

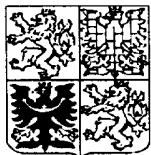
# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 283 262

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2133-95**

(22) Přihlášeno: **03. 03. 94**

(30) Právo přednosti:  
**03. 03. 93 GB 93/9304256**

(40) Zveřejněno: **13. 12. 95**  
**(Věstník č. 12/95)**

(47) Uděleno: **05. 12. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **18. 02. 98**  
**(Věstník č. 2/98)**

(86) PCT číslo: **PCT/EP94/00630**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/20633**

(13) Druh dokumentu: **B6**

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

**C 12 P 41/00**

**C 12 P 7/40**

(73) Majitel patentu:

LABORATORIOS MENARINI S.A., Badalona,  
ES;

(72) Původce vynálezu:

Warneck Julie Belinda Hazel, Hontingdon,  
GB;  
Wisdom Richard Anthony, Cambs, GB;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Břehová 1, Praha  
1, 11000;

(54) Název vynálezu:

**Způsob výroby převážně  
(S)-2-(3-benzoylfenyl) propionové kyseliny**

(57) Anotace:

Mikroorganismus rodu Ophiostoma nebo Ceratocystis, nebo látka, mající enzymovou aktivitu od něho odvozenou, se používá jako stereospecifické činidlo v biotransformační reakci k výrobě (S)-ketoprofenu ze směsi enantiomerů jeho esterů.

CZ 283 262 B6

## Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny

### Oblast techniky

5

Vynález se týká rozlišení arylalkanové kyseliny, zejména kyseliny 2-(3-benzoylfenyl)propionové, Ketoprofenu.

10

### Dosavadní stav techniky

Množství 2-arylpropionových kyselin je dobře známo pro své protizánětlivé působení. K příkladům patří ibuprofen, naproxen a ketoprofen. Tyto sloučeniny jsou chirální a nyní je zjištěno, že jejich hlavní léčebná aktivita přísluší (S)-enantiomeru.

15

Dosud je známo několik metod k získání (S)-enantiomeru, který by neobsahoval (R)-enantiomer. Patří k nim asymetrická chemická syntéza a chemické rozlišení, jako je stechiometrická krystalizace diastereomerních solí, tvořených různými chirálními aminy.

20

Jiný možný přístup je biokatalytický, za použití biokatalyzátoru k selektivní hydrolyse esteru 2-arylpropionové kyseliny. Za předpokladu, že může být stanoven biokatalyzátor se správnou stereospecifitou, lze získat reakční směs, obsahující nezreagovaný ester jednoho enantiomeru a kyselý produkt druhého enantiomeru. Oddělení a získání produktu je pak poměrně snadné. Nezreagovaný ester může být racemizován a znovu použit k další reakci, čímž je zajištěna téměř

25

úplná konverze racemického substrátu na požadovaný produkt jednoho enantiomeru.

EP-A-0227078 popisuje použití několika vněbuněčných (extracelulárních), komerčně dostupných mikrobiálních lipáz k takovému biokatalytickému rozlišení. Obecně jsou však vyžadována větší množství enzymu a reakce probíhá 2 až 6 dní. Provádění takových reakcí by proto bylo

30

nákladné. Nejlepším enzymovým preparátem, který byl poznán, byl enzym z mikroorganismu *Candida cylindracea* (známého také jako *Candida rugosa*); avšak v EP-A-0407033 bylo prokázáno, že jeho přípravek, vykazující rovněž nízkou aktivitu, obsahoval více než jeden enzym s esterázovou aktivitou. K získání ketoprofenu s vysokou enzymovou účinností (ee) bylo nezbytné přípravek dále čistit.

35

EP-A-0233656 popisuje izolaci a klonování esterázového genu z *Bacillus thali*. U tohoto enzymu je prokázána selektivní hydrolyza ethyl- a methylesterů jak naproxenu, tak i ibuprofenu, poskytující (S)-kyseliny příslušných sloučenin. Rovněž je zde ukázáno, že klonováním enzymu vznikl přípravek, poskytující produkt s vyšší enzymovou účinností jako výsledek minimalizace

40

jiných vedlejších aktivit enzymu.

