

(19) HU

MAGYAR  
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

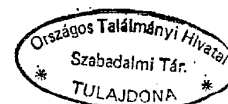
(11) (13)  
**193234 B**

(22) A bejelentés napja: 84.11.02. (21) 4071/84  
(33) JP:  
(32) 83.11.04.  
(31) 205859/83

(51) Int.Cl.  
C 12 P 13/04  
C 12 N 9/78

(41) (42) A közzététel napja: 1986.05.28.

(45) Megjelent: 1988.11.15.



(72) Feltalálók:  
UMEZAWA Hamao, TAKEUCHI Tomio, HAMADA Masa, IWADARE Shuichi, MATSUMOTO Ikuo, MORISHIMA Hajime, Tokió, NAGATSU Toshiharū, Kanagawa-ken, JP

(73) Szabadalmaz:  
Banyu Pharmaceutical Co., Ltd., Tokió, Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai, Tokió, JP

## (54) ELJÁRÁS OPTIKAILAG AKTÍV 3-/3,4-DIHI-DROXI-FENIL/-SZERIN ÉS SZÁRMAZÉKAI ELŐÁLLÍTÁSÁRA

### (57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárással (II) általános képletű optikailag aktív L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint és -származékokat, ahol a képletben

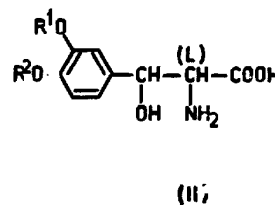
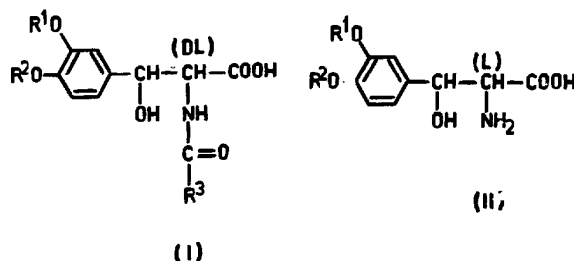
R<sup>1</sup> és R<sup>2</sup> jelentése hidrogénatom vagy fenil-(1-4 szénatomos) alkil-, naftil-(1-4 szénatomos) alkilcsoport vagy

R<sup>1</sup> és R<sup>2</sup> együtt (1-4 szénatomos) alkilén-csoport, továbbá optikailag aktív (III) általános képletű D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékokat, ahol a képletben

R<sup>1</sup> és R<sup>2</sup> jelentése a fenti, és R<sup>3</sup> jelentése adott esetben halogénatommal vagy hidroxilcsoporttal helyettesített (1-4 szénatomos) alkilcsoport, vagy fenil- vagy naftilcsoport,

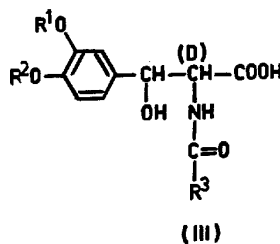
úgy állítanak elő, hogy egy (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, melynek képletében R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> és R<sup>3</sup> jelentése a fentiekben megadott, L-izomerjének aminocsoportjáról az N-acilcsoportot egy

*Actinomyces aureovorticillatus* (ISP 5080), *Actinomyces bicolor* (ISP 5140), *Streptomyces blastmyceticus* (ISP 5029), *Streptomyces chartreusis* (ISP 5085), *Streptomyces flavopersicus* (ISP 5093), *Actinomyces flavotricini* (ISP 5152), *Streptoverticillium griseocarneum* (ISP 5004), *Streptomyces hachijoensis* (ISP 5114), *Streptomyces halstedii* (ISP 5068), *Streptoverticillium hirosimense* (ISP



(I)

(II)



(III)

5037), *Streptomyces tendae* (ISP 5101) és *Streptomyces toyocaensis* (ISP 5030) fajba tartozó mikroorganizmusban lévő vagy mikroorganizmus által termelt aciláz enzimmel lehidrolizálják, majd a keletkezett (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-

-származékot, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése a fentiekben megadott, a dezacilezés után változatlanul visszamaradó (III) általános képletű N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-vegyülettől — ahol a képletben  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  jelentése a fentiekben megadott — elkülönítik.

A találmány tárgya új eljárás egy optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, illetve e vegyület egy olyan származéka előállítására, amelyben a fenilcsoporton levő 3- és 4-helyzetű katekolos hidroxilcsoportok védettek, és amely származék alkalmas köztiterméke egy optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-N-metil-szerin előállítására irányuló eljárásnak. Az optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin gyógyszerként ismert anyag.

A 49252/75 és 20747/80 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású („Kokai”) szabadalmi bejelentésekből, a 3.920.728 és a 4.319.040 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásokból ismeretes, hogy az L-treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin (amelyet egyes esetekben L-treo-DOPS-ként is emlegetnek) előnyösen alkalmazható depresszió ellenes vagy magasvérnyomás elleni szerként. A 125630/77 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású („Kokai”) szabadalmi bejelentés pedig e vegyületnek a Parkinson-kór kezelésére való felhasználhatóságát ismerteti. Az L-eritro-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin magasvérnyomás ellenes szerként használható a 49252/75 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású („Kokai”) szabadalmi bejelentés szerint.

Továbbmenőleg, egy olyan L-treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származék, amelynek a benzolgyűrűn meta- és para-helyzetben található hidroxilcsoportjai oxigénatomjukon keresztül valamely szokásosan alkalmazott hidroxil-védőcsoporttal kapcsolódnak, kiindulási anyagként használható fel az L-treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-N-metil-szerin szintézisének, mely utóbbi vegyület értékes pszichotróp gyógyszerhatóanyag. A 221797/82 számú japán szabadalmi bejelentés, az 523.957 sorozatszámú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés és a 0112606 AI közzétételi számú európai szabadalmi bejelentés szerint különösképpen depresszió ellenes és Parkinson-kór elleni hatással rendelkezik.

Egy olyan L-eritro-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származék pedig, amelyben a fenilcsoport 3- és 4-helyzetű, katekolos jellegű hidroxilcsoportjai védve vannak, kiindulási vegyületként alkalmazható az L-eritro-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-N-metil-szerin szintézisének. Ez utóbbi vegyület, a 72053/83 számú japán szabadalmi bejelentésben foglaltak szerint, értékes vérnyomáscsökkentő hatással rendelkezik.

A treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin egy optikailag aktív, azaz D- vagy L-alakja előállítására számos különféle, a technika állásához tartozó eljárás ismeretes: ezek mindegyike magában foglal egy olyan lépést, hogy egy optikailag inaktív vegyületet, a DL-treo-N-(benzil-oxi-karbonil)-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint, rezolválásnak vetnek alá, amelynek során egy optikailag aktív efedrin-származékot vagy egy optikailag aktív treo-1-(p-nitro-fenil)-2-amino-1,3-propándiolt (lásd a 49252/75 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású), („Kokai”) szaba-

dalmi bejelentést, kinint (lásd a 65242/77 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású), („Kokai”) szabadalmi bejelentést, egy optikailag aktív treo-1-(p-metil-szulfonil-fenil)-2-amino-1,3-propándiolt (a 36233/79 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású („Kokai”) szabadalmi bejelentés szerint) és optikailag aktív S-2-amino-1,1-difenil-propanolt, S-2-amino-3-metil-1,1-difenil-butanolt vagy S-2-amino-4-metil-1,1-difenil-pentanolt (a 29551/81 számú japán, vizsgálat nélküli első közrebocsátású („Kokai”) szabadalmi bejelentésben foglaltak szerint) alkalmaznak. A rezolválás után az ily módon elkülönített, optikailag aktív treo-N-(benzil-oxi-karbonil)-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerinről eltávolítják a benzil-oxi-karbonil-csoportot, amely az aminocsoport védelmére szolgált, és a katekolos hidroxilcsoportokat védő benzilcsoportokat. Mindezek ellenére, a technika állásához tartozó fentebb ismertetett eljárások hátrányai közé számít az, hogy az optikai rezolváláshoz használt fentemlített vegyületek kereskedelmi beszerzése nehézségekkel jár, hogy az optikai izoméria szempontjából nagytisztaságú L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint ezen a módon nem lehet előállítani csak a kikristályosítás és újralecsapás műveletének fáradságos, többszöri megisméltése révén, valamint az, hogy a közti-termékként kapott diasztereomer só elbontása céljából egy külön lépésre van szükség.

Mindezek ismeretében, mi, a jelen találmány szerzői, vizsgálat tárgyává tettük, hogy vajon a DL-treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin optikailag rezolválható-e a D-, illetőleg L-izomerre egy enzimátikus eljárás segítségével? Azt találtuk, hogy ez az elképzelésünk sikerrel vihető keresztül abban az esetben, ha egy (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékot állítunk elő — ahol az (I) általános képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése hidrogénatom vagy fenil-(1-4 szénatomos)alkil-, naftil-(1-4 szénatomos)alkilcsoport vagy  $R^1$  és  $R^2$  együtt (1-4 szénatomos)alkilcsoport, és  $R^3$  jelentése adott esetben halogénatommal vagy hidroxilcsoporttal helyettesített (1-4 szénatomos)alkilcsoport, vagy fenil- vagy naftilcsoport —, és ezen N-acilezett szerinszármazékot egy olyan aciláz enzimmal reagáltatjuk, amely képes arra, hogy az  $R^3CO$ -képletű N-acil-csoportot szelektíven, a fenti (I) általános képletű DL-vegyület L-izomerjének  $\alpha$ -amino-csoportjáról távolítsa el, de ugyanakkor nem képes arra, hogy az említett (I) általános képletű DL-molekulavegyület D-izomerjének  $\alpha$ -amino-csoportjáról az acil védőcsoportot eltávolítsa; ily módon egy (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékhoz jutunk, amelynek képletében  $R^1$  és  $R^2$  jelentése fenti, s ugyanakkor a (III) általános képletű N-acilezett-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, amelynek képletében  $R^1$ ,  $R^2$  és  $R^3$  jelentése előzők szerinti, változatlanul visszamarad. Kísérleteink eredmé-

nyeképpen azt találtuk, hogy egyetlen ismert, a kereskedelemben jelenleg beszerezhető aciláz enzim sem képes az  $R^3CO$ -képletű N-acil-védőcsoportot szelektíven az N-acil-L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinről aszimmetriás hidrolízis révén eltávolítani. Ennek megfelelően kiterjedt vizsgálatokat folytattunk a természetben előforduló anyagok és vegyületek széles körében, és felfedeztük, hogy néhány, a **Streptomyces** nemzetségbe tartozó mikroorganizmus és egyes, a **Streptovercillium** nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok képesek arra, hogy az N-acil-védőcsoportot szelektíven az N-acil-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin L-enantiomerjéről hidrolizálják le, miáltal az (I) általános képletű DL-molekulavegyületben jelenlevő L-alak dezacileződik csak. Tehát ezek a **Streptomyces**, illetve **Streptovercillium** nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok olyan aciláz enzimekkel rendelkeznek, amelyek képesek arra, hogy a treo- vagy eritro-N-acil-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin L-enantiomerjét hidrolizálják, ezáltal szelektíven csak az L-alakról távolítsák el az N-acil-védőcsoportot.

Ennélfogva azt találtuk, hogy a találmány célkitűzésének megvalósítása céljából a következőképpen járhatunk el: az ismert módon előállított DL-treo- vagy DL-eritro-DOPS, illetve ezen vegyületek O-védett származéka, amelyben a katekolos, 3- és 4-helyzetű hidroxilcsoportok védettek, N-acilezését valamilyen aktív alkanoil-, illetve aroilcsoportot tartalmazó vegyület felhasználásával, ismert módon hajtjuk végre, és az így kapott N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint vagy annak O-védett származékát, amelyben a katekolos jellegű, 3- és 4-helyzetű hidroxilcsoportok védve vannak, azután enzimes kezelésnek vetjük alá, ahol az említett szerin-származékokkal reakcióba lépő enzimet valamely, a **Streptomyces** vagy a **Streptovercillium** nemzetségbe tartozó mikroorganizmus tenyésztésdata szolgáltatja, amely a megfelelő aciláz tartalmazza. De enzimmforrásként szolgálhat valamely, az említett tenyésztésdata kezelése által nyert anyag is, amely az aciláz enzimet tartalmazza, így például az említett tenyésztésdataból elkülönített mikroorganizmus-sejtek, vagy ez utóbbiak kezelése útján nyert enzimatartalmú anyag, vagy maga az említett mikroorganizmus által termelt és abból kivont aciláz enzim is. Az enzimes kezelés eredményeképpen, az N-acilezett szerin-származék sztereoszzelektív hidrolízise és az N-acil-védőcsoport eltávolítása következtében az L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint vagy annak olyan védett származékát kapjuk, amelynek molekulájában a katekolos, 3- és 4-helyzetű hidroxilcsoportok védettek, míg az N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin vagy annak O-védett származéka, amelyben a katekolos, 3- és 4-helyzetű hidroxilcsoportok védettek, változatlanul visszamarad, anélkül, hogy az enzimatis reakcióban részt vett volna. Az eljárás következő lépésében az L-

4

-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint a reagálatlanul visszamaradó N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származéktól könnyűszerrel elválaszthatjuk e vegyületek különböző oldékonyságának felhasználása révén, illetve bármilyen egyéb, eltérő fizikokémiai tulajdonságuk alapján. Ezen felismerések felhasználásával a jelen találmány célkitűzése megvalósítható.

