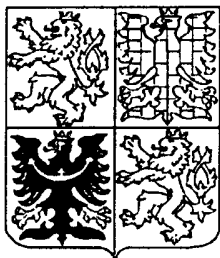


ČESKÁ  
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

# ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 17.08.92

(32) 30.08.91

(31) 91/1715

(33) AT

(40) 17.03.93

(21) 2527-92

(13) A3

(51) C 12 N 11/02  
C 12 N 9/14

(71) Chemie Linz Gesellfacht m.b.H., Linz, AT;

(72) Faber Kurt dr., Graz, AT;  
Berger Brigitte dipl. ing., Greifenburg, AT;

(54) Lipáza z mikroorganismu čeledi Candida a  
způsob její immobilizace

(57) Lipáza z čeledi Candida, která je přes epsilon-aminoskupinu lysinu N-alkylací kovalentně vázána s otevřenými epoxidovými skupinami makroporézního nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami a tak immobilizována. Řešení spočívá rovněž ve způsobu výroby této lipázy, jejího použití při enancioselektivní esterifikaci enantiomerní směsi alkoholu, obsahujícího alespoň jeden střed asymetrie v molekule pomocí enolesteru a také způsobu enancioselektivní výměny esterových skupin enantiomerní směsi alkoholů, obsahujících alespoň jeden střed asymetrie v molekule pomocí immobilizované lipázy za přítomnosti enolesteru.

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| č.j.                             | 047201      |
| pošta                            | 17. VIII 92 |
| ÚŘAD<br>PRO VYNÁLEZY<br>A OBJEVY | PŘÍL.       |

Lipáza z mikroorganismu čeledi Candida a způsob její immobilizace

#### Oblast techniky

Vynález se týká lipázy z mikroorganismu čeledi Candida a způsobu její immobilizace. Vynález se rovněž týká zvýšení účinnosti a stálosti této lipázy.

#### Dosavadní stav techniky

Chirální, enancimerně čisté alkoholy jsou látky, které je možno použít pro různé účely, například pro výrobu farmaceutických účinných látek nebo pro chemické látky, které mají své použití v zemědělství. Tyto alkoholy je možno získat například enancioselektivní výměnou esterových skupin, při níž se uvádí do reakce směs enantiomerů chirálního alkoholu s esterem karboxylové kyseliny za přítomnosti hydrolázy jako katalyzátoru. Vzhledem k tomu, že hydrolázy katalyzují reakci v obou směrech, vzniká požadovaný výsledný produkt při těchto reakcích často velmi pomalu a s nedostatečnou optickou čistotou. V publikaci M. Degueil-Castaing a další, Tetrahedron Letters, sv. 28, 9 (1987), 953 - 954 se proto navrhuje užít jako ester karboxylové kyseliny enolester vzhledem k tomu, že v tomto případě již nemůže dojít ke zpětné reakci. Jak je však zřejmé z publikace Zakrzewska a další, Acta Med. Pol., 29, (1988), 1 - 2, str. 44, mohou aldehydy, vznikající při výměně esterových skupin z enolesteru deaktivovat enzym reakcí s koncovými funkčními skupinami aminokyselin enzymu. V EP č. 321 918 se popisuje enzymatický způsob štěpení racematů při použití enanciomerních směsí racemického alkoholu působením vinylesteru nebo ve vinylesteru za přítomnosti lipázy, přičemž uvolněný aldehyd nemá působit deaktivaci lipázy. Bylo však také uvedeno, že při opakovaném použití lipázy z čeledi Candida v průběhu takového postupu velmi rychle klesá jak účinnost tohoto enzymu, tak také jeho selektivita.

V publikaci C. J. Gray a další, Enzyme Microb. Technol., sv. 12 (1990), str. 800 až 807 se popisuje, že stálost lipázy z *Candida cylindracea* je při opakovaném použití možno zvýšit různými immobilizačními postupy. Z těchto postupů však není uvedena výměna esterových skupin při použití enolesteru.