WO-A-9323547 popisuje množství kmenů, produkujících rovněž esterázu, hydrolyzující selektivně estery naproxenu. Jako nejlepší byl označen kmen *Zopfella latipes*, z něhož byla esteráza naklonována.

45

WO-A-9304189 popisuje mikroorganismus rodu *Trichosporon*, schopný s enzymovou účinností větší než 90% selektivní hydrolyzy (S)-enantiomeru ethylketoprofenu za vzniku (S)-kyselého produktu. Enzym, který uskutečňuje tuto biotransformaci, je nitrobuněčný, intracelulární. Zvýšit biokatalytickou aktivitu genovým klonováním nebo klasickou mutagenézí se ukázalo jako

50

obtížné, neboť je obtížné získat stabilní preparáty, neobsahující buňky.

V pozadí tohoto vynálezu byla snaha získat biokatalyzátor s dobrou aktivitou vzhledem k různým ketoprofenovým esterům, poskytující s dobrou enzymovou účinností kyselý ketoprofenový

produkt a který by byl vhodný pro klonování a hyperexpresi, například v *E. coli*, k poskytnutí biokatalyzátoru, jehož nákladnost by byla udržována na minimu.

## 5 Podstata vynálezu

Přehledné testování (screening) široké škály mikroorganismů z různých zdrojů překvapivě ukázalo, že askomycéta *Ophiostoma novo-ulmi* (známá rovněž jako *Ceratocystis ulmi*) produkuje intracelulární hydrolytický enzym, který může katalyzovat požadovanou reakci. Další testy ukázaly, že na rozdíl od kmene, popsaného ve WO-A-9304189, je možné získat stálou bezbuněčnou aktivitu, hodící se tedy pro klonování a možné použití v bezbuněčných biotransformacích. *Ophiostoma novo-ulmi* je rostlinný patogen, známý jako virulentní příčinný agens, vyvolávající holandskou elmskou nemoc. Známa je jeho blízká příbuznost s méně virulentními kmeny *Ophiostoma ulmi* a také s *O. piceae*.

Při rozvíjení tematiky prvotního objevu, podtrhujícího předkládaný vynález, bylo zjištěno, že stereospecifická esterázová aktivita se v případě různých kmenů mikroorganismu *Ophiostoma novo-ulmi* vyskytuje u *Ophiostoma ulmi* (známého někdy rovněž jako *Ceratocystis ulmi*) a *Ophiostoma piceae* (známého někdy rovněž jako *Ceratocystis piceae*) a u izolátů, sebraných z různých míst v USA, Evropě, na Středním Východě a v Uzbekistánu. Kromě toho byly různé kmeny druhu *Ceratocystis* získány z IMI, Egham, Surrey, Velká Británie a testovány na přítomnost uvedené aktivity. Bylo zjištěno, že aktivita se vyskytuje rovněž u kmenů *C. coronata* (např. IMI 176533), *C. ips* (např. IMI 212114), *C. tetropii* (např. IMI 212117), *C. cainii* (např. IMI 176523), *C. arborea* (např. IMI 176529) a *C. stenoceras* (např. IMI 268494). Zdá se tedy, že aktivita je široce rozšířena u škály různých kmenů *Ceratocystis*, získaných z různých míst světa.

Kmen původního testovaného izolátu, označovaný zde jako AJ3, byl v IMI uložen 15. února 1993 pod přírůstkovým číslem IMI 356050, za podmínek Budapešťské dohody. Tento kmen poskytuje dobrý příklad aktivity; avšak vzhledem k široce rozšířené povaze uvedené aktivity u rozmanitého množství příbuzných kmenů není úmyslem autorů omezit rozsah vynálezu na tento jediný mikroorganismus. Vynález je rozšířen také na použití enzymové aktivity, izolované z takových mikroorganismů jakoukoli vhodnou technikou.

Ve shodě s předkládaným vynálezem mohou být mikroorganismy rodu *Ophiostoma* a jejich enzymová aktivita použity ke stereoselektivnímu hydrolyzování racemického alkylesteru ketoprofenu, za vzniku kyseliny, zásadně obohacené (S)-enantiomerem, např. na 93 až 96 % přebytek enantiomeru či větší, při konverzi 15 až 25 %, a zbytkového esteru, obohaceného (R)-enantiomerem. Reakce může probíhat v jakékoli směsi enantiomerů daného esteru, i když obvykle bývá směs racemátem. Alkylová skupina esteru je výhodně tvořena 1 až 3 atomy uhlíku. Reakce probíhá s výhodou při pH 8 až 11, lépe 9,5 až 10,5 a nejlépe při pH přibližně 10. Obvykle se používá organické rozpouštědlo, jako je cyklohexan.

