



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**218 409 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 02560  
(22) A bejelentés napja: 1994. 03. 03.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
9304256.2 1993. 03. 03. GB  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 94/00630  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/20633

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**C 12 P 41/00**

C 12 P 7/40

(40) A közzététel napja: 1996. 07. 29.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2000. 08. 28.

(72) Feltalálók:

Warneck, Julie Belinda Hazel, Huntingdon,  
Cambridgeshire (GB)  
Wisdom, Richard Anthony, Impington,  
Cambridgeshire (GB)

(73) Szabadalmaz:

Laboratorios Menarini S. A., Badalona (ES)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

### **Eljárás (S)-2-(3-benzoil-fenil)-propionsav előállítására**

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás legalább 93% enantiomer-többsletű (S)-2-(3-benzoil-fenil)-propionsav előállítására 2-(3-benzoil-fenil)-propionsav valamely alkil-észtere enantiomerjeinek a keverékéből.

A találmány szerint biokatalizátorként egy Ophios-toma nemzetségbe tartozó mikroorganizmust alkalmaznak.

A találmány tárgya eljárás (S)-2-(3-benzoil-fenil)-propionsav előállítására.

Számos 2-aril-propionsav jól ismert gyulladáscsökkentő hatóanyag. Ilyenek például az ibuprofen, naproxen és ketoprofen. E vegyületek királis jellegűek, és ma már jól megalapozott tény, hogy terápiás hatásuk túlnyomórészt az (S)-enantiomernak tulajdonítható.

A szennyező (R)-enantiomertől mentes (S)-enantiomer előállítására több módszer ismert. Ilyen eljárás például az aszimmetrikus kémiai szintézis, valamint a kémiai rezolválás, például a különböző, királis aminokkal alkotott diasztereomer sók elkülönítésére alkalmas kristályosítása.

Az elválasztás egy másik lehetősége a biokatalitikus módszer olyan biokatalizátor használatával, amely a 2-aril-propionsav valamely észterének hidrolízisét szelektíven katalizálja. Ha megfelelő sztereospecifitással rendelkező biokatalizátor áll rendelkezésre, akkor az egyik enantiomer reagálatlan észterét, valamint a másik enantiomernek megfelelő savat tartalmazó reakcióelegy kapható. Ezt követően a termék elkülönítése és kinyerése viszonylag könnyű. Az el nem reagált észter racemizálható, egy következő reakcióban ismét felhasználható, s ez biztosítja a racém szubsztrátum csaknem teljes konverzióját a kívánt egyedi enantiomer terméké.

Az EP-A-0 227 078 számú európai szabadalmi dokumentumban több extracelluláris (sejten kívüli), kereskedelmi forgalomból beszerezhető, mikrobákból származó lipáz alkalmazását közölték biokatalitikus rezolválás céljára. Általában azonban nagy mennyiségű enzim szükséges, és a reakció 2-6 napig tart. Az ilyen reakciók kivitelezése tehát költséges lenne. A legjobbnak talált enzimpár a *Candida cylindracea*-ból származik (amelyet *Candida rugosa* néven is ismernek); az EP-A-0 407 033 számú európai szabadalmi dokumentum szerint azonban kimutatták, hogy ez a készítmény – amellet, hogy aktivitása csekély – egynél több, észterázhatással rendelkező enzimet tartalmaz. Továbbá nagy enantiomer-többségű ketoprofen előállítása céljából ezt a készítményt meg kellett tisztítani.

Az EP-A-0 233 656 számú európai szabadalmi dokumentumban *Bacillus thuringiensis* származó észteráz gén izolálását és klónozását közölték. Kimutatták, hogy az enzim mind a naproxen, mind az ibuprofen etil- és metil-észterét szelektíven hidrolizálja, s így az észtereknek megfelelő (S)-enantiomer sav nyerhető. Kimutatták továbbá, hogy az enzim klónozásával nagyobb enantiomer-többségű terméket eredményező készítmény érhető el, ami más enzimek mellékhatásai minimálissá tételének az eredménye. A WO-A-9323547 számon közzétett nemzetközi PCT szabadalmi dokumentumban számos törzset írtak le, amelyek naproxen-észtereit szelektíven hordozó észterázt termelnek. A legkedvezőbb törzsnek a *Zopfiella latipest* találták, az ebből eredő észterázt klónozták.