#### Podstata vynálezu

Nyní bylo neočekávaně zjištěno, že je možno zvýšit jak stálost lipázy z čeledi *Candida* proti působení aldehydů, tak také účinnost tohoto enzymu a obvykle také jeho selektivitu tím způsobem, že se lipáza před svým použitím immobilizuje výměnou esterových skupin při použití enolesterů reakcí epsilon-aminoskupin lysinu lipázy s epoxidovými skupinami makroporézního nosiče, aktivovaného těmito epoxidovými skupinami, přičemž dochází k N-alkylaci. Touto immobilizací se zvyšuje jak stálost lipázy při působení aldehydů, tak také účinnost tohoto enzymu a jeho selektivita vzhledem k substrátu ve srovnání s neimobilizovanou lipázou, přičemž selektivita vzhledem k substrátu při opakovaném použití neklesá, nýbrž zůstává zcela stálá.

Podstatu vynálezu tedy tvoří lipáza z čeledi *Candida*, která je zpracována tím způsobem, že epsilon-aminoskupiny lysinu lipázy jsou N-alkylací kovalentně vázány na otevřené epoxidové skupiny makroporézního nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami, čímž dochází k immobilizaci enzymu.

Pod pojmem "lipáza z mikroorganismu čeledi *Candida*" se rozumí jak suspenze mikroorganismu čeledi *Candida* bez jakéhokoliv čištění, tak čištěné enzymatické frakce. Jednotlivými kmeny čeledi *Candida* (C.) jsou například *C. antarctica*, *C. rugosa* nebo *C. cylindracea*. S výhodou se užívá lipázy z *C. cylindracea*. Lipázy z mikroorganismů čeledi *Candida* se běžně dodávají s různou čistotou.

K immobilisaci lipázy se užívá makroporézní nosič, aktivovaný epoxidovými skupinami. Tento nosič je možno získat například tak, že se polymeruje v suspenzi vinylacetát a monomer, který je s vinylacetátem kopolymerovatelný, například N,N'-divinylethylenmočovina ve vodě, pak se částečně zmýdelní acetátové skupiny na hydroxylové skupiny, načež se provádí reakce s epichlorhydrinem, který reaguje s volnými hydroxylovými skupinami za vzniku epoxidového kruhu. Tímto způsobem je ve výsledném kopolymeru vytvořena struktura s reaktivními epoxidovými skupinami, které jsou vhodné k vazbě nosiče na nejrůznější substráty. Nosiče tohoto typu a způsoby jejich výroby jsou popsány například v publikaci K. Burg a další, Angew. Makromol. Chem. 157, (1988), str. 105 až 121. Tyto nosiče se běžně obchodně dodávají. Zvláště vhodným nosičem pro toto použití je Eupergit C (Röhm Pharma, SRN) nebo VA-Epoxy-Biosynth, (Riedel de Haen, SRN).

V publikaci A. N. Glazer, The proteins, vyd. H. Neurath a R. L. Hill, Academic Press Londýn, 1976, sv. II, str. 1 až 109 se uvádí, že při tomto způsobu immobilizace enzymů reagují v první řadě epsilon-aminoskupiny lysinu s epoxidovými skupinami, čímž dochází k alkylaci aminoskupiny lysinu v uvedené poloze.

Lipáza podle vynálezu je tedy vázána kovalentně na nosič svými epsilon-aminoskupinami lysinu alkylací otevřenými epoxidovými skupinami nosiče.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob výroby immobilizované lipázy. Postupuje se tak, že se makroporézní nosič, aktivovaný epoxidovými skupinami uvádí do styku s vodným roztokem lipázy z čeledi Candida při teplotě 15 °C až teplotě deaktivace lipázy, s výhodou při teplotě 19 až 30 °C, například v třepací baňce. Poměr nosiče a lipázy je nutno zvolit tak, aby v reakční směsi byla k dispozici na jednu volnou

aminoskupinu lysinu v lipáze jedna epoxidová skupina nosiče. S výhodou se užíje na 1 g nosiče 0,05 až 0,1 g lipázy. Lipáza může být rozpuštěna v čisté vodě nebo v roztoku pufru nebo soli. Tím dojde k reakci epsilon-aminoskupin lysinu v lipáze s epoxidovými skupinami nosiče, čímž dochází k N-alkylaci, to znamená ke kovalentní vazbě mezi lipázou a nosičem. Po ukončené reakci se immobilizovaná lipáza odfiltruje, popřípadě po přidání soli, například chloridu sodného do reakční směsi a promyje se roztokem pufru. Immobilizovaná lipáza se pak uchovává až do použití v pufru, ve vlhkém stavu nebo v suchém stavu.

