

56.453/MA

2785/92

K I V O N A T

2785

63658

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

Eljárás Candida lipáz enantioszelektivitásának növelésére és
immobilizált Candida lipáz előállítására

Chemie Linz GmbH, LINZ, AUSZTRIA

A bejelentés napja: 1992. 08. 28.

Elsőbbsége: 1991. 08. 30. (A 1715/91) AUSZTRIA

A találmány tárgya eljárás a Candida nemzetség egyik mikroorganizmusából származó immobilizált lipáz előállítására és enantioszelektív észterezésre való alkalmazására.

Az immobilizált lipázt úgy állítják elő, hogy a lipáz oldatát egy epoxid-aktivált makropórusos hordozóval reagáltatják, mire a lipáz a benne lévő lizin epszilon-aminocsoportján keresztül N-alkilezéssel a felnyílt epoxidkötéseken át kovalens kötéssel a hordozóhoz kapcsolódik. Az immobilizált lipáz egy enolészter jelenlétében enantioszelektív átészterezést hajtott végre egy molekulájában legalább egy aszimmetriacentrumot tartalmazó alkohol enantiomereleggyével.

Az immobilizálás az enzim ismételt alkalmazás során való stabilitását is növeli.

jellemző leírás

Rigler Edit

56.453/MA

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1061 Budapest, Dalszínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

27573

63658

RÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

"A"

NS205: C12P 41/00
21/02

Eljárás Candida lipáz enantioszelektivitásának növelésére és
immobilizált Candida lipáz előállítására

Chemie Linz GmbH, LINZ, AUSZTRIA

Feltalálók: Dr. FABER Kurt, GRAZ,

BERGER Brigitte, GREIFENBURG,

AUSZTRIA

A bejelentés napja: 1992. 08. 28.

Elsőbbsége: 1991. 08. 30. (A 1715/91) AUSZTRIA

A találmány tárgya eljárás a Candida nemzetség egy mikro-
organizmusából származó lipáz enantioszelektivitásának, aktivi-
tásának és stabilitásának növelésére olyan enzimes átészteresí-
tési eljárásban, amelynek során egy királis alkoholt, amely a
molekulában legalább egy aszimmetriacentrumot tartalmaz, egy
enolészter segítségével enetioszelektíven észterezünk, továbbá
eljárás immobilizált Candida lipáz előállítására.

Királis, enantiomertiszta alkoholok különböző felhasználá-
si célokra, például gyógyszerhatóanyagok vagy agrokemikáliák
szintézisére nagy jelentőséggel bírnak. Előállításuk történhet
például enetioszelektív átészterezéssel, amelynek során egy ki-

rális alkohol enantiomerelegyét egy karbonsav-észter jelenlétében egy hidroláz segítségével reagáltatjuk. Mivel a hidrolázok általában mind az oda- mind a vissza-reakciót is katalizálják, a kívánt végtermék ilyen körülmények között többnyire csak nagyon lassan és nem kielégítő optikai tisztaságban keletkezik. M.Degueil-Castaing és munkatársai a Tetrahedron Letters 28(9), 953 - 954 (1987) közleményben ezért azt javasolják, hogy karbonsav-észterként egy enolésztert használjunk, mert ilyenkor a vissza-reakció nem mehet végbe. Zakrzewska és munkatársai közleményéből [Acta Med.Pol., 29(1-2), 44 (1988)] kiderül, hogy az aldehidek, amelyek az átészterezéskor az enolészterből keletkeznek, az enzim aminosavainak láncvégi funkciós csoportjaival reagálva az enzimet dezaktiválják. Az EP-A 0 321 918 számú európai közrebocsátási iratban leírnak egy eljárást egy racém alkohol enantiomerelegyeinek egy vinil-észterrel vagy vinil-észterben egy lipáz segítségével végzett enzimés racemát szétválasztására, amelynek során a szabaddá váló aldehyd a lipázt nem dezaktiválhatja. Kiderült azonban, hogy egy Candida lipáznak egy ilyen eljárásban való ismételt alkalmazásakor mind aktivitása mind szelektivitása nagyon gyorsan csökken.