A WO-A-9304189 számon közzétett nemzetközi PCT szabadalmi bejelentésben olyan *Trichosporon* specieshez tartozó mikroorganizmust ismertettek, amely képes a ketoprofen-etil-észter (S)-enantiomerjének szelektív hidrolízisére, s így 90%-nál nagyobb enantio-

mer-többségű (S)-sav kapható. E biotranszformációt katalizáló enzim intracelluláris (sejten belüli). Mivel stabilis, sejtmentes készítmények előállítása nehéznek bizonyult, nehéznek mutatkozott a biokatalitikus aktivitás fokozása a gén klónozása vagy klasszikus mutagenézis útján.

Mindezek alapján a találmány célja olyan biokatalizátor előállítása, amelynek aktivitása a ketoprofen különböző észtereivel szemben kedvező; megfelelő enantiomer-többségű ketoprofen-savterméket eredményez; és alkalmas lehet klónozásra és hiperexpresszióra (fokozott kifejezésre) – például *E. coli*-ban – a biokatalizátor költségeinek minimálissá tétele céljából.

A találmányt az alábbiakban foglaljuk össze.

Meglepő módon, különböző forrásokból származó mikroorganizmusok szűrővizsgálata azt mutatta, hogy az *Ophiostoma novo-ulmi* (amely *Ceratocystis ulmi* néven is ismert) ascomyceta mikroorganizmus a kívánt reakciókatalízisre alkalmas, intracelluláris hidrolizáló enzimet termel. További vizsgálatok igazolták, hogy – a WO-A-9304189 számon közzétett PCT nemzetközi szabadalmi bejelentésben leírt törzstől eltérően – stabilis, sejtmentes aktivitást kaptunk, amely ennek alapján klónozásra alkalmas volt, és lehetségessé vált az alkalmazása sejtmentes biotranszformációkban. Az *Ophiostoma novo-ulmi* növényi patogén (kórokozó), amely virulens előidézője a „Dutch Elm” növényi betegségnek (legelőször Hollandiában megfigyelt szilfa-betegség). Ismert, hogy ez a mikroorganizmus a kevésbé fertőző *Ophiostoma ulmi* és *Ophiostoma piceae* törzsek közeli rokona.

A találmányt megalapozó első felismerésünket követve azt találtuk, hogy más *Ophiostoma novo-ulmi*, *Ophiostoma ulmi* (esetenként *Ceratocystis ulmi* néven ismert) és *Ophiostoma piceae* (esetenként *Ceratocystis piceae* néven ismert) egyéb törzseiben is sztereospecifikus észteráz-enzimaktivitás mutatható ki; valamint az Egyesült Államok, Európa, a Közép-Kelet és Üzbegisztán különböző helyeiről származó izolátumokban is ugyanilyen enzimaktivitás figyelhető meg. Szűrővizsgálatnak vetettük alá továbbá a *Ceratocystis* sp. IMI-intézményből származó (Egham, Surrey, Egyesült Királyság), más törzseinek aktivitását is. Felismertük, hogy a *C. coronata* (például IMI 1765333), *C. Ips* (például IMI 2121114), *C. tetropii* (például IMI 212117), *C. cainii* (például IMI 176523), *C. arborea* (például IMI 176529) és *C. stenoceras* (például IMI 268494) törzsekben is megtalálható ez az aktivitás. Úgy látszik tehát, hogy ez az aktivitás a világ különböző helyeiről összegyűjtött, különböző *Ceratocystis* törzsek tartományában széleskörűen elterjedt.