10 Találmányunk így - egyfelől - eljárást biztosít egy optikailag aktív, (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin és -származékok előállítására, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése hidrogénatom vagy fenil-(1-4 szénatomos)alkil-, naftil-(1-4 szénatomos)alkilcsoport, vagy  $R^1$  és  $R^2$  együtt (1-4 szénatomos)alkilcsoport, továbbá optikailag aktív (III) általános képletű D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékok előállítására, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése a fenti és  $R^3$  jelentése adott esetben halogénatommal vagy hidroxilcsoporttal helyettesített (1-4 szénatomos)alkilcsoport, vagy fenil- vagy naftilcsoport.

25 A találmány szerinti eljárást úgy végezzük, hogy egy (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, amelynek képletében  $R^1$ ,  $R^2$  és  $R^3$  jelentése a fentiekben megadott, L-izomerjének aminocsoportjáról az N-acilcsoportot egy **Actinomyces aureovercillatus**, **Actinomyces bicolor**, **Streptomyces blastmyceticus**, **Streptomyces chartreusis**, **Streptomyces flavopersicus**, **Actinomyces flavotricini**, **Streptovercillium griseocarneau**, **Streptomyces hachijensis**, **Streptomyces halstedii**, **Streptovercillium hirosimense**, **Streptomyces tendae**, **Streptomyces toyocaensis**

fajba tartozó mikroorganizmus által termelt aciláz-enzimmal lehidrolizáljuk. Maga a mikroorganizmus helyett a mikroorganizmusnak egy olyan kivonata is alkalmazható, amely azt az aciláz enzimet tartalmazza, amely az (I) általános képletű DL-szerin-származékban jelenlevő L-enantiomer aminocsoportjáról az N-acil-védőcsoportot szelektíven eltávolítani képes, és ezáltal egy (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékot képes termelni.

55 A (II) általános képletű L-szerin-származéknak a (III) általános képletű, nem dezacileződött N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerintől való elkülönítésének lépése zárja a reakciósört.

60 Kívánt esetben a találmány szerinti eljárás egy további reakciólépést is magába foglalhat: a megmaradt  $R^1$  és  $R^2$  hidroxil-védőcsoportok eltávolítását a kapott (II) általános képletű, O-védett, L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékról. Ez önmagában ismert eljárás segítségével történik és eredményeként az L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint

65

kapjuk. Más esetben az N-acil-védőcsoportot kell eltávolítani — esetleg az O-védőcsoportok eltávolítása mellett — a találmány szerinti eljárással kapott (III) képletű N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-vegyületről.

Amennyiben szükség van rá, ezt követi az R<sup>1</sup> és R<sup>2</sup> hidroxil-védőcsoportok eltávolítása a kapott D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin O-védett származékáról, amelynek végrehajtása ismert módon történik és D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint eredményez. Így amikor a (III) képletű, a találmány szerinti eljárásnak megfelelően előállított N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint valamely kémiai ágens segítségével, ismert módon elhidrolizáljuk az N-acilcsoport eltávolítása céljából, akkor a D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint vagy annak olyan O-védett származékát kapjuk, amelynek 3-as és 4-es helyzetű katekolos hidroxilcsoportja védőcsoporttal van ellátva.

A jelen találmány szerinti eljárás értelmében semmiféle optikai rezolválás céljából alkalmazott vegyszerre nincs szükség, amellett, hogy a köztitermékként keletkezett diasztereomer só elbontására szolgáló lépés — amely szükségképpen elemét képezte a rezolváló ágens alkalmazásával járó optikai rezolválási műveletnek — is elmaradhat, a találmány szerinti eljárásban felhasznált enzim alkalmazása következtében. Így a találmány szerinti eljárással optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint, illetve e vegyület katekolos hidroxilcsoportjain védőcsoportokat tartalmazó származéka könnyűszerrel, az optikai izóméria szempontjából igen tisztán állítható.

A találmány szerinti eljárásban alkalmazott az előzőekben felsorolt fajhoz tartozó mikroorganizmusok az (I) általános képletű DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-vegyületben jelenlévő L-alakról távolítják csak el az N-acil-védőcsoportot. Ezáltal szelektív dezacileződés valósul meg.

Bármely olyan mikroorganizmus alkalmazása számításba jöhet, amelynek szervezetében van ilyen, vagy amely maga termelni képes ilyen szelektív dezacilezést katalizáló enzimet.

Az alábbiakban példák gyanánt felsorolunk néhány olyan mikroorganizmust, amely a találmány szerinti eljárás kivitelezése során előnyösen alkalmazható:

**Actinomyces aureoverticillatus** (IMC S-0234) (ISP 5080) (FERM P-7216) (ATCC 19726) CBS 465.68) (IFO 12742), **Actinomyces bicolor** (IMC S-0276) (ISP 5140) (ATCC 23614; CBS 469.68) (IFO 12746), **Streptomyces blastomyceticus** (IMC S-0189) (ISP 5029) (FERM P-7217) (ATCC 19731; CBS 470.68) (IFO 12747), **Streptomyces chartreusis** (IMC S-226) (ISP 5085) (ATCC 19738; CBS 476.68) (IFO 12753), **Streptomyces flavopersicus** (IMC S-0204) (ISP 5093) (ATCC 19756; CBS 494-68) (IFO 12769), **Actinomyces flavotricini** (IMC S-0219) (ISP 5152) (ATCC 23621; CBS

495.68) (IFO 12770), **Streptovorticillium griseocarneum** (IMC S-0237) (ISP 5004) (ATCC 19763; CBS 501.68) (IFO 12776), **Streptomyces hachijoensis** (IMC S-0244) (ISP 5114) (FERM P-7218) (ATCC 19769; CBS 507.68) (IFO 12782), **Streptomyces halstedii** (IMC S-0194) (ISP 5068) (ATCC 19770; CBS 508.68) (IFO 12783), **Streptovorticillium hiroshimense** (IMC S-0179) (ISP 5037) (FERM P-7252) (ATCC 19772; CBS 510.68) (IFO 12785), **Streptomyces tendae** (IMC S-0168) (ISP 5101) (ATCC 19812; CBS 565.68) (IFO 12822) és **Streptomyces toyocaensis** (IMC S-0163) (ISP 5030) (FERM P-7253) (ATCC 19814; CBS 567.68) (IFO 12824) és mások.

