



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

224638

(11) (B2)

(51) Int. Cl.³

C 07 F 9/30
C 07 C 101/04
//A 01 N 57/12

- (22) Přihlášeno 23 12 81
(21) (PV 9717-81)
(32) (31)(33) Právo přednosti od 23 12 80
(P 30 48 612.5) Německá spolková republika
(40) Zveřejněno 25 02 83
(45) Vydáno 15 01 86

(72) Autor vynálezu

GRABLEY SUSANNE dr., KELKHEIM, SAUBER KLAUS dr., BAD SODEN/Ts.
(NSR)

(73) Majitel patentu

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, FRANKFURT/M. (NSR)

(54) Způsob enzymatického štěpení D,L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny

Vynález se týká způsobu enzymatického štěpení D,L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny za účelem výroby L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny.

L-2-amino-4-methylfosfinomásečná kyselina (označována dále jako L-fosfinothricin nebo L-PTC) nebo její soli s organickými nebo anorganickými bázei nebo kyselinami jsou, jak známo také z DOS č. 2 939 269, účinnou složkou chemicky snadno dostupných racemátů. Tyto racemáty mají podle DOS č. 2 717 440 velmi dobrou a širokou herbicidní účinnost proti četným jedno- a dvojděložným, jednoletým a víceletým plevelům. Vzhledem k tomu, že L-PTC a její shora uvedené deriváty jsou oproti racemátům asi dvojnásobně účinné, bylo žádoucí vypracovat postup, který by umožnil získávat L-PTC jednoduchým způsobem ve větším množství.

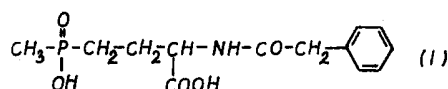
L-2-amino-4-methylfosfinomásečnou kyselinu lze dosud získávat kyselou hydrolyzou (srov. japonský zveřejněný patentový spis č. 73-85538) nebo enzymatickým odbouráváním (srov. japonský zveřejněný patentový spis č. 74-31890) L-PTC-alanylalaninu, tj. mikrobiálně získávaného antibiotika známého z literatury.

V DOS č. 2 939 269 se dále popisuje postup, při kterém se N-acyl-(zejména N-acetyl)-L-PTC štěpí pomocí mikrobiálních acyláz, které byly použity ve formě celých buněk nebo extraktů z buněk a ze zvláště kultivovaných kmenů rodu *Pseudomonas*, *Streptomyces* nebo *Aspergillus*, rychleji než odpovídající D-derivát. Používané acylázy nemají podle údajů DOS žádný účinek nebo mají pouze nepatrný účinek oproti dalším substrátům jako N-acyl-L-PTC-, například oproti N-acylderivátům známých obvyklých L-aminokyselin. PTC izolovaná po zpracování má navíc pouze maximální měrnou otáčivost $[\alpha]_D^{22} = 23^\circ$ ($c = 1$, 1N, HCl), což odpovídá optické čistotě pouze asi 75 %.

Pokusy však ukázaly, že na trhu obvyklé acylázy, jako acyláza I (aminoacyláza z ledvin prasat, EC 3.5.1.14) nebo mikrobiální AMANO-acyláza, které se u přirozených aminokyselin dobře hodí ke štěpení racemátu, nevykazují žádnou aktivitu u D,L-acyl-PTC. To potvrzuje údaje z DOS č. 2 939 269, podle kterých je k fermentační výrobě acyláz aktivních vůči PTC zapotřebí nákladného mikrobiálního postupu (Screening). Také další enzymy, například proteolytické enzymy s esterázovou aktivitou, které mají u běžných D,L-aminokyselin vysokou aktivitu a selektivitu, nemají u esterů D,L-PTC vůbec žádnou aktivitu nebo mají pouze silně sníženou aktivitu.

S překvapením bylo nyní zjištěno, že acyláza penicilinu G deacyluje fenacetylovaný D,L-PTC nejen s neobvykle vysokou reakční rychlostí, která se blíží reakční rychlosti deacylace přírodního penicilinu G, nýbrž že má také ve srovnání s mikrobiálními acylázami popsanými v DOS č. 2 939 269 značně zvýšenou selektivitu, která způsobuje mimořádně vysokou čistotu vzniklého L-PTC.

Předmětem vynálezu je způsob enzymatického štěpení D,L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny za účelem získání L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny, který spočívá v tom, že se na odpovídající N-fenacetylderivát vzorce I



působí ve vodném prostředí acylázou penicilinu G.