A szűrővizsgálatnak alávetett, eredeti izolátum egy törzsét – amelyet e leírásban AJ3-nak jelölünk – az IMI-intézményben 1993. február 15-én IMI 356050 katalógusszám alatt a Budapesti Egyezmény kívánalmainak megfelelően letétbe helyeztük. Ez a törzs jó példát mutat az aktivitásra; mivel azonban ez az aktivitás rokon törzsek igen változatos fajtáiban is elterjedt, a találmány oltalmi köre nem korlátozódik ezekre a külön említett organizmusokra. A találmány továbbá az ilyen

mikroorganizmusokból bármilyen alkalmas technológiai eljárással izolált enzimaktivitás alkalmazására is kiterjed.

A találmány szerint az *Ophiostoma* nemzetséghez tartozó mikroorganizmusok és azok enzimaktivitása felhasználható a ketoprofen racém alkil-észtereinek sztereoselektív hidrolízisére, aminek útján lényegesen fel-dúsított (S)-enantiomer sav, például 93–96%-os, vagy még ennél is nagyobb enantiomer-többségű sav nyerhető; és visszamarad az (R)-enantiomerben feldúsult észter. E reakció az észter-enantiomerek bármely keverékével végrehajtható, jóllehet általában a racemátot alkalmazzuk. Az észter alkilcsoportja előnyösen 1–3 szénatomos. A reakciót előnyösen 8–11, még előnyösebben 9,5–10,5, legelőnyösebben körülbelül 10 pH-értéken végezzük. Általában valamilyen szerves oldószert, például ciklohexánt használunk.

A savterméknek észtertől való elkülönítésére standard kémiai eljárásokat alkalmazhatunk. Szükség esetén a sav optikai tisztasága királis amin, például (R)- $\alpha$ -metil-benzil-amin alkalmazásával javítható. A visszamaradó, át nem alakult észter további felhasználás céljából racemizálható.

A találmányt az alábbi, nem korlátozó jellegű példákban részletesen ismertetjük.

#### 1. példa

##### Racém ketoprofen-etil-észter biotranszformációja AJ3 alkalmazásával

Az organizmus tenyésztéséhez az alábbi összetételű közeget használjuk.

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0 g/l
Élesztőkivonat	10,0 g/l
Glükóz	5,0 g/l
Nyomelemoldat	100 µl/l
pH (NaOH-dal beállítva)	6,5

A nyomelemoldat összetétele az alábbi:

CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	3,57 g/l
ZnO	2,0 g/l
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,85 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4,8 g/l
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,0 g/l
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5,4 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,3 g/l
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,4 g/l
HCl	250 ml/l

Az AJ3-sejteket malátakivonatos agarlemezről 30 ml tenyésztőközegbe oltjuk 250 ml-es terelőlemez lombikban, majd 30 órán át 23 °C hőmérsékleten rázatjuk, és ezt követően 2,5 ml-t egy második, 250 ml-es, 30 ml közeget tartalmazó, terelőlemez lombikba viszünk át. A tenyésztést 40 órán át rázás közben, 23 °C-on végezzük, majd az így kapott elegyhez 20 g/l koncentrációban racém ketoprofen-etil-észtert adunk. A biotranszformációt 120 órán át hagyjuk végbemenni; ez időpontban végzett HPLC-elemzés szerint a hozzáadott észter 18,2%-a hidrolizál. Az így kapott ketoprofen-

savtermék enantiomer-többségét 96%-nak találtuk az (S)-enantiomer javára.

#### 2. példa

##### A szerves oldószerek befolyása

Az 1. példában leírttal azonos tenyésztőközeggel, nyers enzimoldatot állítunk elő 6,0 pH-értékkel, glükóz nélkül. Az AJ3-sejteket 1 literes rázólabdikban elhelyezett 100 ml közegre oltjuk, majd ezt a tenyésztet rázást közben 48 órán át 30 °C-on tenyésztjük. Ezután 10 ml térfogatát 1 literes rázólabdikban elhelyezett 90 ml Tris-közegbe visszük át, és rázást közben 8 órán át 30 °C hőmérsékleten tovább tenyésztjük. Ennek a lombiknak a tartalmát használjuk egy 2,8 literes, laboratóriumi fermentorban elhelyezett, 1,5 liter közeget, 5 g/l glükózt és 0,5 ml/l szilikon/PPG-alapú habzsgátlót (XF0371, Ivahoe Chemicals, III. USA) tartalmazó közeg oltására. A fermentort 48 órán át keverés közben, levegőzéssel működtetjük, mielőtt a levegővel való telítettséget 50%-nál magasabb értékre, a hőmérsékletet 30 °C-on és a pH értékét 6,0-on tartjuk.