Mindeme fentemlített mikroorganizmusok jól ismert, törzsgyűjteményekben letétbe helyezett tenyészkultúrákból való. E mikroszervezetek mikrobiológiai tulajdonságainak leírása az „International Journal of Systematic Bacteriology” 18. kötet, 2. szám 1968 áprilisában megjelent számának 84—176. oldalain található; e műre történő hivatkozás a jelen szabadalmi leírásban utalásként itt fordul elő. Valamennyi fentebb felsorolt mikroorganizmus a köz számára hozzáférhető Japánban az oszakai „The Institute for Fermentation, Osaka (IFO) Organization” nevű letéti intézménynél, amelynek címe: 17—85 Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka, 532, Japán. Az IFO nyilvántartási számok, amelyeket fentebb megadtunk, az IFO által kiadott „List of Cultures” 1984, 7. kiadásában szerepelnek, illetve az ATCC-jelzések a Washington D. C., USA székhelyű „American Type Culture Collection”-tól származnak. A fent megadott „IMC”-számok a jelen szabadalmi bejelentés bejelentőjének referenciaszámjai a bejelentő laboratóriumában, a Tokióban, Kami-Osaki, Meguro-ku székhellyel működő „Institute of Microbial Chemistry” nevű intézményben tárolt mikroorganizmus-tenyészetek megjelölésére. Az „ISP”-számok, amelyek a felsorolásban szereplő egyes mikroorganizmusok neve után találhatóak, az „International Streptomyces Projects” elnevezésű nemzetközi kutatóprogram által e mikroorganizmusokhoz hozzárendelt standard referenciaszámok. A felsorolt mikroorganizmusok között szereplő, FERM P-7216, FERM P-7217 és FERM P-7218 jelzésű törzseket, 1983. szeptember 5-én letétbe helyeztük a „Fermentation Research Institute”, Agency of Industrial Science and Technology nevű japáni intézménynél a fent megadott F.R.I. letéti jelzésekkel ellátva. Jelenleg ugyanott a „FERM BP-640”, „FERM BP-641”, illetve „FERM BP-642” nyilvántartási számokon szerepelnek, és a Mikroorganizmusok Szabadalmi Célokra Történő Letétbehelyezésére Vonatkozó Budapesti Szerződés értelmében 1984. október 18. óta hozzáférhetők. A FERM P-7252 és a FERM P-7253 letéti számú törzseket 1983. szeptember 20-án helyeztük letétbe ugyancsak a „Fermentation Research Institute”-nál, és ezek most a „FERM BP-643” és „FERM

BP-644" nyilvántartási számokon 1984. október 18. óta a Budapesti Szerződés előírásai értelmében hozzáférhetők.

A találmány szerinti eljárás kivitelezése során az (I) általános képletű kiindulási vegyületet, mint az enzim szubsztrátját, úgy vihetjük reakcióba a jelen szabadalmi leírás kitanításával összhangban alkalmazott mikroorganizmussal, hogy az e mikroorganizmus tenyésztésében jelenlevő mikroszervezetekkel a szubsztrátot közvetlenül érintkezésbe hozzuk. A mikroorganizmus tenyésztésének előállítása céljából a mikroorganizmust hagyományos tápközegben, ismert módon tenyésztjük. A tápközegben szénforrásként alkalmazhatjuk az e célra szokás szerint felhasznált anyagokat, így például glükózt, szacharózt, fruktózt, mannózt, keményítőt, melaszféleseket és hasonlókat; nitrogénforrásként ugyancsak a szokásos anyagok használhatók, például szerves anyagok, így pepton, húskivonat, élesztőkivonat, kukoricalékvár, karbamid és hasonló, és/vagy szervesen nitrogénvegyületek, mint például ammónium-hidroxid vizes oldata, ammónium-szulfát, nátrium-nitrát és hasonló. A tenyésztéshez felhasznált tápoldatok továbbá célszerűen megfelelő mennyiségeket tartalmaznak szervesen sókból, így magnézium-szulfátból, nátrium-kloridból, kálium-dihidrogén-foszfátból, dikálium-hidrogén-foszfátból és hasonló sókból, valamint a mikroszervezetek jó szaporodásához megkívánt bizonyos vegyületeket és/vagy az enzim képződését elősegítő adalékanyagokat tartalmaznak. A mikroorganizmus tenyésztését előnyösen aerob körülmények között végezhetjük, például levegőztetés és keverés mellett történő inkubálással. A célszerű tenyésztési hőmérséklet 20°C és 40°C között van. A tenyésztés időtartama normális körülmények között a legtöbb esetben 1 nap és 10 nap között van. A találmány szerinti eljárásban maga a felhasznált mikroorganizmus és a mikroorganizmus tenyésztésdata szolgálnak az enzimikus dezacilezési reakcióban résztvevő aciláz enzim forrásaként. A mikroorganizmus, illetve tenyésztésdatainak felhasználása helyett az is járható út, hogy a tenyésztésből intakt állapotban elkülönített sejteket használjuk fel, amelyek lehetnek élők vagy nem élők, sőt amelyek rögzítettek is lehetnek a mikrobacejtek immobilizálására alkalmazott valamely ismert eljárásnak megfelelően. A jelen találmány szerinti eljárás oly módon is kivitelezhető, hogy az említett mikroorganizmusnak egy olyan kivonatát használjuk fel, amely az említett aciláz enzimet tartalmazza. A mikroszervezetnek ez az aciláz enzimet tartalmazó kivonata megjelenhet a mikroorganizmus tenyésztésdatainak szűrlete alakjában, de nyerhető a sejtek, különösképpen az aciláz enzimet tartalmazó sejthomogenátum kezelése útján, vagy az előzetesen nyers vagy tisztított állapotban elkülönített aciláz enzim ol-

data formájában is alkalmazható. Ez utóbbi oldat lehet a nyers aciláz enzim oldata, amely enzimet a mikroorganizmus tenyésztésdataiban előforduló mikrobacejtekkel ammónium-szulfátos frakcionált lecsapásos módszer segítségével nyerünk ki. A tisztított aciláz enzimhez úgy jutunk, hogy a nyers aciláz enzimet gél-szűréssel vagy más ismert enzimmtisztítási eljárással tisztítjuk. A tisztított enzim oldatát is alkalmazhatjuk. Az aciláz enzim kinyerésénél és tisztításánál bármilyen, az aciláz enzimek előállítására használatos ismert eljárás alkalmazható.

A találmány szerinti eljárásban kiindulási anyagként használt (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint vagy annak a katekolos hidroxilcsoportjain védett származékát a következőképpen állíthatjuk elő: egy (IV) általános képletű karbonsavval, amelynek képletében R<sup>3</sup> jelentése a korábban megadottal azonos, vagy e karbonsav egy reaktív származékával, így például savkloridjával vagy anhidridjével, valamely kondenzációt elősegítő anyag, illetve katalizátor jelenlétében vagy ilyen anyag alkalmazása nélkül, reagáltatjuk a DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint, amelyet korábban ismertté vált eljárások segítségével állíthatunk elő. A DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin helyett alkalmazhatjuk e vegyület egy olyan származékát is reakciópartnerként, amelyben a fenilcsoporton 3- és 4-helyzetben levő katekolos hidroxilcsoportok védettek. A DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin előállítására nézve lásd a J.Chem.Soc. pp. 658-662 (1947), a J.Am.Chem.Soc. 76, pp. 1322-1326 (1954) és a Chem. Ber. 87, pp. 892-901 (1954) irodalmi helyeket. Az N-acil-csoportra előnyös példák gyanánt adhatjuk meg a következőket: acetil, klór-acetil, glikolilcsoport, benzoilcsoport és hasonló csoportok, noha megjegyzendő, hogy bármely acilcsoport számításba jöhet a találmány szerinti eljárás kapcsán, azzal a feltétellel, hogy az a találmány szerinti enzimreakció révén előnyösen le is hasítható.