C.J.Grey és munkatársai [Enzyme Microbiol. Technol., 12, 800 - 807 (1990)] közlik, hogy egy Candida cylindracea lipáz stabilitása különböző immobilizálási technikákkal növelhető ismételt felhasználás esetére. Enolészterek alkalmazásával végzett átészterezésekről azonban nem történik említés.

Váratlanul azt észleltük, hogy egy Candida lipáznak mind az aldehidekkel szembeni stabilitása, mind az aktivitása és

szokatlan módon a szelektivitása is nő, ha a lipázt egy enolészterek alkalmazásával végzett átészterezési eljárásban való felhasználása előtt a lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportjainak egy epoxid-aktivált makropórusos hordozó epoxidcsoportjaival végzett reagáltatásával, amelynek során N-alkilezés megy végbe, immobilizáljuk. Ezzel az immobilizálással mind a lipáz aldehidekkel szembeni ellenállóképessége mind aktivitása és szubsztrátszelektivitása nő egy nem immobilizált lipázhoz képest, továbbá a szubsztrátszelektivitás ismételt alkalmazáskor sem csökken, hanem teljesen állandó marad.

A találmány tárgyát tehát a Candida nemzetséghez tartozó egyik mikroorganizmusból származó olyan immobilizált lipáz előállítása képezi, amelyre az jellemző, hogy a lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportjai egy epoxid-aktivált makropórusos hordozó felnyílt epoxidcsoportjain keresztül N-alkilezéssel kötődnek, miáltal a lipáz immobilizált lesz.

A Candida nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó lipázon mind a Candida nemzetség tisztítatlan mikroorganizmus-szuszpenziói mind tisztított enzimfrakciók értendők. A Candida (C.) nemzetséghez tartozó fajok például a C.antarctica, C.rugosa, C.cylindracea. Előnyösen C.cylindracea-ból származó lipázt használunk. A Candida nemzetségből származó lipázok különböző tisztasági fokozatokban a kereskedelemben beszerezhetők.

A lipáz immobilizálására egy epoxid-aktivált makropórusos hordozót használunk. Előállítása például vinil-acetát és egy vinil-acetáttal kopolimerizálható monomer, például N,N'-divinil-etilén-karbamid vízben végzett suszpenziós polimerizálásával,

az acetát-csoportok hidroxí-csoportokká való részleges elszáppanosításával és ezt követően epiklórhidrinrel végzett reagáltatásával történik, amely szabad hidroxicssoportokkal epoxidgyűrű kialakulása közben reagál. Ennek során a polimerizátumban reakcióképes epoxidcsoportokból álló "spacer" csoportok képződnek, amelyek a hordozónak különböző szubsztrátokkal való kapcsolására alkalmasak. Ilyen hordozókat és előállításukat például K.Burg és munkatársai írnak le [Angew. Makromol. Chem., 157, 105 - 121 (1988)]. Ezek a kereskedelembe beszerezhetők. Hordozóként különösen előnyösen Eupergit C-t (Röhm Pharma, NSZK) vagy VA-Epoxy-Biosynth-et (Riedel de Haen, NSZK) használunk.

A.N.Glazer leírja ["The Proteins", H.Neurath and R.L.Hill szerk., Academic Press, London, 1976, 2.kötet, 1 - 109.old.], hogy az enzimek ilyenfajta immobilizálásakor elsősorban a lizin epszilon-aminocsoportjai reagálnak a hordozó epoxidcsoportjaival, amelynek során a lizin aminocsoportjai alkileződnek.

A találmány szerinti lipáz tehát a lipáz lizinjének epszilon-aminocsoportjain alkileződik a hordozó epoxidcsoportjai által, azaz a hordozóhoz kovalensen kötődik.

A találmány tárgya tehát eljárás az előbbiekben tárgyalt immobilizált lipáz előállítására. Az előállítás során egy epoxid-aktivált makropórusos hordozót egy Candida-lipáz enzim vizes oldatával hozunk érintkezésbe 15°C-tól a lipáz dezaktiválási hőmérsékletéig, előnyösen 18°C-tól 30°C-ig terjedő hőmérsékleten, például egy rázólabdikban mozgatva. A hordozó és a lipáz arányát úgy kell megválasztani, hogy a reakcióelegyben a lipázban levő lizin szabad aminocsoportjaira csoportonként