Je sice známo, že u určitých fenacetylovaných běžných D,L-aminokyselin je možná selektivní hydrolýza acylázou penicilinu získanou z *E. coli* za vzniku volné L-aminokyseliny (srov. britský patentový spis č. 1 369 462; Bioorganická Chimie 5 /1979/, 604 a další). Je však také známo, že změnami na části aminokyseliny substrátu dochází ke značnému snížení enzymatické aktivity acylázy penicilinu G (A. Plaskie a další, J. Antibiotics 31, 783 /1978/). Nebylo proto možno očekávat, že pomocí acyláz penicilinu G používaných podle vynálezu se může získat L-PTC ve vysoké čistotě.

Při postupu podle vynálezu vzniká směs z L-PTC a N-fenacetyl-D-PTC, jakož i z fenyl-octové kyseliny, ze které je možno L-PTC snadno oddělit známým způsobem. Tak například lze, popřípadě po filtraci, vést vodný reakční roztok kolonou naplněnou silně kyselým katexem v H^+ -cyklu. Zatímco N-fenacetyl-D-PTC a fenyl-octová kyselina kolonou procházejí, L-PTC se adsorbuje na pryskyřici. Vymývání se potom může provádět známým způsobem zředěnou chlorovodíkovou kyselinou nebo amoniakem. Eluát lze popřípadě čistit aktivním uhlím a podrobovat sušení vymrazováním nebo lze zahuštěný eluát přivést ke krystalizaci.

Výchozí látky vzorce I se získají o sobě známým způsobem, například reakcí dvojsodné soli D,L-PTC fenacetylchloridem při teplotě -5 až $+5$ °C za současného přidavku ekvimolárního množství hydroxidu sodného. Reakční směs se může přímo podrobit štěpení, popřípadě lze N-fenacetyl-D,L-PTC získat také v krystalické formě okyselením chlorovodíkovou kyselinou nebo sírovou kyselinou. Enzymaticky nerozštěpenou N-fenacetyl-D-PTC lze po oddělení fenyl-octové kyseliny pomocí etheru nebo dichlormethanu přeměnit hydrolýzou ve zředěné chlorovodíkové kyselině při teplotě 80 °C na D-PTC a tu lze po racemizaci znovu podrobovat enzymatickému štěpení.

Acylázami nebo amidázami penicilinu se rozumí takové enzymy, které mohou štěpit penicilin na 6-aminopenicilanovou kyselinu. Acylázy penicilinu G, které jsou vhodné pro postup podle vynálezu, tvoří prokaryonní mikroorganismy, jako *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium* a další (M. Cole a další, Meth. Enzym. 43, 698 /1975/) a jsou známy pod E. C. č. 3.5.1.11. Zvláště výhodnou je amidáza penicilinu G z *E. coli* ATCC 11 105.

Acylázu penicilinu G používanou podle vynálezu lze používat ve formě volného, ve vodě

rozpuštěného lyofilizátu nebo ve formě nerozpustné ve vodě vázanou na nosiči (srov. DOS č. 2 732 301) ve vodném roztoku, který může mít koncentraci substrátu 0,1 až 20 %, výhodně 4 až 6 %. Reakční teplota se pohybuje v rozmezí 10 až 60 °C, výhodně 20 až 40 °C, reakční doba činí podle koncentrace substrátu a koncentrace enzymu, popřípadě podle aktivity enzymu, 1 až 48 hodin. Dostatečnou enzymatickou aktivitu lze pozorovat při pH 3 až 9, výhodně při pH 6 až 8. Reakce se může provádět ve fosfátovém pufru nebo také bez fosfátového pufru. Reakci s enzymem vázaným na nosiči lze provádět diskontinuálně nebo na sloupcích. Při postupu na sloupci se přes fixovaný enzym jakožto stacionární fázi ve sloupci kontinuálně vede roztok substrátu až do úplné deacylace N-fenylacetyl-L-PTC.

Průběh a konec reakce se mohou sledovat pomocí polarimetrických metod nebo kvantitativní analýzou vzniklé volné aminokyseliny reakcí s ninhydrinem známou z literatury a spektrálně fotometrickým stanovením obsahu.

Ve vysokém výtěžku získaná L-PTC má otáčivost $[\alpha]_D^{22} = +28,5^\circ$ ($c = 1$, 1 N HCl), což odpovídá optické čistotě nejméně 90 % (příslušná forma 95 %).

Příklady uvedené v následující části slouží k bližšímu objasnění vynálezu.