Az (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin kiindulási vegyület, illetve annak a katekolos hidroxilcsoportjain védett származéka két aszimmetriás szénatomot tartalmaz, ennélfogva a molekula 2-2 treo-izomer és eritro-izomer alakjában létezik. Akár a treo-izomert, akár az eritro-izomert, akár az elegyüket fel lehet használni kiindulási szubsztrátként a jelen találmány szerinti eljárás során.

Az (I) általános képletű kiindulási DL-szerin-vegyület, amely a találmány szerinti eljárásban szereplő enzimreakció dezacilezési reakció szubsztrátjaként szolgál, résztvehet a reakcióban úgy is, hogy a benzolgyűrű 3- és 4-helyzetű katekolos hidroxilcsoportjai védettek, és úgy is, hogy e hidroxilcsoportok nincsenek védve — attól függően, hogy mi a rendeltetés a találmány szerinti eljárással előállított dezacilezett terméknek. Így például, ami-

kor az a cél, hogy egy optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint állítsunk elő, az (I) képletű, szubsztrátként alkalmazott szerinvegyület katekolos hidroxilcsoportjai szabadok lehetnek. Másfelől, ha végül is egy optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-N-metil-szerin előállításra a cél, egy utólagos N-metilézés révén, akkor a találmányi eljárásban szereplő enzimátikus reakciót célszerűen úgy kell lejátsszatni, hogy a kiindulási, (I) általános képletű DL-szerinvegyület katekolos hidroxilcsoportjain védett származéka alakjában legyen jelen, mert a szerin-származék katekolos hidroxilcsoportjain védelemben kell részesülniük a rákövetkező N-metilézési reakció lépés miatt. Ha a találmány szerinti eljárás kivitelezésénél a katekolos hidroxilcsoportjain védett N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékot használunk, akkor természetesen könnyűszerrel megkaphatjuk az optikailag aktív 3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint a hidroxilvédőcsoportoknak a dezacilezett termékről történő, hagyományos védőcsoport-eltávolítási eljárást alkalmazó eltávolítása útján, az enzimreakció végrehajtását követően.

Az (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyület katekolos, 3- és 4-helyzetű hidroxilcsoportjainak védelmére szolgáló  $R^1$ ,  $R^2$  hidroxil-védőcsoportok lehetnek:

fenil-(1-4 szénatomos) alkil-, naftil-(1-4 szénatomos) alkil-csoport vagy  $R^1$  és  $R^2$  együttesen (1-4 szénatomos) alkilén láncot képez.

A találmány szerinti eljárásban szereplő enzimreakciót, amelynek folyamán az (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyületeket a mikroorganizmus, vagy a mikroorganizmusból származó aciláz enzim segítségével dezacilezzük, célszerűen pH 5 és 9 között, előnyösen 5 és 6 közötti pH-értéken, 20° és 80°C közötti hőmérsékleten, előnyösen 35° és 60°C közé eső hőmérsékleten végezzük. A reakcióközeg lehet víz, amely nem tartalmaz, vagy kívánt esetben tartalmaz megfelelő arányban egy olyan szerves oldószert, amely nem inaktiválja az enzimet, így például valamilyen kisszénatomszámú alkoholt, például etanolt. Kívánt esetben, vagy ha ez előnnyel jár, az enzimreakciót végezhetjük valamilyen fémkation, így például katalizátorként hozzáadott kobalt jelenlétében. A szükséges reakcióidő a felhasznált enzim mennyisége és aktivitása függvényében változhat; befolyással lehet rá a reakcióhőmérséklet és különböző más tényezők, de a reakcióidő normális esetben 30 perc és 20 óra között van. Egy 2 óra és 18 óra közé eső időtartam a legtöbb esetben elegendő a reakció lefolyásához.

Az enzimátikus reakciót követően hajthatjuk végre a keletkezett L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, illetve (II) általános képletű katekolos hidroxilcsoportjain védett származékának a (III) általános képletű N-acil-D-

-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerintől, illetve katekolos hidroxilcsoportjain védett származékától való elválasztását. Ez utóbbi vegyület ugyanis, miután nem vesz részt az enzimkatalizálta dezacilezésben, változatlanul viszsamarad a reakció lezajlása után. Az elkülönített lecsapás segítségével végezhetjük, felhasználva azt a körülményt, hogy az N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyületek általában kevésbé oldhatók vizes közegben, mint az L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyületek, a savas pH-tartományban. Más megoldásként a (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyület és a (III) képletű N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerinvegyület elkülönítését egy „fázisátvitel-kioldási” módszer alkalmazásával érhetjük el, amint azt a későbbiekben a 2. példában bemutatjuk. Az eljárás kivitele a következő: az enzim reakció reakcióelegyét n-butanollal extraháljuk; e művelet eredményeképpen egy olyan n-butanolos oldatot kapunk, amelyben mind a (II) általános képletű L-vegyület, mind a (III) általános képletű D-vegyület oldott állapotban van jelen. Az n-butanolt az oldatból elpárologtatjuk, a kapott maradékot 0,05 M pH=7,0 foszfátpufferben felvesszük, az így kapott oldatot, amely mind a (II), mind a (III) általános képletű vegyületet tartalmazza, sósavval megsavanyítjuk, majd etil-acetáttal extraháljuk a megsavanyított oldatot, miáltal főleg a (III) általános képletű vegyület oldódik át az etil-acetátba. Az etil-acetátos fázist ezután lúgos kémhatású (pH=9) vizes oldattal rázzuk ki, hogy a (III) általános képletű vegyületet ezáltal a vizes fázisba vigyük át, mely utóbbit savas (pH=1) körülmények között ismételtelen etil-acetáttal rázzuk ki, és így tovább.

A találmány szerinti eljárással kapott (II) és (III) általános képletű végtermékeket azután külön-külön izolálhatjuk és a szokásos kromatográfiai módszerrel tisztíthatjuk. A kromatográfiai tisztítási eljárás például szilikagél töltetű oszlopon történő kromatografálást vagy ioncserélő gyantán végzett kromatografálást jelent. Arra is lehetőség van, hogy a végtermékek izolálását és tisztítását egy nagyon egyszerű módon végezzük, például úgy, hogy — a (II) és (III) általános képletű termékek oldékonyságának különbségét kihasználva — a lecsapásos vagy a kristályosítási eljárást alkalmazzuk.

A következőkben találmányunkat példákkal illusztráljuk, anélkül azonban, hogy találmányunkat bármilyen tekintetben e példákra korlátoznánk.