K oddělení kyselého produktu od esteru se potom používá obvyklých chemických postupů. Pokud je to nezbytné, je možné zlepšit optickou čistotu kyseliny použitím chirálního aminu, jako je (R)- $\alpha$ -methylbenzylamin. Ester, který zbývá nezměněný, může být racemizován pro další použití.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady dokreslují vynález.

5

## Příklad 1

Biologická transformace racemického ethylketoprofenu prostřednictvím AJ3

10 Pro růst organismu bylo použito následující médium:

	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(g/l)	0,5
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(g/l)	0,25
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	(g/l)	0,1
15	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(g/l)	8,0
	extrakt z kvasinek	(g/l)	10,0
	glukóza	(g/l)	5,0
	roztok stopových prvků	(μl/l)	100
	pH (s NaOH)		6,5

20

Použitý roztok stopových prvků obsahoval:

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

35

Buňky AJ3 byly naočkovány z agarové plotny se sladovým výtažkem do 30 ml růstového média v 250 ml lahvi s přepážkami. Ta byla 30 hodin protřepávána při 23 °C a poté bylo 2,5 ml přeneseno do druhé 250 ml lahve s přepážkami, obsahující 30 ml média. Po dalším nárůstu, trvajícím při teplotě 23 °C a za protřepávání 40 hodin, byl k růstovému bujónu přidán racemický ethylketoprofen do koncentrace 20 g/l. Poté byla biotransformace ponechána probíhat 120 hodin, po níž analýza pomocí HPLC prokázala, že došlo k 18,2% hydrolyze přidaného esteru. Enantiomerní přebytek vzniklé ketoprofenové kyseliny činil 96 % ve prospěch (S)-enantiomeru.

40

## Příklad 2

Vliv organického rozpouštědla

45

Za použití stejného růstového média jako v Příkladu 1, avšak o pH 6,0 a bez glukózy, byl připraven roztok surového enzymu. Buňky mikroorganismu AJ3 byly naočkovány do 100 ml média v třepací lahvi o objemu 1 l. Kultura byla za protřepávání pěstována 48 hodin při teplotě 30 °C, pak bylo 10 ml přeneseno do 90 ml čerstvě připraveného média v třepací lahvi o objemu 1 l a pěstováno dalších 8 hodin za protřepávání při 30 °C. Tato láhev byla použita k naočkování laboratorního fermentoru o objemu 2,8 l, obsahujícího 1,5 l média s glukózou (5 g/l) a soustavu (5 ml/l), tvořenou silikonem/protipěnicím činidlem na bázi PPG (XFO371, Ivanhoe Chemicals,

50

III., USA). Tento fermentor byl činný 48 hodin za míchání a aerace a byl řízen k udržování DOT > 50% nasycení vzduchem, teploty 30 °C a pH 6,0.

Po zkončení fermentace byly buňky shromážděny odstředěním a pelet byl znovu naředěn na 10 % (hmotnost/objem, na základě hmotnosti vlhkých buněk) lyzačním pufrům tj. 0,1 M uhličitanem sodným v 5% vodném roztoku Tritonu X-100. Lyzování buněk bylo prováděno přes noc při 8 °C za protřepávání a poté byl lyzát, obsahující enzymovou aktivitu oddělen od zbytků buněk odstředěním.

Racemický ethylketoprofen byl rozpuštěn v každém ze 4 organických rozpouštědel: toluenu, cyklohexanu, methanolu a MTBE (methyl-t-butyletheru) v koncentraci 20 g/l. 2 ml každého z těchto roztoků byly přidány k 5 ml alikvotním částem surového enzymového roztoku ve skleněných lahvičkách. Do skleněné lahvičky byl připraven rovněž kontrolní vodný biotransformační roztok, obsahující 5 ml surového enzymového roztoku, 400 µl 50% racemického ethylketoprofenu, 0,5 % hm./obj. zásobní roztok Tween 80 a 2,5 % (hm./obj.) Tritonu X-100. Všechny vzorky byly ponechány reagovat za protřepávání 48 hodin při 25 °C. Analýzou vodné fáze každé z reakčních směsí byly získány výsledky, uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1: Hydrolýza racemického ethylketoprofenu ve dvoufázových biotransformačních vzorcích

rozpouštědlo vzorku	vytvořená kyselina (mg/ml <sup>-1</sup> )	konverze (%)
vodné	2,3	6,2
toluen	0,1	1,3
cyklohexan	1,1	14,1
methanol	0,4	4,6
MTBE	0,7	8,3

