacení poskytujícího výsledný poměr 50 : 30, je hodnota nadbytku enantiomeru ee vzhledem k první chirální formě 25 %, zatímco když se dosáhne výsledného poměru enantiomerů 70 : 30, je hodnota ee vzhledem k první chirální formě 40 %. Za použití způsobu podle tohoto vynálezu se obvykle může dosáhnout hodnot ee 90 % nebo vyšších.

Pod výrazem "podstatně vyšší", jak se ho používá v tomto popisu v souvislosti s vyjádřením množství jedné chirální formy aminu vzhledem k množství druhé chirální formy aminu při stereoselektivní syntéze tohoto aminu, se rozumí množství vyjádřené poměrem obou chirálních forem alespoň asi 3 : 1, což odpovídá hodnotě ee alespoň asi 50 %.

Chirální aminy obecného vzorce IA a IB připravené způsobem podle vynálezu, mají několik strukturních omezení. Za prvé, aminoskupina v nich obsažená

je primární, ale musí být vázána k sekundárnímu atomu uhlíku, tj. k atomu uhlíku nesoucímu jeden atom vodíku a dva substituenty, které jsou odlišné od vodíku ( $R^1$  a  $R^2$ ). Za druhé,  $R^1$  a  $R^2$  se sice volí ze struktur stejného typu, ale tyto skupiny musí dodávat molekule chiralitu, tj.  $R^1$  se nutně musí lišit od  $R^2$  ve struktuře nebo chiralitě nebo  $R^1$  a  $R^2$  musejí dohromady představovat chirální skupinu. Pokud jsou  $R^1$  a  $R^2$  nezávislé skupiny, jedná se obvykle o alkyl-, aralkyl- nebo arylskupiny, přednostně alkylskupiny s přímým nebo rozvětveným řetězcem obsahujícím 1 až 6 atomů uhlíku, fenylalkylskupiny s přímým nebo rozvětveným řetězcem obsahujícím 7 až 12 atomů uhlíku nebo o fenyl nebo naftylskupinu. Jako příklady těchto skupin je možno uvést methyl-, ethyl-, n-propyl-, isopropyl-, n-butyl-, isobutyl-, sek.butyl-, fenyl-, benzyl-, fenethyl-, 1-fenethyl-, 2-fenylpropylskupinu, atd. Kromě toho, poněvadž enzymatické reakce podle vynálezu zasahuje znázorněnou aminoskupinu a přilehlý atom uhlíku, může být každá ze skupin  $R^1$  a  $R^2$  popřípadě substituována jednou nebo více skupinami, za předpokladu, že se nejedná o skupiny inhibující enzymy, tj. skupiny, které by významněji ovlivňovaly účinek transaminázy nebo s ním soutěžily, když se chirálních aminů nebo ketohů, které tyto skupiny nesou, používá v praktických koncentracích. To se může snadno určit jednoduchou zkouškou inhibice. Když se zjistí inhibice, může se často minimalizovat provádění reakce při nízkých koncentracích reakčního činidla. Jako typické substituenty, na něž se však navrho-

vané řešení neomezuje, je možno uvést halogeny, jako je chlor, fluor, brom a jod, hydroxy-, nižší alkyl-, nižší alkoxy-, nižší alkylthio-, cykloalkyl-, karbamoylskupina, mono- a di-(nižšíalkyl)substituované karbamoylskupina, trifluormethyl-, fenyl-, nitro-, aminoskupina, a di-(nižšíalkyl)substituovaná aminoskupina, alkylsulfonyl-, arylsulfonyl-, alkylkarboxamido-, arylkarboxamid skupina, atd.

Jako typické skupiny ve významu  $R^1$  a  $R^2$  dohromady, je možno uvést methylbutan-1,4-diyl-, pentan-1,4-diyl-, hexan-1,4-diyl-, hexan-1,5-diyl- a 2-methylpentan-1,5-diylskupinu.