A fermentálás befejezése után a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, és az így kapott pelletet 10 tömeg/térfogat% koncentrációban (a sejtek nedves tömegére vonatkoztatva) lizáló (lízisre alkalmas) pufferoldatban, azaz 0,1 M nátrium-karbonátot tartalmazó, 5% Triton X-100 vizes oldatában ismét szuszpendáljuk. A lizist éjszakán át, rázást közben 8 °C hőmérsékleten végezzük, majd az enzimaktivitást tartalmazó lizátumot a sejttöredékektől centrifugálással elkülönítjük.

A racém ketoprofen-etil-észtert négyféle oldószerekben – toluolban, ciklohexánban, metanolban és metil-t-butil-éterben (röviden MTBE) – 20 g/l koncentrációban oldjuk. Ezekből az oldatokból üvegampullákban elhelyezett, 5 ml alikvot nyers enzimoldathoz 2 ml oldatot adunk. Egy üvegampullában előkészítjük a vizes biotranszformációt, amely – mint kontroll – 5 ml nyers enzimoldatot, 400 µl 50%-os racém ketoprofen-etil-észtert, 0,5 tömeg/térfogat% Tween 80 törzsoldatot és 2,5 tömeg/térfogat% Triton X-100-at tartalmaz. Valamennyi mintát 48 órán át 25 °C hőmérsékleten rázattal reagáltatjuk. A reakcióelegy vizes fázisának az elemzésével az 1. táblázatban bemutatott eredményekhez jutunk.

#### 1. táblázat

##### Racém ketoprofen-etil-észter hidrolízise kétfázisú biotranszformációval

A minta oldószere	Savtermelés (mg/ml)	Konverzió (%)
Víz	2,3	6,2
Toluol	0,1	1,3
Ciklohexán	1,1	14,1
Metanol	0,4	4,6
MTBE	0,7	8,3

Megfigyelhető, hogy a biotranszformáció bizonyos mértékig végbemegy ciklohexán vagy MTBE mint ol-

dószert jelenlétében, azonban toluol – ilyen körülmények között – igen erősen gátolja.

### 3. példa

#### Az alkilcsoport befolyása

A racém ketoprofen különböző észtereit 20 g/l koncentrációban ciklohexánban oldjuk; e célra a metil-, etil-, n-propil-, n-butil-, n-pentil- vagy n-hexil-észtert alkalmazzuk. A metil-észter esetében szuszpenziót készítünk, mivel ez az észter ciklohexánban csak kevésbé oldódik.

A nyers enzímoldat 5 ml alikvot részleteihez üvegampullában a fenti, hatféle racém ketoprofen-észter-oldatok mindegyikének 2 ml-es térfogatát adjuk. Biotranszformációs, vizes kontrollt készítünk üvegampullában, amely 5 ml nyers enzímoldatból, 200 µl 50%-os racém ketoprofen-etil-észter-oldatból, 0,5% Tween 80 törzsoldatból és 2,5 tömeg/térfogat% Triton X-100-ból áll. A reakciókat 24 órán át 25 °C hőmérsékleten rázatással játszattuk le. Ekkor a biotranszformációs reakciók vizes fázisának HPLC-elemzése a 2. táblázatban bemutatott eredményeket adja.

### 2. táblázat

Racém ketoprofen-észterek hidrolízise kétfázisú biotranszformációval

Ketoprofen-észter	Savtermelés (mg/ml)	Konverzió (%)	Enantiomer-többség (S)-enantiomer (%)
Vizes kontroll	4,6	22,9	90
Metil-észter	1,7	42,3	90
Etil-észter	1,1	27,5	100
n-Propil-észter	1,0	25,6	86
n-Butil-észter	0,3	8,0	N/D
n-Pentil-észter	0,18	4,4	N/D
n-Hexil-észter	0,09	2,3	N/D

N/D: a csekély savtermelés miatt nem határoztuk meg

### 4. példa

#### AJ3 lizátumának az előállítás

Az AJ3 lizátumot az alábbi módszerrel növeljük 500 literes méretre.