#### 1. példa

(a) A mikroorganizmus tenyésztéshez alkalmazott tápközeg a következő anyagokat tartalmazta: 1% burgonyakeményítő, 1% glükóz, 0,75% húskivonat, 0,75% polipepton, 0,3% nátrium-klorid, 0,1% magnézium-szulfát-heptahidrát, 0,0007% réz(II)-szulfát-pentahidrát, 0,0001% vas(II)-szulfát-heptahid-

rát, 0,0008% mangán(II)-klorid-tetrahidrát és 0,0002% cink-szulfát-heptahidrát. A tápközeget 100 ml-es részletekben 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba töltöttük, majd a tápközeget a *Streptomyces hachijoensis* (IMC S-0244) (ISP 5114) (FERM P-7218) (FERM BP 642) ferde tenyészetének egy oltókacsnyi mennyiségével beoltottuk. Az inkubációt 27°C hőmérsékleten, rázatás mellett, 3 napon keresztül végeztük egy törzstenyészet előállítására céljából. A törzstenyészet 10-10 ml-ét a fent leírttal azonos összetételű tápközegbe oltottuk, amelyet 1-1 literes részletekben 5 l-es Erlenmeyer-lombikokba adagoltunk. Az inkubációt 27°C-on rázatás mellett 4 napon keresztül folytattuk. Az így nyert tenyészoldatot megszürtük a mikrobacejtek eltávolítása végett, és a kapott (3 liter) szűrlethez kis részletekben, keverés közben ammónium-szulfátot adagoltunk a 80%-os telítettség eléréséig. Az elegyet ezután 5°C hőmérsékletű hidegszobában éjszakán át állni hagytuk, majd 9000 fordulat/perc fordulat-szám és 5°C hőmérséklet fenntartása mellett lecentrifugáltuk. A kivált enzimetartalmú csapadékot összegyűjtöttük és 150 ml 0,05 M foszfátpufferben feloldottuk. Ily módon egy nyers acilázenzim-oldatot kaptunk.

(b) 1 g DL-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerinhez 60 ml vizet adtunk, és az így kapott vizes szuszpenzióhoz cseppenként 30%-os vizes nátrium-hidroxid-oldatot adagoltunk mindaddig, amíg a DL-szerin-vegyület feloldódása következtében viz tiszta oldatot nem kaptunk. Ehhez az oldathoz 20 ml 0,5 M 7,0 pH-jú foszfátpuffert öntöttünk, majd annyi vizet adtunk, amennyi az oldat térfogatát 90 ml-re egészítette ki. A szubsztrát szerin-vegyület ily módon előállított oldatát 10 ml fent leírt módon előállított enzimmoldattal kevertük össze, majd 37°C-on 18 órára inkubáltuk az enzimreakció lefolytatása céljából. A reakció lezajlása után a reakcióelegyet leszűrtük, a képződött csapadékot eltávolítottuk. Az így nyert szűrlet pH-ját sósav hozzáadásával 1-re állítottuk be, és az ennek nyomán kivált csapadékot szűrőre gyűjtöttük. Ily módon első nyeredékként 150 mg D-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint kaptunk. Az említett reakcióelegy szűrésekor kapott első csapadékot 0,1 n sósavoldatban melegítés közben feloldottuk. A kapott oldatot szobahőmérsékleten állni hagytuk, miáltal egy csapadék vált ki. E csapadékot a folyékony fázistól szűrővel elkülönítettük; ily módon 240 mg D-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerinhez jutottunk, második nyeredék formájában. Az első és második nyeredékként kapott termék egyaránt  $[\alpha]_D^{20} = -20,9^\circ$  fajlagos forgatóképességet mutatott (c=1, etanolban). A D-izomer második nyeredékének (240 mg) szűrővel történt elválasztása után visszamaradt szűrletet n-butanollal extraháltuk, az n-butanolos extraktumot csökkentett nyomáson desztillációnak vetettük alá az n-butanol eltávolítása céljából. A maradékot izo-

8

propanolból kikristályosítva 360 mg L-treo-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin-hidrokloridot kaptunk, amelynek fajlagos forgatóképessége  $[\alpha]_D^{20} = -5,99^\circ$  volt (c=1, etanolban).

(c) A fenti módon előállított D-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint 1:1 terfogatarányú metanol — 1n sósavoldat elegyében feloldottuk, és az oldatot 5 órán keresztül vízszafolyató hűtés mellett forraltuk az N-acetilcsoport eltávolítása céljából, hogy ezáltal D-treo-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint kaptunk. Ezalatt a fentebb leírt módon kapott L-treo-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin-hidrokloridot etanolban feloldottuk és katalitikus redukciónak (hidrogenolízis) vetettük alá az oldatot hidrogéngáz-atmoszférában,  $10^5$  Pa nyomáson, szobahőmérsékleten, 10%-os palládium/csontszén katalizátor jelenlétében. A hidrogenolitikus reakció — mint a katekolos hidroxilcsoportokat védő benzilcsoportok eltávolításának szokásos módja — kivitelezésével 100%-os hozammal kaptunk meg az L-treo-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint.

## 2. példa

(a) Az 1. példában leírttal megegyező összetételű tápközeget *Actinomyces aureoverticillatus* (IMC S-0243) (ISP 5080) (FERM P-7216) (FERM Bp-640) ferde tenyészetének egy oltókacsnyi mennyiségével beoltottuk, és a beoltott tápközeget 27°C hőmérsékleten 5 napon át inkubáltuk. Az így nyert tenyészoldatot a mikrobacejtek eltávolítása végett leszűrtük, és a kapott, az aciláz enzimet tartalmazó szűrlet 100 ml-éhez 108 mg DL-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint adtunk. Az elegyet 37°C-on 18 órán keresztül inkubáltuk az enzimreakció lejátszatása céljából.

(b) A reakció végeztével a reakcióelegy pH-ját 2-re állítottuk be sósav hozzáadásával, majd n-butanollal extraháltuk. Az n-butanolos extraktumot csökkentett nyomáson desztilláltuk az n-butanol eltávolítása érdekében, s a desztillálási maradékot 7,0 pH-jú 0,05 M foszfátpufferben vettük fel. Az így kapott oldat pH-ját vizes sósavoldattal újra 2-re állítottuk be, majd etil-acetáttal kiráztuk. A kapott szerves extraktumot, amely az etil-acetátba átoldódott D-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint tartalmazta, vízzel elegyítettük, és az elegy pH-ját 9-re állítottuk be vizes nátrium-hidroxid-oldat segítségével. Ekként a D-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin átoldódott a vizes fázisba. A vizes fázis pH-ját ezt követően sósavval pH=1-re állítottuk, és a megsavanyított vizes oldatot etil-acetáttal ismételtelen kiráztuk. Az így nyert etil-acetátos extraktumot csökkentett nyomáson desztilláltuk az etil-acetát eltávolítása végett. Ily módon 34 mg D-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint kaptunk.