Tímto způsobem získaná lipáza se užívá k enancioselektivní esterifikaci směsi enantiomerů chirálních alkoholů výměnou esterových skupin při použití enol-esterů.

Podstatu vynálezu tvoří také způsob enancioselektivní esterifikace alkoholu, obsahujícího alespoň jeden střed asymetrie v molekule, způsob spočívá v tom, že se alkohol esterifikuje za přítomnosti enol-esteru a lipázy z mikroorganismu čeledi Candida, v níž je epsilon-aminoskupina lysinu lipázy kovalentně vázána na otevřené epoxidové skupiny makroskopického nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami za současné N-alkylace. Vzniklý ester chirálního alkoholu a popřípadě nereagovaný alkohol je možno z reakční směsi izolovat.

Použitý alkohol obsahuje alespoň jeden střed asymetrie a je tedy opticky aktivní. Je možno jej použít ve formě racemické směsi enantiomeru nebo ve formě směsi, obohacené jedním nebo druhým enantiomerem.

Lipázu, immobilizovanou způsobem podle vynálezu je možno užít k reakci jak s primárními, tak se sekundárními alkoholy. Je možno použít také dialkohol se dvěma středy asymetrie v molekule, přičemž může jít o směsi R,S-, S,R-, R,R- nebo

S,S-alkoholu. Výhodnými alkoholy pro použití jako substráty jsou sekundární alkoholy, které v molekule obsahují jeden střed asymetrie.

Z enol-esterů je možno užít například enolestery, které byly popsány v EP 321 918. S výhodou se používají vinyl-estery nižších organických kyselin, zvláště výhodnými estery pro toto použití jsou vinylacetát, vinylpropionát, nebo vinylbutyrát.

Při provádění svrchu uvedené reakce se nechá reagovat na 1 g enantiomerní směsi chirálních alkoholů 2 až 30 g, s výhodou 6 až 10 g immobilizované lipázy a alespoň 5 ekvivalentů enolesteru, reakce se popřípadě provádí v ředidle, inertním za reakčních podmínek za míchání nebo protřepávání při teplotě 15 °C až deaktivací teplotě lipázy, s výhodou při teplotě místnosti.

Reakci je možno provádět v ředidle, inertním za reakčních podmínek, nebo je možno jako ředidlo užít ve velkém přebytku enolester, užitý pro výměnu esterových skupin. Reakce se s výhodou provádí nikoliv v ředidle, inertním za reakčních podmínek, nýbrž v enolesteru, který je užit k provádění reakce.

Je účelné provádět reakci při takových teplotách, při nichž má lipáza nejvyšší účinnost. Tato teplota se obvykle uvádí při dodání enzymu výrobcem nebo je možno ji určit jednoduchými pokusy. Tímto způsobem se tvoří v závislosti na použité směsi alkoholu, esteru a na specifičnosti použité lipázy převážně R- nebo převážně S-, popřípadě převážně R,S- nebo převážně S,R-ester použitého alkoholu, kdežto odpovídající S- nebo R-, popřípadě S,R-, R,S-, R,R- nebo S,S-alkohol se reakce neúčastní nebo se jí účastní pouze ve velmi nepatrné míře.

Průběh reakce je možno sledovat vhodnými a v chemii enzymů známými postupy, například při použití plynové chromatografie.

Po dosažení produkce enantiomeru s dostatečnou čistotou, se reakce přeruší a reakční směs se dále zpracovává. Imobilizovaná lipáza se odfiltruje a matečný louh se dělí, přičemž dochází k izolaci požadovaných výsledných produktů. Izolace požadovaných produktů z reakční směsi se provádí pomocí extrakce, destilace, chromatografie a podobně.