Az AJ3 lizátumot – mint az 1. példában leírtuk – 1 literes terelőlemez lombikban 100 ml közegre oltjuk (lásd az 1. példát). Ezt követően az elegyet 48 órán át 25 °C hőmérsékleten körforgással rázzuk [300 rpm (percenkénti fordulatszám), 25 mm rázási szélesség], majd ebből 1 ml térfogatot három, egyenként 100 ml közeget tartalmazó 1 literes terelőlemez lombikba viszünk át. A tenyészeteket további 48 órán át azonos körülmények között növesztjük, majd 500 liter közeget tartalmazó 750 literes fermentorba oltjuk. A fermentorban az alábbi közeget alkalmazzuk:

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,4 g/l
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0 g/l

Élesztőkivonat	30,0 g/l
Nyomelemoldat	200 µg/l (mint 1. példában)
Habzágató (XFO-371)	0,5 ml/l
5 pH (NaOH-dal beállítva)	6,0

Ezt a közeget 121 °C hőmérsékleten 50 percig sterilizáljuk, majd 15 liter 50 tömeg/térfogat%-os, steril glükózoldatot adunk hozzá.

Szabályozott feltételek: 25 °C hőmérséklet; pH=6,0 (foszforsav vagy nátrium-hidroxid hozzáadásával); levegővel való telítettség legalább 50%; a keverést és levegőztetést is szabályozzuk.

64 órás tenyésztés után a sejteket kezeléssel in situ elöljük, és a lizist elősegítjük. Ezt úgy érjük el, hogy a hőmérsékletet 15 °C-ra csökkentjük, és nátrium-hidroxid hozzáadásával a pH értékét 10-re állítjuk. 50 perces kezelés után a fermentációs folyadékot foszforsavval ismét pH 7-re állítjuk, és a sejteket folyamatos centrifugálással összegyűjtjük. Az összegyűjtött sejteket különböző tartóedényekbe osztjuk, és felhasználásig –20 °C hőmérsékleten tároljuk.

A mélyhűtött (fagyasztott) sejteket felengedni hagyjuk, és 25 tömeg/térfogat%-os koncentrációban (a nedves sejtömegekre vonatkoztatva) 6,5 pH-értéken 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-oldatban ismét szuszpendáljuk. 30 perces keverés után a sejteket centrifugálással összegyűjtjük, utána a sejteket 25 tömeg/térfogat%-os koncentrációban (a nedves sejtömegekre vonatkoztatva) lízishez alkalmas pufferoldatban (0,3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH=10,5) ismét szuszpendáljuk. A lizist másnapig végezzük 4 °C hőmérsékleten keverés közben, majd a lizátumot centrifugálással derítve, a sejtörmelékkel a felülúszótól elkülönítjük. Az enzímoldat (azaz a lizátum felül úszó része) aktivitását standard biotranszformációs körülmények alkalmazásával határozzuk meg, a következőképpen: 1 ml enzímoldatot 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-tal megfelelően hígítva; pH=10,0; 40 µl 50%-os racém ketoprofen-etil-észter-oldat; 0–5% Tween 80 törzsoldat; 2,5 tömeg/térfogat% Triton X-100. A biotranszformációkat 20 ml térfogatú, zárt üvegampullákban 1 órán át rázatással 25 °C hőmérsékleten végezzük. Az aktivitást U/ml-ben fejezzük ki, ahol 1 egység (U) azt jelenti, hogy óránként 25 °C hőmérsékleten 1 mg ketoprofensav termelődik. Az enzímoldatokat célszerűen úgy hígítjuk, hogy a mért aktivitás az 1–5 U/ml tartományba essék.