a hordozó egy epoxidcsoportja jusson. Előnyösen 1 g hordozóhoz körülbelül 0,05 - 0,1 g lipázt használunk. A lipáz lehet tiszta vízben, valamilyen puffer- vagy sóoldatban oldva. A lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportjai a hordozó epoxid-csoportjaival N-alkilezés közben reagálnak, amikor a lipáz és a hordozó között kovalens kötés jön létre. A reakció befejeződése után az immobilizált lipázt, adott esetben sóknak, például nátrium-kloridnak a reakciólegyhez való hozzáadása után, kiszűrjük és pufferoldattal mossuk. Az immobilizált lipáz a pufferban vagy nedvesen vagy szárítva is tárolható a felhasználásig.

Az ilyen módon előállított lipázt királis alkoholok enantiomerelegyeinek enolészterek alkalmazásával végzett átészterezés útján végzett enantioszelektív észterezésére használhatjuk.

A találmány tárgyát képezi ezért egy molekulájában legalább egy aszimmetriacentrumot tartalmazó alkohol enantioszelektív észterezésére szolgáló eljárás, amelyre az jellemző, hogy az alkoholt egy enolészter és egy, a Candida nemzetség egyik mikroorganizmusából származó lipáz jelenlétében észterezzük, amely lipáz a lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportján egy epoxid-aktivált, makropórusos hordozó felnyílt epoxid-kötéseivel N-alkilezés útján kovalensen kötve van, és a királis alkohol képződő észterét és adott esetben az elreagálatlan alkoholt elkülönítjük a reakcióelegyből.

A reakcióba vitt alkohol legalább egy aszimmetriacentrummal rendelkezik, és ezért optikailag aktív. Előfordulhat ra-

cém enantiomerelegyek formájában vagy olyan elegyekként, amelyekben az egyik vagy a másik enantiomer fel van dúsítva.

A találmány szerinti immobilizált lipázzal mind primer mind szekunder alkoholok reagáltathatók. Az alkohol lehet egy molekulában két aszimmetriacentrummal rendelkező kétértékű alkohol, diol is, amely esetben R,S-, S,R-, R,R- vagy S,S-alkoholok elegyei fordulhatnak elő. Előnyös, ha szubsztrátként a molekulában egy aszimmetriacentrumot tartalmazó szekunder alkoholokat használunk.

Enolészterként például az EP-A 0 321 918 számú európai közrebocsátási iratban közölt enolészterek használhatók. Előnyösen rövidszénláncú szerves savak vinilésztereit, különösen vinil-acetátot, vinil-propionátot, vinil-butirátot használunk.

A reakció kivitelezésekor a királis alkoholt tartalmazó enantiomerelegy minden grammjára számítva 2 - 30 g, előnyösen 6 - 10 g immobilizált lipázt és legalább 5 ekvivalens enolésztert használunk, adott esetben a reakciókörülmények között inert higítószerrel elegyítve, és a reagáltatást keverés vagy rázás közben, 15°C-tól a lipáz dezaktiválási hőmérsékletéig terjedő hőfokon, előnyösen szobahőmérsékleten végezzük.

A reakció végezhető a reakciókörülmények között inert higítószerben, vagy maga az átészterezéshez használt enolészter is használható higítószerként és nagy feleslegben. Előnyös, ha a reakciót nem egy, a reakciókörülmények között inert higítószerben, hanem a reakcióban alkalmazott enolészterben hajtjuk végre.

A reakciót célszerűen olyan hőmérsékleten hajtjuk végre, ahol a lipáz legnagyobb aktivitását mutatja. Ezt a hőmérsékletet általában a gyártó vagy szállító megadja, vagy egyszerűen kísérletileg megállapítandó. A reakció során az alkalmazott alkoholkeveréktől, az enolészttertől és a felhasznált lipáz specifikitásától függően túlnyomórészt az alkalmazott alkoholnak megfelelő R- vagy túlnyomórészt az S-, illetve túlnyomórészt az R,S- vagy túlnyomórészt az S,R-észter keletkezik, míg a megfelelő S- vagy R-, illetve S,R-, R,S-, R,R- vagy S,S-alkohol nem vagy csak kis mértékben reagál.

A reakció előrehaladását megfelelő és az enzimkémiában ismert módszerekkel, például gázkromatográfiás módszerek segítségével követjük.