Ve výhodném provedení se racemická směs alkoholu protřepává s lipázou z *Candida cylindracea*, imobilizovanou pomocí VA-Epoxy-Biosynth, (Riedel-de-Haen, SRN) ve vinylacetátu při teplotě místnosti. Po dosažení požadovaného přebytku enantiomeru vzniklého R- nebo S-, popřípadě R,S- nebo S,R-esteru se enzym odfiltruje a požadované produkty se izolují destilací nebo chromatografií.

Je možno prokázat, že při provádění způsobu podle vynálezu dochází ve srovnání s použitím neimobilizované lipázy jak ke zvýšení stálosti lipázy za přítomnosti acetaldehydu, tak ke zvýšení účinnosti a selektivity tohoto enzymu. Zvláště překvapující je více než pětinašobný vzestup selektivity, který zůstává zcela stálý i při opakovaném použití imobilizované lipázy.

Je zřejmé, že imobilizovaná lipáza a její použití pro enancioselektivní výměnu esterových skupin způsobem podle vynálezu tedy představují podstatný technický pokrok.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady.

### Příklady provedení vynálezu

#### Příklad 1

10,0 g prostředku VA-Epoxy-Biosynth (Riedel-de-Haen, SRN) se uvede do suspenze v 70 ml 0,1N fosfátového pufru o pH 7,0, přidá se 300 mg lipázy z *Candida cylindracea* (AY-30, Firma Amano Pharm. Co., Japonsko) a směs se protřepává 3 dny při 80 ot/min a teplotě 27 °C. Pak se přidá 70 ml roztoku chloridu sodného, směs se zfiltruje, promyje se 2 x 30 ml 0,05 N fosfátového pufru o pH 7 a usuší.

Specifická účinnost takto získané immobilizované lipázy se stanoví titrací vzniklé kyseliny octové pomocí 0,1 N hydroxidu sodného v průběhu hydrolýzy triacetinu v 0,1 N fosfátovém pufru o pH 7,00 a je 5,70 mikromol x min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Specifická účinnost neimmobilizované lipázy za týchž podmínek je 13 mikromol.min<sup>-1</sup>g<sup>-1</sup>.

#### Příklad 2

1 g, 9 mmol racemického endonorborn-5-en-2-olu se smísí se 200 mg lipázy z *Candida cylindracea* (AY-30, Firma Am ano Pharm. Co., Japonsko) a pak se směs protřepává v 10 ml vinylacetátu rychlostí 200 ot/min při teplotě 20 °C. Průběh reakce se sleduje plynovou chromatografií. Po 4 hodinách se reakce přeruší. Lipáza se odfiltruje a matečný louh se odpaří ve vakuu. Odparek se chromatografuje běžnou chromatografií na sloupci silikagelu, čímž se získá (+)-endonorborn-5-en-2-ylacetát a (-)-endonorborn-5-en-2-ol.

Výsledky tohoto pokusu, týkající se účinnosti lipázy, poměru enantiomerů a množství zreagovaného materiálu jsou shrnuty v následující tabulce 1.

### Příklad 3

Postupuje se způsobem podle příkladu 2 s tím rozdílem, že se užiije immobilizovaná lipáza podle příkladu 1. Výsledky tohoto pokusu, pokud jde o účinnost lipázy, stupeň přeměny a poměr jednotlivých enantiomerů jsou shrnuty v následující tabulce 1.

T a b u l k a 1

| A  | lipáza | akt. | % ee<br>(-)-alk. | % ee<br>(+)-est | S  |
|----|--------|------|------------------|-----------------|----|
| 1. | V      | 39   | 51,4             | 66,5            | 8  |
| 2. | V      | 1    | 11,0             | 54,0            | 4  |
| 3. | V      | -    | -                | -               | -  |
| 1. | I      | 100  | 62,2             | 91,3            | 42 |
| 2. | I      | 50   | 66,0             | 91,7            | 42 |
| 3. | I      | 23   | 59,1             | 91,8            | 42 |

Vysvětlivky k tabulce:

A: počet použití

V srovnávací enzym

I: immobilizovaná lipáza

Akt: relativní účinnost, která se stanoví srovnáním rychlosti v průběhu reakce až do uskutečnění 20 % reakce (tangentsová metoda)

%ee (-)Alk přebytek enantiomerů nezreagovaného (-)-endonorborn-5-en-2-olu

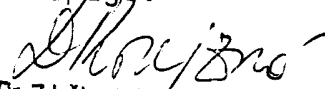
%ee (+)Est: přebytek enantiomeru vytvořeného (+)-endonorborn-5-en-2-ylacetátu

Přebytek příslušného enaciomeru byl stanoven pomocí plynověchromatografického dělení odpovídajícího menthylchlormravenčanu, který je možno získat derivatizací (-)-menthylchlormravenčanu způsobem podle publikace B. Berger a další, Tetrahedron: Asymmetry, 1 (1990), str. 541 - 546.

S: Selektivita reakce ve vztahu k požadovanému enanciomeru

Tato hodnota se stanoví způsobem podle publikace Chen a další, J. Am. Chem. Soc., 104 (1982), str. 7294 - 7299.

Zastupuje:

  
JUDr. Zdeňka Kopejzová  
advokátka

- 10 -

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| č.j.                             | 047201       |
| DOSTO                            | 17. VIII. 92 |
| ÚŘAD<br>PRO VYNÁLEZY<br>A OBJEVY |              |
| PŘIL.                            |              |

P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Lipáza z mikroorganismu čeledi Candida, v níž jsou epsilon-aminoskupiny lysinu kovalentně vázány N-alkylací přes otevřené epoxidové skupiny makroporézního nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami, čímž dochází k immobilizaci lipázy.

2. Lipáza podle nároku 1, immobilizovaná na makroskopický nosič, získaný polymerací vinylacetátu a monomeru, kopolymerovatelného s vinylacetátem v suspenzi ve vodě s parciálním zmýdlením acetátu za vzniku hydroxylových skupin, které se uvedou do reakce s epichlorhydrinem, který s volnými hydroxylovými skupinami tvoří epoxidové kruhy.

3. Způsob immobilizace lipázy z mikroorganismu čeledi Candida, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se makroporézní nosič, aktivovaný epoxidovými skupinami uvádí do reakce s lipázou, a to s roztokem lipázy z čeledi Candida ve vodě, v pufru nebo v roztoku soli při teplotě 15 °C až při deaktivující teplotě lipázy, čímž dojde N-alkylací ke tvorbě kovalentních vazeb mezi epsilon-aminoskupinami lysinu lipázy a otevřenými epoxidovými kruhy makroporézního nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami.

4. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se na 1 g makroporézního nosiče užije 0,05 až 0,1 g lipázy.

5. Použití lipázy podle nároku 1, k enancioselektivní výměně esterových skupin chirálního alkoholu působením enol-esteru.

6. Způsob enancioselektivní výměny esterových skupin chirálního alkoholu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se alkohol esterifikuje za přítomnosti enolesteru a lipázy

z mikroorganismu čeledi Candida, pomocí N-alkylace vázané přes epsilon-aminoskupinu lysinu na epoxidové skupiny makroporézního nosiče, aktivovaného epoxidovými skupinami, načež se vzniklý ester chirálního alkoholu a popřípadě nezreagovaný alkohol z reakční směsi oddělí.

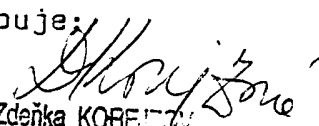
7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se na 1 g chirálního alkoholu užije alespoň pět ekvivalentů enolesteru a 20 až 30 g immobilizované lipázy.

8. Způsob podle nároků 6 nebo 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako ředidlo pro esterifikační reakci užije enolester, který se současně užije jako jedno z reakčních složek.

9. Způsob podle nároků 6 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako enolester užije vinylacetát, vinylpropionát nebo vinylbutyrát.

10. Způsob podle nároků 6 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se jako lipáza užije lipáza z mikroorganismu Candida cylindracea.

Zastupuje:

  
JUDr. Zdeňka KOREJČOVÁ  
advokátka