Jako neomezující příklady typických aminů, které jsou vhodné pro způsob podle vynálezu, je možno uvést 2-aminobutan, 2-amino-1-butanol, 1-amino-1-fenylethan, 1-amino-1-(2-methoxy-5-fluorfenyl)ethan, 1-amino-1-fenylpropan, 1-amino-1-(4-hydroxyfenyl)propan, 1-amino-1-(4-bromfenyl)propan, 1-amino-1-(4-nitrofenyl)propan, 1-fenyl-2-aminopropan, 1-(3-trifluormethylfenyl)-2-aminopropan, 2-aminopropanol, 1-amino-1-fenylbutan, 1-fenyl-2-aminobutan, 1-(2,5-dimethoxy-4-methylfenyl)-2-aminobutan, 1-fenyl-3-aminobutan, 1-(4-hydroxyfenyl)-3-aminobutan, 1-amino-2-methylcyklopentan, 1-amino-3-methylcyklopentan, 1-amino-2-methylcyklohexan a 1-amino-1-(2-naftyl)ethan.

Jako příklad způsobu podle vynálezu je možno uvést postup, při němž se na acetofenon působí transaminázou za přítomnosti aminodonoru za vzniku S-1-amino-1-fenylethanu, který neobsahuje R-1-amino-1-fenylethan, nebo který ho obsahuje jen ve velmi malém množství.

Aminoakceptory jsou ketokarboxylové kyseliny, alkanony nebo látky, z nichž se tyto sloučeniny vytváří <sup>leji</sup> in situ. Jako typické příklady ketokarboxylových kyselin je možno uvést  $\alpha$ -ketokarboxylové kyseliny, jako je kyselina glyoxalová, kyselina pyrohroznová, kyselina oxalocetová apod. a jejich soli. Typickým alkanonem je butan-2-on.

Používat je možno také jiných látek, které lze převádět na aminoakceptory jinými postupy za použití enzymů nebo celých buněk. Jako příklady látek,

které je možno konvertovat na tyto aminoakceptory, je možno uvést kyselinu fumarovou (která rychle přechází in situ na kyselinu oxaloctovou), glukózu (která se konvertuje na pyruvát), laktát, kyselinu maleinovou atd.

Aminodonory jsou aminy zahrnující nechirální aminokyselinu glycin a chirální aminokyseliny mající S-konfiguraci, jako je L-alanin nebo kyselina L-aspartová. Může se také použít aminů, jak chirálních tak nechirálních, které nejsou aminokyselinami, jako S-2 aminobutanu, propylaminu, benzylaminu, atd.

Omega-aminokyselina transaminázy, užitečné při způsobech podle vynálezu, jsou známé enzymy závislé na pyridoxalfosfátu, které jsou přítomny v různých mikroorganismech, jako je *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Streptomyces*, *Aspergillus* a *Neurospora*. Dvě omega-iminokyselina transaminázy, které jsou obzvláště užitečné při způsobech podle vynálezu, EC 2.6.1.18 a EC 2.6.1.19, byly připraveny v krystalickém stavu a charakterizovány Yonahou a dalšími, viz *Agric. Biol. Chem.*, 47 (10), 2257 - 2265 (1983).

Mikroorganismy, které mají požadovanou aktivitu, je možno snadno izolovat pomocí chemostatové kultury, tj. kultivací v konstantním, ale omezeném chemickém prostředí s aminoakceptorem a s aminem, jako

Jediným zdrojem dusíku. Aminem může být, ale nemusí chirální amin, poněvadž v normálním prostředí omega-aminokyselina transaminázy metabolizují primární aminy. Z nechirálních aminů, kterých bylo s úspěchem použito pro tvorbu omega-aminokyselina transamináz, je možno uvést n-oktylamin, cyklohexylamin, 1,4-butandiemin, 1,6-hexandiemin, 6-aminohexanovou kyselinu, 4-aminomáselnou kyselinu, tyramin a benzylamin. Úspěšně bylo použito i chirálních aminů, jako 2-aminobutanu,  $\alpha$ -fenethylaminu a 2-amino-4-fenylbutanu, stejně tak jako aminokyselin, jako je L-lysin, L-ornithin,  $\beta$ -alanin a taurin.