A reakciót a termék kívánt enantiomertisztaságának elérése után megszakítjuk, és a reakcióelegyet feldolgozzuk. Ennek során az immobilizált lipázt kiszűrjük, és az anyalúgot megfelelő műveleti hőmérsékleten bepároljuk, amelynek során a kívánt termékek izolálhatók. A kívánt terméknek a reakcióelegyből való elválasztása extrakció, desztilláció, kromatográfia segítségével a szokásos módon történhet.

Az eljárás egy előnyös kiviteli formájában egy alkohol racém elegyét VA-Epoxy-Biosynth (Riedel-de-Haen) segítségével immobilizált *Candida cylindracea* lipázzal vinil-acetátban keverjük vagy rázatjuk. A képződő R- vagy S-, illetve R,S- vagy S,R-észter kívánt enantiomerfeleslegének elérése után az enzimet kiszűrjük, és a kívánt termékeket desztillációval vagy kromatográfiásan elválasztjuk.

Kísérleteink során kiderült, hogy a találmány szerinti reakció esetében egy nem immobilizált lipázhoz viszonyítva mind a lipáznak acetaldehiddel szembeni ellenállóképessége mind aktivitása és szelektivitása nőtt. Különösen meglepő volt a szelektivitás több mint 5-szörös növekedése, ami az immobilizált lipáz ismételt felhasználásakor teljesen állandó maradt.

Az immobilizált lipáz és alkalmazása a találmány szerinti enantioszelektív észterezésnél a technika jelenlegi állásának fejlődését jelenti.

1.példa:

10,0 g VA-Epoxy-Biosynth-et (Riedel-de-Haen, NSZK) 70 ml 0,1 n foszfátpufferban (pH 7,0) szuszpendálunk, és 300 mg *Candida cylindracea* lipáz (AY-30, Amano Pharm. Co., Japán) hozzáadása után 27°C-on és percenkénti 80 fordulaton 3 napig rázatjuk. Hozzáadunk 70 ml nátrium-klorid-oldatot, és utána szűrjük, majd kétszer 30 - 30 ml 0,05 n foszfátpufferral (pH 7,0) mossuk és szárítjuk.

Az így előállított immobilizált lipáz fajlagos aktivitását triacetin 0,1 n foszfátpufferban (pH 7,0) végzett hidrolízisekor keletkező ecetsav 0,1 M nátrium-hidroxid-oldattal végzett titrálásával határoztuk meg, és $5,70 \mu\text{mol} \cdot \text{perc}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ -nek találtuk. A nem immobilizált lipáz fajlagos aktivitása azonos körülmények között $13 \mu\text{mol} \cdot \text{perc}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.példa:

1 g (9 mmol) racém endo-norborn-5-én-2-olt 200 mg *Candida*

cylindracea lipázzal (AY-30, Amano Pharm. Co., Japán) elegyítünk, és 10 ml vinil-acetáttal 20°C-on és percenkénti 200 fordulatonál rázatjuk. A reakció előrehaladását gázkromatográfiásan követjük nyomon. A reakciót 4 óra elteltével leállítjuk. A lipázt kiszűrjük, és az anyalúgot vákuumban bepároljuk. A maradék szilikagélen végzett szokásos oszlopkromatográfiás tisztítása után (+)-endo-norborn-5-en-5-ül-acetátot és (-)-endo-norborn-5-en-2-olt kapunk.

A lipáz aktivitására, az átalakulásra és az enantiomera-rányra vonatkozó mérési eredményeket az 1.táblázatban foglaljuk össze.

3.példa:

A reakciót a 2.példában leírtak szerint végezzük, azzal az eltéréssel, hogy az 1.példa szerint készített immobilizált lipázt használunk.

A lipáz aktivitására, az átalakulásra és az enantiomera-rányra vonatkozó mérési eredményeket az 1.táblázatban foglaljuk össze.