Příklad 1

10 g (33,4 mmol) N-fenylacetyl-D,L-PTC se suspenduje v malém množství redestilované vody, přidáním 1 N roztoku hydroxidu sodného se hodnota pH upraví na 7,8 a roztok se doplní redestilovanou vodou na objem 500 ml. Po přidání 15 mg acylázy penicilinu G z E. coli (aktivita asi 2,9 u/mg; substrát: draselná sůl penicilinu G, reakční teplota 37 °C) se reakční směs nechá stát při teplotě místnosti. Po 15 hodinách byla zjištěna snížením obsahu volné aminokyseliny zbarvením vzorku ninhydrinem asi 50% konverze. Po okyselení koncentrovanou chlorovodíkovou kyselinou na pH 2 až 3 a filtrací se čirý vodný roztok substrátu vede kolonou, která obsahuje 150 g Dowexu^(R) 50 W x 2 (v H⁺ - cyklu). Kolona se promývá vodou až do získání neutrálního eluátu a až již nelze prokázat přítomnost chloridových iontů. Potom se nechá volná aminokyselina eluovat 0,8 N roztokem chlorovodíkové kyseliny ve směsi ethanolu a vody (80:20) ve formě hydrochloridu. Ze zahuštěného eluátu se získá čistý PTC-hydrochlorid o teplotě tání 199 až 200 °C. Výtěžek 3,3 g (15,2 mmol), tj. asi 45,4 % teorie. Z hydrochloridu se obvyklým způsobem přidáním asi dvojnásobného molárního množství propylenoxidu k ethanolickému roztoku substrátu izoluje volná krystalická L-aminokyselina. Teplota tání 217 až 219 °C, $[\alpha]_D^{22} = +28^\circ$ ($c = 1$, 1 N HCl).

Příklad 2

60 g (200,5 mmol) N-fenylacetyl-D,L-PTC se suspenduje v malém množství vody, přidáním hydroxidu sodného se hodnota pH upraví na 8,0, vodou se objem doplní na 1 liter a přidá se 6 g fixované acylázy penicilinu G (aktivita asi 80 μg, substrát: draselná sůl penicilinu G, reakční teplota 37 °C, výroba nosiče podle DOS č. 2 732 301). Po 1,5 dnu míchání při teplotě místnosti se roztok substrátu odfiltruje od katalyzátoru nerozpustného ve vodě a filtrát se vede přes kolonu, která je naplněna 750 g silně kyselého katexu, a analogickým způsobem, jak je popsáno v příkladu 1, se reakční roztok dále zpracovává. Získá se 20 g (92 mmol, tj. asi 46 %) L-PTC-hydrochloridu o teplotě tání 199 až 201 °C. Měrná otáčivost $[\alpha]_D^{22} = 23,3^\circ$ ($c = 0,6$, 1 N HCl), což odpovídá molární otáčivosti $[\alpha]_D^{22} = 50,7^\circ$. Volná L-PTC získaná po působení propylenoxidu má teplotu tání 216 až 217 °C a měrnou otáčivost $[\alpha]_D^{22} = +28,5^\circ$ ($c = 1$, 1 N HCl) odpovídající molární otáčivosti $[\alpha]_D^{22} = 51,6^\circ$.

Příklad 3

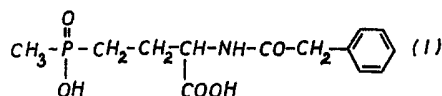
Ke zjištění stálosti acylázy penicilinu G vázané na nosiči, která se používá v příkladu 2, vůči N-fenylacetyl-D,L-PTC, se 100 g fixovaného enzymu smísí s 10 ml 5% vodného roztoku N-fenylacetyl-D,L-PTC (pH 7,8, stabilizováno přidávkem malého množství fosfátového pufru)

a směs se míchá při teplotě místnosti. Vždy po 24 hodinách se roztok substrátu odfiltruje a oddělený ve vodě nerozpustný enzym se znovu podrobí působení roztoku racemického substrátu. Aktivita enzymu se zjišťuje stanovením obsahu volné PTC po 45 minutách a po 2,5 hodinách zbarvením vzorku ninhydrinem.

Po 8 týdnech nebylo možno zjistit žádné podstatné snížení podílu PTC po 45 minutách reakční doby (asi 20 % vztaženo na použitý racemát). Po 22,5 hodině bylo v každém případě hydrolyzováno 50 % použitého racemátu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob enzymatického štěpení D,L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny pro získání L-2-amino-4-methylfosfinomásečné kyseliny, vyznačující se tím, že se na odpovídající N-fenacetylderivát vzorce I



působí ve vodném prostředí acylázou penicilinu G.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá acylázy penicilinu G z E. coli, s výhodou z E. coli ATCC 11105.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se používá acylázy penicilinu G přítomné ve formě volného lyofilizátu.

4. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se používá acylázy penicilinu G vázané na nosiči.