Takovými postupy se kultura obohatí o mikroorganismy produkující požadované omega-aminokyselina transaminázy. Tak například jedná taková chemostatová kultivace za použití náhodných vzorků půdy, které neměly žádnou zvláštní historii, pokud se týče expozici aminům, byla prováděna po dobu přibližně jednoho měsíce. Jako dominantní mikroorganismus byl potom nezávisle identifikován v American Type Culture Collection Bacillus megaterium, který se podstatně neodlišoval od známých kmenů a byl jim podobný, pokud se týče fenotypu.

Takto izolované organismy se mohou nechat růst různými způsoby. Předně se může použít standardního solného media doplněného fosfátovým puforem, octanem sodným, jako zdrojem uhlíku, 2-ketoglutarátem, jako

aminoakceptorem a sloučeninou obsahující dusík, jako je n-propylamin, n-oktylamin, 2-aminobutan, 2-aminoheptan, cyklohexylamin, 1,6-hexandi,amin putrescin, 6-aminohexanová kyselina, 4-aminomáselná kyselina, L-lysin, L-ornithin,  $\beta$ -alanin,  $\alpha$ -fenethylamin, 1-fenyl-3-aminobutan, benzylamin, tyramin, taurin, atd.

Alternativně se může mikroorganismus nechat růst za použití aminu, jako jediného zdroje uhlíku, čímž se růst omezí na ty organismy, které jsou schopny pro získání uhlíku katabolizovat amin.

Za třetí, mikroorganismus se může nechat růst v prostředí obsahujícím jantaran sodný, octan sodný nebo jakýkoliv jiný zdroj uhlíku a amonnou sůl nebo proteinový hydrolyzát, jako hlavní zdroj dusíku, k němuž se potom přidá, buď na začátku růstu, nebo v jeho průběhu, amin, jako 2-aminobutan, 1-fenyl-3-aminobutan,  $\alpha$ -fenethylamin, atd., pro indukci produkce požadované transaminázové aktivity.

Skutečná enzymatická konverze se může provádět konvenčními kultivačními postupy v přítomnosti ketonu, za použití izolovaných, ale nerostoucích buněk, nebo tak, že se keton uvede do styku s rozpustným omega-aminokyselina transaminázovým přípravkem.

Omega-aminokyselina transeamináza může být ve volné formě, buď jako extrakt neobsahující

buňky, nebo přípravek obsahující celé buňky, uvedený shora, nebo ve formě immobilizované na vhodném nosiči či matrici, jako je zesíťovaný dextran nebo agaróza, oxid křemičitý, polyamid nebo celulóza. Může být také zapouzdřena v polyakrylamidu, alginátech, vláknech epod. Způsoby immobilizace jsou popsány v literatuře (viz například *Methods of Enzymology*, 44, 1976). Metodám za použití immobilizovaného enzymu se dává přednost, poněvadž po immobilizaci enzymu stačí již jen přes tento enzym vést aminodonor a keton, aby došlo k požadované syntéze a odvádět vytvořený chirální amin způsobem popsaným shora.

I když to není nezbytně nutné, je často výhodné zvyšovat rychlost konverze přidávkem zdroje pyridoxaminu, jako pyridoxalfosfátu k reakční směsi.

Použité postupy a materiály jsou dále ilustrovány typickými příklady.

Aktivita enzymu: Aktivita enzymu se vyjadřuje v jednotkách/mg. Jednotka aktivity enzymu je definována jako aktivita, která je schopna vyprodukovat 1  $\mu$ mol ketonu za minutu. Za účelem dosažení jednotnosti se aktivita měří, jakožto počet  $\mu$ mol 1-fenylbutan-3-onu vyrobených z R,S-1-fenyl-3-aminobutanu. Pro měření hodnot aktivity omega-aminokyselina transamináz uvedených v následujících příkladech se používá následujícího standardizovaného testu.