$[\alpha]_D^{20} = -14,6^\circ$  (c=1, etanolban).

(c) A fenti (b) eljárás során kapott, fentemlített desztillálási maradék sósavval pH=2-re megsavanyított oldatának etil-acetátos extrakciója után visszamaradt vizes fázist



n-butanollal extraháltuk. Az így nyert n-butanolos extraktumot csökkentett nyomáson desztilláltuk az n-butanol eltávolítása céljából, és a desztillálási maradékot metanollal elegyítettük. Az elegyet leszűrtük az oldhatatlan anyagok eltávolítása céljából, a szűrletet a metanol eltávolítására csökkentett nyomáson desztillációnak vetettük alá. Az így kapott desztillálási maradék izopropanolból történő átkristályosítása 26 mg L-eritro-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin-hidrokloridot eredményezett.  $[\alpha]_D^{20} = +19,5^\circ$  (c=1, etanolban).

Ha ezt az L-eritro-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin-hidrokloridot az 1. (c) példában leírt módon katalitikus hidrogenolízisnek vetjük alá a hidroxilcsoportokat védő benzilcsoportok eltávolítása céljából, akkor L-eritro-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint kapunk 100%-os hozammal.

### 3. példa

DL-Treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint, DL-treo-N-klór-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint, DL-treo-N-glikolil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint, DL-treo-N-benzoil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint, DL-treo-N-acetil-3-(3,4-metilén-dioxi-fenil)-szerint, DL-treo-N-acetil-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerint, vagy DL-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint oldottunk, illetve szuszpendáltunk fel 2 mg/ml koncentrációban 7,0 pH-jú 0,1 M foszfátpufferben, hogy a kiindulási DL-szerin-vegyületekből, mint az enzimreakció szubsztrátjaiból különféle törzsolatokat készítsünk. A szubsztrát-törzsolatokat 0,5 ml-ét azonos térfogatú enzimoldattal elegyítettük, amelyet az 1. (a) példa eljárásának megfelelően állítottunk elő, s amely a *Streptomyces hachijoensis* mikroorganizmus aciláz enzimét tartalmazta. Az így kapott

A képződött dezacilezett  
termék mólszáma

Dezacilezett termék hozama %-ban = ----- x 2 x 100  
a szubsztrát mólszáma

### 4. példa

Az 1. példában megadott összetételű tápközegét *Actinomyces aureovercillatus* (IMC S-0234) (ISP 5080) (FERM P-7216) (FERM BP-640); *Streptomyces blastmyceticus* (IMC S-0189) (ISP 5029) (FERM P-7217) (FERM BP-641); vagy *Streptomyces hachijoensis* (IMC S-0244) (ISP 5114) (FERM P-7218) (FERM BP-642) ferde tenyészeteként egy-egy oltókacsnyi mennyiségével beoltottuk. Az inkubátumokat rázatás mellett 4 napig 27°C-on tartottuk. A kapott tenyészoldatból a mikrobacejteteket kiszűrtük, és az így nyert tenyészoldat-szűrlet 0,5 ml-ét, amely az aciláz enzimet tartalmazta, 0,5 ml szubsztrátoldattal elegyítettük. Ez utóbbi 2 mg/ml koncentrációban 0,1 M 7,0 pH-jú foszfátpufferben oldva tartalmazta a DL-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerint. Az enzim-

elegyet azután 37°C hőmérsékleten 17 óra időtartamra inkubáltuk az N-acilcsoport eltávolítását jelentő dezacilezési enzimreakció lejátszódásának biztosítására.

- 5 A reakció lejátszódása után a reakcióelegyet nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás módszerrel megelemeztek. A HPLC-oszlop töltetként „Nucleosil 5 C<sub>18</sub>”-t alkalmaztunk; az oszlop mérete 4,6 mm x 125 mm volt.
- 10 Az analízis célja a dezacilezett reakciótermék hozamának meghatározása volt, amely a sztereoszelektív enzimreakció folyamán, az N-acilcsoport hidrolitikus eltávolítása révén képződött. A kapott eredményeket az alábbi
- 15 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

	Szubsztrát	A dezacilezett termék hozama %-ban
20	DL-treo-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin	100
25	DL-treo-N-klór-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin	100
	DL-treo-N-glikolil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin	31
	DL-treo-N-benzoil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin	10
30	DL-treo-N-acetil-3-(3,4-metilén-dioxi-fenil)-szerin	68
	DL-treo-N-acetil-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin	20
35	DL-eritro-N-acetil-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin	81

40 A fenti táblázatban szereplő, a dezacilezett termék %-os hozamát kifejező számértékeket az alábbi egyenlet segítségével számítottuk ki:

- 50 -szubsztrát elegyet 37°C hőmérsékleten 17 órán keresztül inkubáltuk az enzimreakció előidézése és lejátszatása céljából.
- 55 A reakció befejeztével a reakcióelegyet 0,1 ml 1 N sósavoldat hozzáadásával megsavanyítottuk, majd n-butanol 1 ml-es részleteivel kétszer egymás után extraháltuk. Az egyesített n-butanolos extraktumokat csökkentett nyomáson desztilláltuk az n-butanol eltávolítása végett. A desztillálási maradékot 0,1 M foszforsav és metanol 40:60 térfogatarányú elegyében feloldottuk, és az így kapott oldatot nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás analízisnek vetettük alá ugyanazon „Nucleosil 5 C<sub>18</sub>” oszlop segítségével, mint amelyet a 3. példában alkalmaztunk. Ily módon meghatároztuk a képződött dezacilezett termék, az L-treo-3-(3,4-dibenzil-oxi-fenil)-szerin hozamát.
- 60
- 65

A kapott eredményeket az alábbi 2. táblázatban tüntettük fel.

2. táblázat

Törzs	Dezacilezett termék hozama %-ban
1	2
Actinomyces aureoverticillatus (ISP 5080) (FERM BP-640)	75

Dezacilezett termék hozama %-ban =

## 5. példa

A 4. példa eljárását követtük, de más mikroorganizmus törzseket használtunk. Az eredményeket az alábbi 3. táblázatban foglaltuk össze.