Je zřejmé, že biotransformace pracuje v přítomnosti cyklohexanu nebo MTBE jako rozpouštědel do určitého rozsahu, je ale za stejných podmínek dosti silně inhibována toluenem.

### Příklad 3

#### Vliv alkylové skupiny

Různé estery racemického ketoprofenu byly rozpuštěny v koncentraci 20 g/l v cyklohexanu. Použitými estery byly methyl, ethyl, n-propyl, n-butyl, n-pentyl a n-hexyl. V případě methyl-esteru byla vzhledem k nízké rozpustnosti esteru v cyklohexanu připravena suspenze.

K 5 ml alikvotním částem roztoku surového enzymu ve skleněných lahvičkách byly přidány 2 ml každého ze šesti dříve uvedených roztoků racemického esteru ketoprofenu. Do skleněné lahvičky byl rovněž připraven vodný biotransformační vzorek, obsahující 5 ml roztoku surového enzymu, 200 µl 50 % racemického ethylketoprofenu, 0,5 % zásobní roztok Tweenu 80 a 2,5% (hm./obj.) Tritonu X-100. Reakce probíhala za protřepávání 24 hodin při 25 °C. Výsledky analýzy vodné fáze každého z biotransformačních vzorků pomocí HPLC jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Hydrolýza racemických ketoprofenových esterů ve dvoufázových biotransformačních vzorcích

ketoprofenový ester	vytvořená kyselina (mg.ml <sup>-1</sup> )	konverze (%)	EE, enzymová účinnost (%(S)-enantiomeru)
vodná kontrola	4,6	22,9	90
methyl	1,7	42,3	90
ethyl	1,1	27,5	100
n-propyl	1,0	25,6	86
n-butyl	0,3	8,0	nestanoveno
n-pentyl	0,18	4,4	nestanoveno
n-hexyl	0,09	2,3	nestanoveno

5 "nestanoveno" = nebylo možné stanovit vzhledem k malému množství nashromážděné kyseliny

#### Příklad 4

#### 10 Příprava lyzátu AJ3

Lyzát AJ3 byl pěstován do rozsahu 500 litrů za použití dále uvedené metodologie

15 AJ3 byl naočkován do 100 ml média (jako v Příkladu 1) v přepážkové lahvi o objemu 1 l. Po napěstování mikroorganismu za 48 hodin při 25 °C a rotačním protřepávání (300 ot. za minutu, výkyv 25 mm), byl 1 ml přenesen do každé ze tří jednolitrových přepážkových lahví, obsahujících po 100 ml média. Kultury pak byly pěstovány za obdobných podmínek dalších 48 hodin, spojeny a použity k naočkování 750 litrového fermentoru, obsahujícího 500 l média.

20 Použito bylo následujícího média:

	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(g/l)	0,4
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	(g/l)	0,1
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(g/l)	8,0
25	extrakt z kvasinek	(g/l)	30,0
	roztok stopových prvků	(μl/l)	200 (jako v Příkladu 1)
	protipěňivé činidlo FXO 371	(ml/l)	0,5
	pH (s NaOH)		6,0

30 Médium bylo před přidáním 15 l 50 % (hm./obj.) sterilního roztoku glukózy po dobu 50 minut sterilizováno při 121 °C.

35 Kontrolní podmínky zahrnovaly: teplotu 25 °C, pH 6,0 při přidavku kyseliny fosforečné nebo hydroxidu sodného a DOT ≥ 50 % nasycení vzduchem, dosažené promícháváním a řízeným provzdušňováním.