1.táblázat

A	Lipáz	Akt.	% ee (-) Alk.	% ee (+) Est.	S
1.	Össz.	39	51,4	66,5	8
2.	Össz.	1	11,0	54,0	4
3.	Össz.	-	-	-	-
1.	Imm.	100	62,2	91,3	42
2.	Imm.	50	66,0	91,7	42
3.	Imm.	23	59,1	91,8	42

A táblázatban használt rövidítések jelentése a következő:

A: alkalmazások száma

Össz.: összehasonlítás

I: immobilizált lipáz

Akt. relatív aktivitás, meghatározva a reakció lefutásának a reakció első 20%-a során mért meredekségéhez viszonyítva (tangens módszer).

% ee (-) Alk: az elreagálatlan (-)-endo-norborn-5-en-2-ol enantiomerfeleslege

% ee (+) Est: a képződött (+)-endo-norborn-5-en-2-ol enantiomerfeleslege

A mindenkori enantiomerfelesleget a megfelelő mentil-klór-formiát gázkromatográfiás elválasztásának segítségével határoztuk meg, amelyet (-)-mentil-klór-formiáttal való származékképzéssel állítottunk elő B.Berger és munkatársai szerint [Tetrahedron: Asymmetry, 1, 541 - 546 (1990)].

S: a reakció enantioszelektivitása Chen és munkatársai szerint [J.Am.Chem.Soc., 104, 7294 - 7299 (1982)] meghatározva.

S z a b a d a l m i i g é n y p o n t o k

1. A Candida nemzetség egyik mikroorganizmusából származó lipáz, azzal jellemezve, hogy a lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportjai egy epoxid-aktivált makropórusos hordozó felnyílt epoxid-csoportjain keresztül N-alkilezéssel kovalensen kötődnek, miáltal a lipáz immobilizálódik.

2. Az 1.igénypont szerinti lipáz, azzal jellemezve, hogy a makropórusos hordozót vinil-acetát és egy olyan monomer vízben végzett szuszpenziós polimerizációjával állítjuk elő, amely vinil-acetáttal kopolimerizálható, majd az acetátot részlegesen elszappanosítjuk hidroxicsoportokká, és ezt követően epiklórhidrinrel reagáltatjuk, ami a szabad hidroxicsoportokkal epoxid-gyűrű képződése közben reagál.

3. Eljárás a Candida nemzetség egyik mikroorganizmusából származó lipáz immobilizálására, azzal jellemezve, hogy egy epoxid-aktivált makropórusos hordozót egy Candida-lipáz vízzel, valamilyen puffer- vagy sóoldattal készített oldatával 15°C-tól a lipáz dezaktiválási hőmérsékletéig terjedő hőmérséklet-tartományban reagáltatunk, amikor a lipázban levő lizin epszilon-aminocsoportjai és az epoxid-aktivált makropórusos hordozó felnyílt epoxid-kötései között N-alkilezéssel kovalens kötések alakulnak ki.

4. A 3.igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a makropórusos hordozót grammonként 0,05 - 0,1 g lipázzal reagáltatjuk.

5. Egy 1.igénypont szerinti lipáz alkalmazása egy királis alkohol valamilyen enolészter segítségével végzett enantioszelektív észterezésére.

6. Eljárás egy királis alkohol enantioszelektív észterezésére, azzal jellemezve, hogy az alkoholt egy enolészter és egy, a Candida nemzetséghez tartozó mikroorganizmusból származó olyan lipáz jelenlétében észterezzük, amely lipáz N-alkilezéssel a lizin epszilon-aminocsoportjain át egy epoxid-aktivált makropórusos hordozó epoxidcsopotjaival kovalensen kötve van, majd a királis alkohol képződött észterét és adott esetben az el nem reagált alkoholt izoláljuk a reakcióelegyből.

7. A 6.igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a királis alkohol egy grammjára számítva legalább 5 ekvivalens enolésztert és 2 - 30 gramm immobilizált lipázt reagáltatunk.

8. A 6. vagy 7.igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az észterezéshez higítószerként azt az enolésztert használjuk, amelyet reakciópartnerként is használunk.

9. A 6 - 8.igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy enolészterként vinil-acetátot, vinil-propionátot vagy vinil-butirátot használunk.

10. A 6 - 9.igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy lipázként a Candida cylindracea faj egyik mikroorganizmusából származó lipázt használunk.

12 oldal

A meghatalmazott

Ligz Edit

Machytko János
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi
Szabadalmi Társaság tagja
H-1061 Budapest, Doksizínház u. 10.
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664