Známy objem zkoušeného enzymatického přípravku se inkubuje při 37 °C a pH 7 v roztoku následujícího složení:

pyruvát sodný	100 mM
R,S-1-fenyl-3-aminobutan	30 mM
pyridoxalfosfát	0,5 mM

Odebere se vzorek a přidá se k němu v množství 20 % jeho objemu 12% vodná kyselina trichloroctová. Vysrážený protein se oddělí odstředěním a koncentrace 1-fenylbutan-3-onu v supernatantu se stanoví kapalinovou chromatografií na 100 x 8 mm 4,um Novopak fenyl sloupci. Eluce se provádí 40% isopropanolu a 0,09 % kyseliny fosforečné ve vodě. Za těchto podmínek se 1-fenylbutan-3-on eluuje za 5,3 minuty.

Čistota aminů: Čistota vyrobených aminů se stanovuje plynovou chromatografií na 1,83 x 2 mm chrom Q sloupci 10 % SE-30 na nosiči 100/120 mesh (125 až 150,um) při 210 °C při průtoku nosného plynu 10 ml/min.

Stanovení enantiomerického obohacení:

Hodnota ee daného produktu se stanoví reakcí s (-)  $\alpha$ -(trifluormethylfenyl)methoxyacetylchloridem (viz Gal, J. Pharm. Sci., 66, 169 (1977) a Mosher a další, J. Org. Chem., 34, 25430 (1969) následovanou kapilární plynovou chromatografií derivatizovaného produktu na koloně Chrompack z taveného křemene.

Standardní solné medium: Vhodné solné medium pro mikrobiální transformace popsané v následujících příkladech má toto složení:

MgSO <sub>4</sub>	1,00 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,021 g/l
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,10 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,02 mg/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,10 mg/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05 mg/l
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01 mg/l
FeSO <sub>4</sub>	1,50 mg/l
NaMoO <sub>4</sub>	2,00 mg/l
Fe EDTA	5,00 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20,00 mM
NaOH	do pH 7

Složení solného media nemá rozhodující důležitost, ale bylo standardizováno, aby bylo eliminováno jakožto proměnná hodnota.

Mikroorganismy: Kultury byly buď získány z označené sbírky, nebo byly izolovány popsaným způsobem a potom nezávisle identifikovány.

Obohacování mikroorganismů produkujících omega-aminokyselina transeaminázu: Ve standardním solném mediu se udržuje chemostat

s 5 g/l R,S-2-aminobutanu a 10 mM 2-ketoglutarátu při rychlosti ředění 0,03/h. Chemostat se naočkuje a udržuje v provozu asi 1 měsíc při 37 °C a pH 6,8 až 7,0. Kmeny, které se vyvinou se izolují a nechají růst na minimálním agaru obsahujícím solné medium doplněné 10 mM 2-ketoglutarátu a 5 mM R,S-1-fenyl-3-aminobutanu.

Izolace enzymu: Pokud není uvedeno jinak, buňky z kultury se 10 minut odstřeďují při 10 000 G, resuspendují se v 10 mM fosfátovém pufru o pH 7 a 0,5 mM pyridoxal fosfátu a rozdrtí se dvěma průchody chlazeným francouzským lisem pracujícím při 103 MPa. Rozdrcené buňky se oddělí jednodinovým odstřeďováním při 10 000 G a supernatant obsahující enzym se uschová.

Vynález je blíže osvětlen v následujících příkladech provedení. Příklady mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje. Pro rozsah vynálezu je určující jen definice předmětu vynálezu.

#### P ř í k l a d 1

Růst mikroorganismů produkujících omega-aminokyselina transaminázu za použití aminodonoru jako jediného zdroje dusíku je ilustrován následujícím příkladem.

*Bacillus megaterium* se nechá růst ve 3 litrové třepací láhvi (otáčky  $200 \text{ min}^{-1}$ ) po dobu 17 hodin při  $30^\circ\text{C}$  za použití 1 litru shora uvedeného solného roztoku, 60 mM octanu sodného, 30 mM fosfátového pufru, 30 mM 2-Ketoglutarátu dvojsodného a 100 mM n-propylaminu, jako zdroje dusíku. Když kultura dosáhne hustoty 0,6 g sušiny na litr buňky se oddělí a shora uvedeným způsobem se z nich izoluje enzym. Specifická aktivita omega-aminokyselina transaminázy, která se takto získá je vyšší než 0,49 jednotky/mg.