Az 50%-os racém ketoprofen-etil-észter törzsoldatot a következőképpen készítjük: 10 ml desztillált vízhez 25 g racém ketoprofen-etil-észtert és 0,25 g Tween 80-at adunk, majd a keveréket 5 percig ultrahanggal kezeljük (15 µm amplitúdó, 10 másodperces bekapcsolási és 10 másodperces kikapcsolási ciklussal). Ezután a térfogatot desztillált vízzel 50 ml-re töltjük, és a törzsoldatot autoklávban sterilizáljuk. Így hosszabb időn át tárolható.

A lizátumok aktivitása általában 1,5 U/ml-nek adódott.

### 5. példa

#### Hidrolitikus aktivitású enzímtermék elkülönítése és tisztítása

A 4. példában előállított, derített lizátumot desztillált vízzel szemben dializáljuk (dialízissel szűrjük) (Amicon DC2 ultraszűrő egység, 30 000 molekulatömeg-méretehatárú üreges rosttöltettel), amíg a lizátum vezetőképessége egy 20 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot tartalmazó, 9,2 pH-értékű pufferoldat („A” puffer) vezetőképességét el nem éri. Ezután az oldatot negyedére-ötödére töményítjük, ekkor általában a kezdeti aktivitásnak több mint 90%-a megmarad. Az enzimaktivással bíró terméket (enzimterméket) 1 órán át környezeti hőmérsékleten, tételenként, előzőleg egyensúlyba hozott QA52 anioncserélő gyantára helyezük (beszerzési helye: Pharmacia); 7–10 U enzimaktivitást töltünk rá a nedves QA52 gél 1 ml-ére vonatkoztatva. A töltött gélt oszlopba helyezük 200 mm/óra lineáris áramlási sebesség mellett. Ezt követően a kromatográfiát 4 °C hőmérsékleten hajtjuk végre.

Az oszlopot az „A” pufferoldattal alapszintig mosuk. Gradiens eluálást végzünk az oszlop térfogatának tízszeresében vett, 0–0,5 M nátrium-kloridot tartalmazó „A” pufferoldattal; a gradiens térfogat 1/35 részének megfelelő térfogatú frakciókat veszünk. Az így nyert eluálás általános profilját a 3. táblázatban szemléltetjük.

3. táblázat

A QA52-n végzett kromatográfia első fokozatának elúciós profilja

Frakció	Összes aktivitás (U)	Hozam
Töltet	99	–
Átfolyás (átáramlás)	0	0
Mosás	0	0
1.	0	0
5.	0,3	0,3
6.	2,0	2,0
7.	6,6	6,7
8.	19,5	19,7
9.	22,2	22,4
10.	10,0	10,1
11.	2,5	2,5
13.	1,0	1,0
17.	0,3	0,3

Az aktív anyagot a 0,12–0,18 M koncentrációban konyhasót tartalmazó pufferoldattal eluáljuk.

A 7–10. frakciókat egyesítettük, s így az egyesített frakció aktivitásának hozama 63,5%-nak, az egyesített frakció fehérjehozama 15,8%-nak adódott.

Az egyesített frakciót – amely az aktivitást tartalmazza – YM 30 membrán alkalmazásával, keverőcellás ultraszűrő egység (AMICON) használatával aktivitási veszteség nélkül töményítjük, és az „A” pufferoldattal szemben dializáljuk, amíg vezetőképességének az értéke a 3,2–3,6 mS értéket el nem éri. Az így ka-

pott oldatot QA52 gyantán ismét kromatografálva a 4. táblázatban bemutatott eredményekhez jutunk.

4. táblázat

A QA52-n végzett kromatográfia második fokozatának elúciós profilja

Frakció	Összes aktivitás (U)	Hozam (%)
Töltet	3111	–
Átfolyás (átáramlás)	0	0
Mosás	0	0
13.	60	1,9
14.	193	6,2
15.	407	13,1
16.	828	26,6
17.	890	28,6
18.	445	14,3
19.	152	4,9
20.	81	2,6

Ebben a második fokozatban az aktív anyagot a 0,2–0,25 M koncentrációban konyhasót tartalmazó pufferoldattal eluáljuk.