40 Po 64 hodinách růstu byly buňky in situ (na místě) ovlivněny tak, aby došlo k jejich usmrcení a nápomoci jejich lyze. Toho bylo dosaženo poklesem teploty na 15 °C a přidavkem hydroxidu sodného, upravujícího pH na 10,0. Po 50 minutách takového působení bylo pH živného bujónu upraveno pomocí kyseliny fosforečné opět na hodnotu 7,0 a buňky byly odděleny v kontinuální odstředivce. Získané buňky byly rozděleny do různých zásobníků a skladovány až do použití při -20 °C.

Zamražené buňky byly rozmrazeny a naředěny na 25% suspenzi (hmotn./objem, na základě hmotnosti vlhkých buněk) 50 mM roztokem  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o pH 6,5. Po 30 minutách míchání byly buňky shromážděny odstředěním. Poté byly znovu suspendovány na 25 % (hm./obj., na základě hmotnosti vlhkých buněk) v lyzačním pufru, tj. 0,3 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o pH 10,5. Lyze probíhala přes noc při 4 °C za míchání a poté byl lyzát vyčefěn odstředěním k oddělení zlomků buněk ze supernatantu. V roztoku enzymu, tj. supernatantu lyzátu, byla stanovována aktivita za použití standardních podmínek biotransformace, kterými se rozumí 1 ml enzymového roztoku, vhodně naředěného 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o pH 10,0, 40  $\mu\text{l}$  50% racemického ethylketoprofenu, 0 - 5% zásobní roztok Tweenu 80 a 2,5 % (hmotn./obj.) Tritonu X-100. Biotransformace byly prováděny v uzavřených skleněných lahvičkách o objemu 20 ml, za protřepávání, po 1 hodinu při teplotě 25 °C. Aktivita je vyjádřena v jednotkách U/ml, kdy jedna jednotka (U) = 1 mg ketoprofenové kyseliny, vzniklé za 1 hodinu při 25 °C. Enzymové roztoky byly považovány za vhodně naředěné, pokud se naměřená aktivita pohybovala v rozmezí od 1 do 5 U/ml.

50% zásobní roztok racemického ethylketoprofenu byl připravován následovně: 25 g racemického ethylketoprofenu a 0,25 g Tweenu 80 se přidalo do 10 ml destilované vody a vzniklá směs se dezintegrovala ultrazvukem (sonikovala) 5 minut (při amplitudě 15 mikrometrů, v cyklech 10 sekund sonikace/10 sekund prodleva). Pak byl objem doplněn destilovanou vodou na 50 ml. Zásobní roztok byl sterilizován v autoklávu a poskytnut k dlouhodobému skladování. Typická aktivita lyzátu byla 1,5 U/ml.

#### Příklad 5

Isolace a vyčištění složky s hydrolytickou aktivitou

Vyčefěný lyzát (Příklad 4) byl dialyzačně ultrafiltrován proti destilované vodě (Amicon DC2 ultrafiltrační jednotkou, používající patrony z dutých vláken k oddělení částic o molekulové hmotnosti do 30 000), dokud vodivost lyzátu nedosáhla vodivosti 20 mM pufru  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  o pH 9,2 (pufru A). Pak byl roztok 4-5 násobně zahuštěn a obvykle obsahoval > 90 % aktivity. Enzymová aktivita byla v kádince (béči) přenesena na předem ekvilibrovanou QA52 aniontovou výměnnou pryskyřici (Pharmacia) na 1 hodinu při laboratorní teplotě, při zatížení 7 - 10 U aktivity na ml vlhkého gelu QA52. Gel, nesoucí aktivitu, byl zformován ve sloupec (kolonu) při lineární rychlosti toku 200 mm/h. Následně byla prováděna chromatografie při 4 °C.

Sloupec byl promýván pufrům A až k zisku základní hodnoty. Eluce se prováděla za použití gradientu, tvořeného 0 - 0,5 M NaCl v pufru A, o objemu desetinásobku sloupce a zachycovány byly podíly (frakce), odpovídající 1/35 objemu tohoto gradientu. Obvykle získaný profil eluce je znázorněn v Tabulce 3.