Kmen *Bacillus megaterium* použitý v předchozím postupu byl získán ze vzorků půdy s žádnou zvláštní historií, pokud se týče expozici aminům, naočkováním chemostatu popsaného shora a izolací dominantních organismů (těch, které jsou schopny růstu na R,S-1-fenyl-3-aminobutanu). Kmen byl nezávisle identifikován v American Type Culture Collection jako *Bacillus megaterium*, který se významně neliší od známého kmene ATCC č. 14581 a který je fenotypově podobný ATCC 49097B.

## P ř í k l a d 2

V tomto příkladu je ilustrován růst mikroorganismů produkujících omega-aminokyselina transaminázu za použití aminodonoru, jako jediného zdroje uhlíku.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15692 se nechá růst na  $\beta$ -alaninu, jakožto jediném zdroji uhlíku, způsobem, který popsali Way a další ve FEMS Micro. Lett., 34, 279 (1986). Buněčné extrakty obsahující omega-aminokyselina transaminázu se získají shora popsaným způsobem. Při zkoušení prováděném shora popsaným způsobem se zjistí, že specifická aktivita omega-aminokyselina transaminázy je 0,040 jednotky/mg.

#### P ř í k l a d 3

Pseudomonas putida ATCC 39213 se kultivuje způsobem popsaným v příkladu 1 a podle tohoto příkladu se postupuje i při získávání extraktu z buněk. Specifická aktivita omega-aminokyselina transaminázy je 0,045 jednotky/mg.

#### P ř í k l a d 4

V tomto příkladu je demonstrována potřeba aminoacceptoru.

Enzymové extrakty z Pseudomonas putida, Bacillus megaterium a Pseudomonas aeruginosa získané shora uvedeným způsobem se zkoušejí při pH 9 v 50 mM tris/HCl za použití 30 mM R,S--1-fenyl-3-aminobutanu buď

v přítomnosti, nebo v nepřítomnosti 100 mM pyruvátu sodného. Dosáhne se následujících relativních rychlostí přeměny.

	relativní rychlost přeměny		
	P. putida	B. megaterium	P. aeruginosa
v přítomnosti pyruvátu	100	100	100
v nepřítomnosti pyruvátu	0	0	0

Transaminázová povaha enzymatického účinku je zřejmá z působení "sebevražedných inaktivátorů", o nichž je známo, že jsou pro transaminázy specifické (viz například Burnett a další, J. Bio. Chem. 225, 428 až 432, 1980). Inaktivátor (0,5 mM) se předběžně inkubuje se zkušebním médiem před přidáním R,S-1-fenyl-3-aminobutanu.

Inaktivátor	relativní rychlost přeměny		
	P.putida	B.megaterium	P.aeruginosa
žádný	100	100	100
gabakulin	0	13	0
hydroxylamin	3	10	0

Stereoselektivita omega-amino kyselina transaminázy je zřejmá z výsledků následující zkoušky za použití 15 mM R-1-fenyl-3-aminobutanu (s pyruvátém).

	relativní rychlost přeměny		
	P.putida	B.megaterium	P.aeruginosa
R,S-1-fenyl-3-aminobutan	100	100	100
R-1-fenyl-3-aminobutan	3	15	4

P ř í k l a d 5

V tomto příkladu je ilustrován růst mikroorganismů za použití amonia, jako jediného zdroje dusíku, přičemž se indukce produkce omega-aminokyselina transaminázy provede přidávkem aminu.