A 15–17. frakciókat egyesítettük, és egy mintájában az aktivitást és a fehérjetartalmat meghatároztuk.

Aktivitás: 27,8 U/ml

30 Összes aktivitás: 2599 U

Az összes aktivitás hozama: 83,5%

Fehérje (a biuret módszerrel mérve): 1,34 mg/ml

Összes fehérje: 125 mg

Az összes fehérjehozam: 5,5%

35 Az egyesített frakciót Pharmacia MONO P HR 5/5 előre betöltött FPLC anioncserélő gyanta használatával tovább tisztítjuk, a következő kromatográfias körülmények között:

40 Kis sótartalmú pufferoldat: 20 mM etanolamin-HCl, pH=9,0; nagy sótartalmú pufferoldat: 20 mM etanolamin-HCl plusz 0,3 M nátrium-klorid, pH=9,0; áramlási sebesség: 1 ml/perc.

A gradiens profilja

Idő NaCl-koncentráció

0–5. perc : 0 M

5–7. perc : 0–0,1 M

7–20. perc : 0,1–0,3 M

20–22. perc : 0,3 M

22–23. perc : 0,3–0 M

23–25. perc : 0 M

50 A minta térfogata: 1 ml

Frakciótérfogat: 1 ml

55 A második fokozatú QA52 kromatográfiából származó, egyesített frakciókat 30 000 molekulatömeg-méretehatárú ultraszűrő membránon a tizedére töményítjük, és az így kapott koncentrátumot a kis sótartalmú pufferoldattal Pharmacia G–25 PD10 gélszűrő oszlop alkalmazásával HPLC céljára sómentesítjük. A HPLC-oszlopra tételenként megközelítőleg 5 mg összes fehérjét töltünk. Így az 5. táblázatban látható elúciós profiljuk.

5. táblázat  
A mono P anioncserélő HPLC során kapott elúciós profil

Frakció (perc)	Aktivitás (U/ml)	Hozam (%)
Töltet	104,0	–
8.	5,7	5,5
9.	63,8	61,3
10.	28,3	27,2
11.	7,5	7,2
12.	1,9	1,8
13.	0,0	0,0

A 9. és 10. frakciókat egyesítve az összes aktivitásra vonatkoztatott hozam 88,5%-nak adódik. Az egyesített aktív anyagot méretkizáró HPLC-módszerrel tovább tisztítjuk.

A soron következő elkülönítés céljára 30 cm×7,8 mm méretű Analgel–TSK G3000 SWXL méretkizáró HPLC-oszlopot alkalmazunk az alábbi kromatográfiás körülményekkel:

Pufferoldat: 0,1 M  $K_2HPO_4$  20 mM  $Na_2EDTA$ , pH=7,0

Áramlási sebesség: 0,4 ml/perc

A minta térfogata: 200  $\mu$ l

Frakciótérfogat: 400  $\mu$ l

A MONO P ioncserélő HPLC-folyamatból származó, egyesített frakciót 1,5-szeresére töményítjük egy 10 000 molekulatömeg-méretű ultraszűrő membrán használatával. A betöményített mintát méretkizáró HPLC pufferoldattal sómentesítjük Pharmacia G25 pd10 oszlopon. Így a 6. táblázatban bemutatott elúciós profil alakul ki.

6. táblázat  
Méretkizáró HPLC-eljárással kapott elúciós profil

Frakció (perc)	Aktivitás (U/ml)	Hozam (%)
Töltet	131,0	–
17,5	0,0	0
18,5	0,0	0
19,5	1,5	2,3
20,5	13,3	20,3
21,5	7,5	11,5
22,5	2,6	4,0
23,5	0,8	1,2

Saját A73 jelű racém ketoprofen-etil-észter észterünk molekulatömegét az SDS–PAGE (nátriumdodecil-szulfát-poliakrilamid gél elektroforézis) módszerrel mértük. Előre kialakított, 12%-os homogén SDS–PAGE minigél (BDH) alkalmaztunk, amelyet a fehérjék molekulatömegének standard jelzőivel (DISC) előzőleg megfestettünk, a molekulatömegek összeha-

sonlítása céljából. A kifejlesztéshez pufferoldatként Electrograd Buffer TTS (BDH) puffert alkalmaztunk.