3. táblázat

Törzs	Dezacilezett termék hozama %-ban
Streptoverticillium hirosiense (ISP 5037) (FERM BP-643)	>30
Streptomyces toyocaensis (ISP 5030) (FERM BP-644)	>30
Actinomyces bicolor (ISP 5140)	>30
Streptomyces chartreusis (ISP 5085)	>30
Streptomyces flavopersicus (ISP 5093)	>30
Actinomyces flavotrichini (ISP 5152)	>30
Streptoverticillium griseocarneum (ISP 5004)	>30
Streptomyces halstedii (ISP 5068)	>30
Streptomyces tendae (ISP 5101)	>30

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- 1) Eljárás (II) általános képletű optikailag aktív L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin és származékok előállítására, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése hidrogénatom vagy fenil- (1-4 szénatomos) alkil-, naftil- (1-4 szénatomos) alkilcsoport vagy  $R^1$  és  $R^2$  együtt (1-4 szénatomos) alkilénecsoporthoz, továbbá optikailag aktív (III) általános képletű D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékok előállítására, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése a fenti, és  $R^3$  jelentése adott esetben halogénatommal vagy hidroxilcsoporttal helyettesített (1-4 szén-

10

2. táblázat folytatása

	1	2
5	Streptomyces blastmyceticus (ISP 5029) (FERM BP-641)	54
	Streptomyces hachijoensis (ISP 5114) (FERM BP-642)	92

- 10 A fenti táblázatban szereplő, a dezacilezett termék %-os hozamát kifejező számértékeket az alábbi egyenlet segítségével számítottuk ki:

A képződött dezacilezett termék mólszáma

----- x 2 x 100  
a szubsztrát mólszáma

atomos) alkilcsoport, vagy fenil- vagy naftilcsoport,

- 20 *azzal jellemezve*, hogy valamely (I) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin, amelynek képletében  $R^1$ ,  $R^2$  és  $R^3$  jelentése a tárgyi körben megadott, L-izomerjének aminocsoportjáról az N-acilcsoportot egy **Actinomyces aureoverticillatus**, **Actinomyces bicolor**, **Streptomyces blastmyceticus**, **Streptomyces chartreusis**, **Streptomyces flavopersicus**, **Actinomyces flavotrichini**, **Streptoverticillium griseocarneum**, **Streptomyces hachijoensis**, **Streptomyces halstedii**, **Streptoverticillium hirosiense**, **Streptomyces tendae**, **Streptomyces toyocaensis** fajba tartozó mikroorganizmusban lévő vagy mikroorganizmus által termelt aciláz enzimmel lehidrolizáljuk, majd egy keletkezett (II) általános képletű L-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-származékot, ahol a képletben  $R^1$  és  $R^2$  jelentése a tárgyi körben megadott, a dezacilezés után változatlanul visszamaradó (III) általános képletű N-acil-D-3-(3,4-dihidroxi-fenil)-szerin-vegyülettől, ahol a képletben  $R^1$ ,  $R^2$  és  $R^3$  jelentése a tárgyi körben megadott, elkülönítjük.
- 2) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű vegyületként olyan vegyületet alkalmazunk, amelynek képletében  $R^1$  és  $R^2$  jelentése benzilcsoport és  $R^3$  jelentése metil-, klór-metil-, hidroxil-metil- vagy fenilcsoport.
- 3) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű vegyületként olyan vegyületet alkalmazunk, amelynek képletében  $R^1$  és  $R^2$  együttes jelentése metilénecsoporthoz és  $R^3$  jelentése metil-, klór-metil-, hidroxil-metil- vagy fenilcsoport.
- 4) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy (I) általános képletű vegyületként olyan vegyületet alkalmazunk, amelynek képletében  $R^1$  és  $R^2$  jelentése hidrogénatom és  $R^3$  jelentése metil-, klór-metil-, hidroxil-metil- vagy fenilcsoport.
- 5) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy aciláz enzimet tartalmazó vagy aciláz enzimet termelő mikroorganizmusként **Actinomyces aureoverticillatus** (ISP 5080), **Actinomyces bicolor** (ISP 5140), **Streptomyces blastmyceticus** (ISP 5029), **Strepto-**

**myces chartreusis** (ISP 5085), **Streptomyces flavopersicus** (ISP 5093), **Actinomyces flavotricini** (ISP 5152), **Streptovercillium griseocarneum** (ISP 5004), **Streptomyces hachijoen-sis** (ISP 5114), **Streptomyces halstedii** (ISP 5068), **Streptovercillium hirosimense** (ISP 5037), **Streptomyces tendae** (ISP 5101), és **Streptomyces toyocaensis** (ISP 5030) törzs-be tartozó mikroorganizmust alkalmazunk.

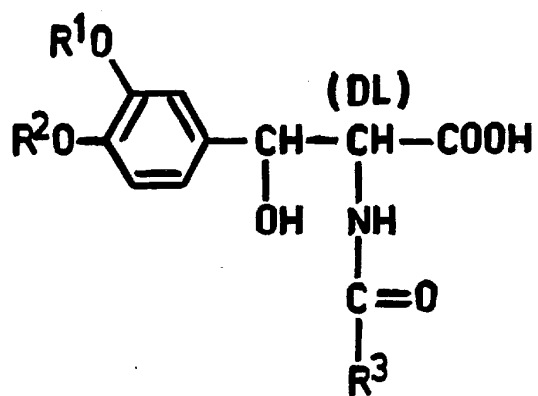
6) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy mikroorganizmusként **Actino-myces aureovercillatust** (ISP 5080) (FERM

BP-640), **Streptomyces blastmyceticust** (ISP 5029) (FERM Bp-641), **Streptomyces hachijo-ensist** (ISP 5037) (FERM Bp-643), **Strepto-myces hirosimenset** (ISP 5037) (FERM Bp-643), vagy **Streptomyces toyocaensist** (ISP 5030) (FERM Bp-644) alkalmazunk.

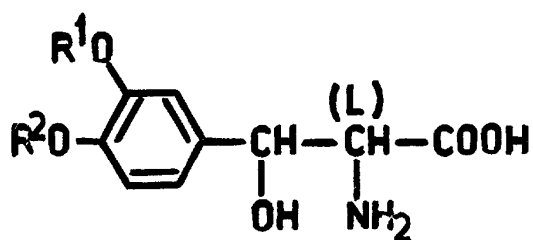
7) Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az (1) általános képletű N-acil-DL-3-(3,4-dihidroxifenil)-szerin-vegyü-letet és a mikroorganizmust, illetve az aciláz enzimet tartalmazó mikroorganizmus kivona-tot 30—80°C hőmérsékleten, pH 5—9 értéken, 30 perc — 18 órán át reagáltatjuk.

1 lap rajz képletekkel

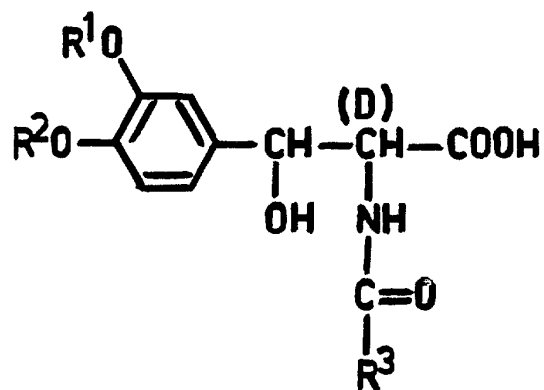
Int.Cl. C 12 P 13/04, C 12 N 9/78



(I)



(II)



(III)



Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest  
 A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 4247. Nyomdaipari vállalat, Uzsgorod