Bacillus megaterium se nechá růst v 1 litrových kulturách ve standardním solném mediu doplněném 40 mM zdroje uhlíku, uvedeného v následující tabulce, 5 mM chloridu amonného, 80 mM fosfátového pufru a 2 mM aminu, jako indukčního činidla, uvedeného v následující tabulce. Po 30 až 40 hodinách se enzym izoluje a zkouší shora popsaným způsobem.

zdroj uhlíku	specifická aktivita (jednotky/mg)			
	sukcinát	acetát	glukonát	glukosa
R,S-1-fenyl-1- aminoethan	0,27	0,39	n.t.	n.t.
R-1-fenyl-1- aminoethan	0,27	0,36	n.t.	n.t.
R,S-1-fenyl-3- aminobutan	0,28	0,33	0,26	0,62
R-1-fenyl-3- aminobutan	0,21	0,26	n.t.	n.t.
R,S-2-aminobutan	0,13	0,14	n.t.	n.t.
R-2-aminobutan	0,06	0,13	n.t.	n.t.
tyramin	n.t.	0,24	n.t.	n.t.

n.t. = nezkoušeno

### P ř í k l a d 6

V následujícím příkladu je ilustrován růst mikroorganismů za použití zdroje bohatého na proteiny a následující indukce produkce omega-aminokyselina transaminázy přidavkem aminu.

*Bacillus megaterium* se nechá růst ve 12l litrovém fermentoru při pH 7 a teplotě 30 °C a shora uvedeném solném mediu doplněném 10 g/l casamino kyselin.

Obsah fermentoru se míchá a provzdušňuje. Ke směsi se postupně přidá octan sodný až do výsledné koncentrace 120 mM. V tomto okamžiku je hustota buněk 3 g sušiny na 1 litr. 1-fenyl-3-aminobutan se přidává až do celkové koncentrace 10 mM. Po 12 hodinách se enzym oddělí a zkouší shora popsaným způsobem. Jeho specifická aktivita je 0,49 jednotek/mg.

P ř í k l a d 7

Tento příklad ilustruje typickou syntézu chirálního aminu.

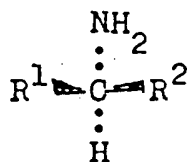
Způsobem popsaným v příkladu 1 se z *Bacillus megaterium* vyrobí rozpustný enzymatický přípravek. Jeho specifická aktivita stanovená shora uvedeným způsobem je 0,58 jednotky/mg. Ke 200 ml vodného roztoku 350 mg tohoto přípravku, 0,4 mM pyridoxalfosfátu a 40 mM fosforečnanu sodného se přidá 4,2 mM 1-fenylbutan-3-onu a 100 ml 2-aminobutanu jako aminodonoru. Směs se inkubuje při pH 7 a 30 °C po dobu 4 hodin, po kteréžto <sup>fenyl-</sup> ~~po kteréžto~~ přičemž po této době je v reakční směsi přítomen R-1-<sup>fenyl-</sup>aminobutan v koncentraci 3,35 mM, což odpovídá 80% konverzi. Produkt se izoluje přidávkem 40 ml 10 N hydroxidu sodného a extrakcí alkalického vodného roztoku 250 ml n-heptanu. Odpařením heptanových extraktů se získá 100,5 g produktu, který byl analyzován shora popsanou derivatizací. Produkt obsahuje 96,4 % S-1-fenyl-3-aminobutanu.

Podobně byl S-1-fenyl-2-aminopropan připraven z 1-fenylpropan-2-onu při ee 96,4 a ve výtěžku 94,8 %. S-1-amino-1-fenylethan byl připraven z aceto-fenonu při ee 100 a ve výtěžku 44 %.

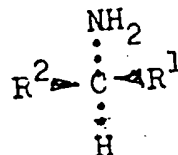
~~11107~~

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Způsob stereoselektivní syntézy jedné chirální formy aminu obecného vzorce IA nebo IB



(IA),



(IB),

kde

R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> představují alkyl nebo arylskupiny, popřípadě substituované enzymaticky neinhibující skupinou, přičemž R<sup>1</sup> se odlišuje od R<sup>2</sup> strukturou nebo chiralitou,

v množství podstatně převyšujícím množství druhé chirální formy, v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že se keton obecného vzorce II



kde R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup> mají stejný význam jako u připravovaného aminu, uvádí do styku s omega-aminokyselina transaminázou v přítomnosti aminodonoru přinejmenším tak dlouho, dokud se nevytvoří podstatné množství jednoho z uvedených chirálních aminů.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í   s e   t í m , že se jako aminodonoru použije 2-amino-butanu, glycinu, alaninu nebo kyseliny aspartové.