Az elektroforézist állandó feszültségen (200 V) és állandó határárammal (gélenként 40 mA) hajtjuk végre, amíg a kék festékanyag frontja a gélen teljesen át nem halad. A fehérjét Coomassie Blue festékanyaggal tettük láthatóvá.

Az észteráznak megfelelő fehérje sávját aktív és inaktív minták fehérjesávjával összehasonlítva azonosítottuk. Az aktív fehérje és a fehérjestandardok viszonylagos vándorlási távolságainak összehasonlítása alapján az új, tisztított, denaturált fehérje molekulatömege kissé nagyobb, mint a 32 500 dalton molekulatömegű jelzőanyagé.

#### 6. példa

##### A pH befolyása a hidrolitikus aktivitásra

A biotranszformáció pH-profilját a fentebb leírt, egyesített anyag alkalmazásával, négyhavi,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -on végzett tárolás után vizsgáltuk. Egy alikvot részt szobahőmérsékleten felengedni hagytunk, majd tízszeres mennyiségű desztillált vízzel hígítottuk (így hígított enzimoldatot kaptunk). Az alább felsorolt sók felhasználásával 1,1 M puffer-törzsoldatokat állítottunk elő az alábbi pH-értékekkel (a pH értékét szükség szerint nátrium-hidroxid vagy sósav hozzáadásával állítottuk be):

pH	
6,0	$NaH_2PO_4$
7,0	$NaH_2PO_4$
8,0	$NaH_2PO_4$
9,0	glicin-HCl
10,0	glicin-HCl
11,0	$Na_2HPO_4$

A biotranszformációs reakciókat zárt üvegampullákban végeztük, amint következik:

1 ml hígított enzimoldat;

100  $\mu$ l megfelelő pH-értékű, 1,1 M puffer-törzsoldat;

40  $\mu$ l 50%-os racém ketoprofen-etil-észter törzsoldat;

2,5 tömeg/térfogat% Triton X–100

12,0 pH-értéken végzett biotranszformáció esetében 11,0 pH-értékű reakcióelegyhez közvetlenül 1 M nátrium-hidroxid-oldatot adunk, amíg a pH helyes értéket el nem érjük. Az összes biotranszformációt kétszeres ismétlésben, 1 órán át  $25\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten rázás közben végezzük. A reakciók fő eredményeit a 7. táblázatban szemléltetjük. A maximális aktivitást 10-es pH alkalmazásakor észleltük.

#### 7. táblázat

Az AJ3-mal végzett biotranszformáció pH-profilja

Biotranszformáció-pH	Aktivitás (U/ml)	Normalizált hozam (%)
6	1,32	27,6
7	1,97	41,2
8	2,47	51,7
9	2,95	61,7

7. táblázat (folytatás)

Biotranszformáció-pH	Aktivitás (U/ml)	Normalizált hozam (%)
10	4,78	100,0
11	2,35	49,2
12	0,36	7,5

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás legalább 93% enantiomer-többségtű (S)-2-(3-benzoil-fenil)-propionsav előállítására 2-(3-benzoil-fenil)-propionsav valamely alkil-észtere enantiomerjeinek a keverékéből, *azzal jellemezve*, hogy biokatalizátorként egy Ophiostoma nemzetségbe tartozó mikroorganizmust alkalmazunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (S)-2-(3-benzoil-fenil)-propionsavat 15–25% konverzióval állítjuk elő.

5 3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy biokatalizátorként az Ophiostoma novo-ulmi IMI 356050 mikroorganizmust alkalmazunk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkil-észterként 1–3 szénatomos alkil-észtert alkalmazunk.

10 5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy alkil-észterként etil-észtert alkalmazunk.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakciót 8–11 pH-értéken hajtjuk végre.

15 7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakciót 9,5–10,5 pH-tartományban hajtjuk végre.