Tabulka 3: Eluční profil prvního průchodu chromatografickým sloupcem QA52

Podíl (frakce)	celková aktivita (U)	výtěžek
PLNICÍ TOK	99	-
PROSTŘEDNICTVÍM	0	0
PROMÝVÁNÍ	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

5 Aktivita byla eluována v koncentračním rozmezí NaCl 0,12 - 0,18 M. Podíly 7-10 (včetně) byly spojeny, aby poskytly:

výtěžek aktivity spojených podílů = 63,5 %

výtěžek bílkovin spojených podílů = 15,8 %

10 Spojená aktivita byla zahuštěna za použití membrány YM 30 v ultrafiltrační jednotce s míchanou komůrkou (AMICON) bez ztráty aktivity a dialyzována vůči pufru A, dokud nebylo dosaženo vodivosti 3,2 až 3,6 mS. Poté byla opětně chromatografována na pryskyřici QA52. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4.

15 Tabulka 4: Eluční profil druhého průchodu chromatografickým sloupcem QA52

Podíl (frakce)	celková aktivita (U)	výtěžek
PLNICÍ TOK	3111	-
PROSTŘEDNICTVÍM	0	0
PROMÝVÁNÍ	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

20 Při tomto druhém průchodu byla aktivita eluována v rozmezí koncentrace NaCl od 0,2 do 0,25 M NaCl. Podíly 15 až 17 (včetně) byly spojeny. Ve spojeném vzorku byla stanovena aktivita a obsah bílkovin.

specifická aktivita = 27,8 U.ml<sup>-1</sup>

celková aktivita = 2599 U

25 celkový výtěžek aktivity = 83,5 %

sp. obsah bílkovin (biuretová metoda) = 1,34 mg.ml<sup>-1</sup>  
 celkový obsah bílkovin = 125 mg  
 celkový výtěžek bílkovin = 5,5 %

- 5 Spojené podíly byly dále čištěny za použití MONO P HR 5/5 předem upravené aniontové výměnné FPLC firmy Pharmacia. Chromatografické podmínky byly následovné:

10 pufr s nízkým obsahem solí = 20 mM ethanolamin-HCl o pH 9,0  
 pufr s vysokým obsahem solí = 20 mM ethanolamin-HCl + 0,3 M NaCl o pH 9,0  
 průtoková rychlost = 1 ml/min

15 Profil gradientu: čas : koncentrace NaCl

0-5 min	: 0 M
5-7 min	: 0-0,1 M
7-20 min	: 0,1-0,3 M
20-22 min	: 0,3 M
22-23 min	: 0,3-0 M
23-25 min	: 0 M

20 objem vzorku = 1 ml  
 objem podílu = 1 ml

- 25 Spojené podíly z druhého průchodu chromatografickým sloupcem QA52 byly desetinasobně zahuštěny pomocí ultrafiltrační membrány, oddělující molekulovou hmotnost 30 000 a výsledný koncentrát byl zbaven solí v pufru pro HPLC o nízkém obsahu solí za použití gelového filtračního sloupce Pharmacia G-25 PD 10. Na HPLC sloupec bylo při jednom běhu nanášeno přibližně 5 mg celkových bílkovin. Získaný eluční profil je znázorněn dále v Tabulce 5:

Tabulka 5: Eluční profil při použití MONO P aniontové výměnné HPLC

podíly (v minutách)	aktivita (U.ml <sup>-1</sup> )	výtěžek (%)
nanesení vzorku	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

- 30 Podíly 9 a 10 byly spojeny k poskytnutí výtěžku celkové aktivity ve výši 88,5 %. Tato spojená aktivita pak byla dále čištěna pomocí HPLC na gelové síti (limitující velikost částic).

- 35 Pro následující separaci bylo použito sloupce pro HPLC Analgel-TSK G3000 SWXL 30 cm x 7,8 mm, limitujícího velikost částic. Chromatografické podmínky byly následovné:

40 pufr = 0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,0  
 průtoková rychlost = 0,4 ml.min<sup>-1</sup>  
 objem vzorku = 200 µl  
 objem podílu = 400 µl

Spojené podíly z MONO P iontové výměnné HPLC byly zahuštěny 1,5násobně pomocí ultrafiltrační membrány, oddělující molekulovou hmotnost 10 000 a výsledný koncentrát byl

zbaven solí v pufru pro gelovou HPLC za použití sloupce G-25 PD 10. Získán byl následující eluční profil (Tabulka 6).

Tabulka 6: Eluční profil gelové HPLC

5

podíly (v minutách)	aktivita (U.ml <sup>-1</sup> )	výtěžek (%)
nanesení vzorku	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

10 Odhad molekulové hmotnosti racemické ketoprofenové esterázy z AJ3 byl učiněn pomocí SDS-PAGE (elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného). Použit byl prefabrikovaný 12% homogenní SDS-PAGE mini-gel (firmy BDH) a předem zabarvené bílkovinné standardní markery molekulové hmotnosti (firmy BISC) k porovnání molekulových hmotností. Jako pufr byl aplikován pufr Elektrograd TTS (firmy BDH).

15 Elektroforéza probíhala při stálém napětí (200 V) a omezeném proudu (40 mA na gel), dokud modře zabarvené čelo neprošlo ke konci gelu. Bílkoviny byly zviditelněny barvením pomocí Coomassie Blue.

20 Pruh bílkoviny, odpovídající esteráze, byl stanoven srovnáním s pruhy bílkoviny v aktivních a neaktivních vzorcích. Srovnáním poměrných migračních vzdáleností aktivní bílkoviny a bílkovinných standardů bylo zjištěno, že nově vyčištěná denaturovaná bílkovina měla molekulovou hmotnost slabě vyšší než marker o hmotnosti 32 500 Da.

#### Příklad 6

##### Vliv pH na hydrolytickou aktivitu

25

30 Profil pH při biotransformaci byl testován za použití výše popsaného spojeného materiálu následně po 4 měsících skladování při -20 °C. Alikvotní část byla rozmrazena při laboratorní teplotě a desetinasobně naředěna destilovanou vodou (zředěný enzymový roztok). Zásobní roztoky 1,1 M pufru o následujících hodnotách pH byly připraveny za použití uvedených solí (pH bylo upraveno podle potřeby hydroxidem sodným nebo kyselinou chlorovodíkovou):

35 pH 6,0 : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 7,0 : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 8,0 : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 pH 9,0 : glycin-HCl  
 pH 10,0 : glycin-HCl  
 pH 11,0 : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

40 Biotransformační reakce byly prováděny v utěsněných lahvičkách následovně:

1 ml zředěného enzymového roztoku  
 100 µl odpovídajícího zásobního roztoku 1,1 M pH pufru  
 40 µl 50% zásobního roztoku racemického ethylketopropofenu  
 2,5% (hm./obj.) Triton X-100

Pro biotransformaci při pH 12,0 byl přidáván 1 M roztok NaOH přímo k reakční směsi o pH 11,0, dokud nebylo získáno požadované pH. Všechny biotransformace byly prováděny dvojmo a reakce probíhaly 1 hodinu za protřepávání při 25 °C. Hlavní výsledky reakcí jsou uvedeny v Tabulce 7. Maximální aktivita byla nalezena při pH 10.

5

Tabulka 7: AJ3 biotransformační profil v závislosti na pH

pH biotransformace	aktivita (U.ml <sup>-1</sup> )	normalizovaný výtěžek (%)
6	1,32	27,6
7	1,97	41,2
8	2,47	51,7
9	2,95	61,7
10	4,78	100,0
11	2,35	49,2
12	0,36	7,5

10

## PATENTOVÉ NÁROKY

- 15 1. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vychází ze směsi enantiomerů alkylesteru 2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny a zahrnuje použití, jako biokatalyzátoru, mikroorganismu rodu Ophiostoma nebo Ceratocystis, nebo látky, mající od něho odvozenou enzymovou aktivitu.
- 20 2. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že poskytuje kyselinu (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionovou v nejméně 93% přebytku uvedeného enantiomeru, při 15 až 25% konverzi.
- 25 3. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle nároků 1 nebo 2, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že biokatalyzátorem je mikroorganismus Ophiostoma novouli, IMI 356050.
- 30 4. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle nároku 3, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že alkylester má 1 až 3 atomy uhlíku.
- 35 5. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle nároku 4, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že alkylesterem je ethylester.
6. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle kteréhokoli z předcházejících nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce se provádí při pH 8 až 11.
- 40 7. Způsob výroby převážně (S)-2-(3-benzoylfenyl)propionové kyseliny podle kteréhokoli z předcházejících nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že reakce se provádí při pH 9,5 až 10,5.

---

Konec dokumentu

---