

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 157889 B

(21) Patentansøgning nr.: 3921/81

(51) Int.Cl.⁵ C 12 P 21/02

(22) Indleveringsdag: 04 sep 1981

(41) Alm. tilgængelig: 05 mar 1983

(44) Fremlagt: 26 feb 1990

(86) International ansøgning 'nr.: -

(30) Prioritet: -

(71) Ansøger: *G.D. SEARLE & CO.; P.O. Box 1045; Skokie; Illinois 60076, US

(72) Opfinder: Arthur A. *Davino; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Fremgangsmåde til esterificering af alfa-L-aspartyl-L-phenylalanin

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3921-81

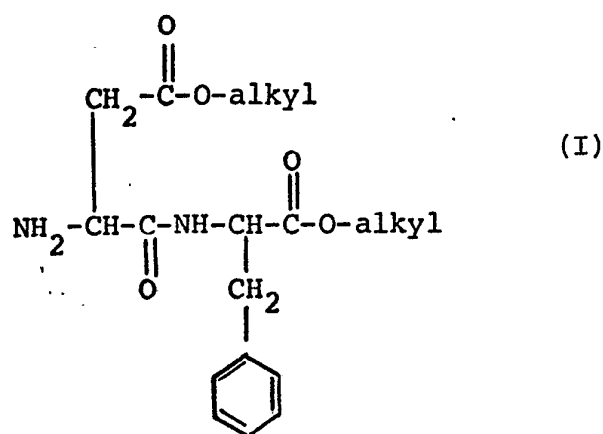
Selektiv esterificering af α -L-aspartyl-L-phenylalanin til monokylestere deraf ved en fremgangsmåde, ved hvilken α -L-aspartyl-L-phenylalanin bringes i kontakt med en alkohol, især methanol, i nærværelse af et proteolytisk enzym med specifik esteraseaktivitet, især en alkalisk serinesterase, specielt subtilisin Carlsberg, i et vandigt alkoholmedium ved en pH-værdi på 4-7, idet alkoholkoncentrationen er tilstrækkelig til at reversere proteasens hydrolytiske aktivitet, og fortrinsvis er 30-70%, især ca. 60%.

Fremgangsmåden udmærker sig ved sin selektivitet, idet enzymerne specifikt esterificerer phenylalanincarboxylgruppen. De fremstillede estere er kendte sødemidler.

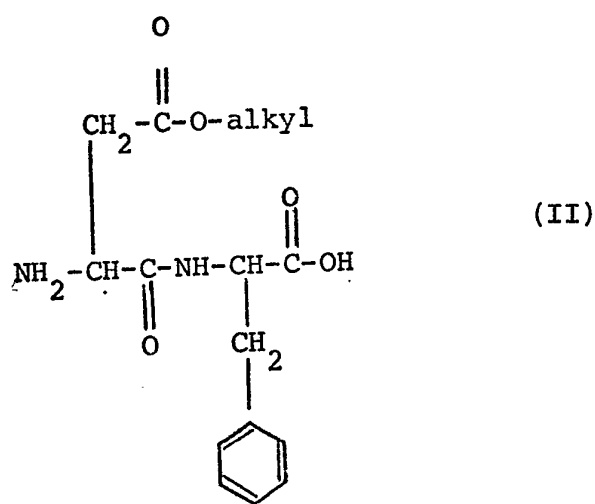
DK 157889 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til selektiv esterificering af α -L-aspartyl-L-phenylalanin til de tilsvarende alkylestere esterificeret i L-phenylalanin-gruppen.

Esterificeringen af α -L-aspartyl-L-phenylalanin ad kemisk vej er beskrevet i US-patentskrifter nr. 3.933.781 og 4.173.562. En ulempe ved kemiske metoder er, at der sker esterificering ved både aspartylcarboxylgruppen og ved phenylalanincarboxylgruppen, således at der dannes uønskelige bi-produkter med formel I



(i det efterfølgende betegnet diesteren) og med formel II



(i det efterfølgende betegnet aspartylesteren).

0

Diesteren og aspartylesteren skal fjernes ved rensnings-
trin til opnåelse af det ønskede produkt.

Tidligere enzymatiske esterificeringsmetoder har været
rettet mod esterificeringen af enkelte aminosyrer. De har ikke
5 angået de selektive esterificeringsproblemer, som forekommer
ved dipeptider, især α -L-aspartyl-L-phenylalanin, som har
mere end en carboxylgruppe.

F.eks. har Ingalls, et al., BIOTECHNOLOGY AND BIOENGI-
NEERING 17, 1627-1637 (1975), beskrevet esterificeringen
10 af en enkelt aminosyre, N-acetyltyrosin, under anvendelse
af ubevægeliggjort chymotrypsin eller subtilisin Carlsberg i
den frie, umodificerede form i et opløsningsmiddelsystem af
vand, ethanol og glycerol. En ulempe ved denne metode var, at
der dannedes væsentlige mængder af glycerolesteren af aminosy-
15 ren.

Klibanov, et al., BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 19,
1351-1361 (1977), beskriver esterificeringen af en enkelt
aminosyre, N-acetyltryptophan, under anvendelse af ubevægelig-
gjort chymotrypsin i et tofasesystem af vand og et med vand
20 ikke-blandbart opløsningsmiddel, chloroform.

Det har nu overraskende vist sig, at carboxylgruppen
i phenylalanindelen i α -L-aspartyl-L-phenylalanin kan al-
kyleres selektivt ved enzymatisk esterificering i et enfa-
sesystem til opnåelse af α -L-aspartyl-L-phenylalanin-al-
25 kylester uden at frembringe den uønskelige diester og
aspartylester. Dette opnås ifølge opfindelsen ved en frem-
gangsmåde, som er ejendommelig ved, at eventuelt N-beskyt-
tet α -L-aspartyl-L-phenylalanin bringes i kontakt med en
alkohol i nærværelse af en effektiv mængde af en alkalisk
30 serinproteinase, en esterase, som foretrækker aromatiske
aminosyrer, i et vandigt alkoholmedium ved en pH-værdi på
4-7, hvori alkoholkoncentrationen er mindst 10%, hvorpå en
eventuelt tilstedeværende N-beskyttelsesgruppe fjernes.

En alkalisk serinproteinase er et proteolytisk
35 enzym, som har specifik esteraseaktivitet i et vand-al-
kohol-opløsningsmiddelsystem, hvori alkoholkoncentratio-
nen er tilstrækkelig til at reversere enzymets hydrolytiske

0

virkning. Specifik esteraseaktivitet refererer til det proteolytiske enzyms evne til selektiv alkylering af carboxylgruppen i phenylalanindelen. De således fremstillede α -L-aspartyl-L-phenylalanin-alkylestere er værdifulde som sødemidler. Denne anvendelighed er beskrevet i US-patentskrift nr. 3 492 131.

5

Foretrukne alkoholer er repræsenteret af formlen



10

hvor R betyder alkyl med 1-7 carbonatomer. Disse alkylgrupper eksemplificeres af methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl og isomerene deraf med forgrenet kæde.

15

Aminogruppen i α -L-aspartyl-L-phenylalanin kan beskyttes af de almindeligvis anvendte beskyttelsesgrupper.

20

Sådanne grupper omfatter aryl-lavere alkyl-grupper, såsom diphenylmethyl- eller triphenylmethylgrupper, som eventuelt kan være substitueret med halogen, nitro, lavere alkyl eller lavere alkoxy, f.eks. benzhydryl, trityl og di-p-methoxybenzhydryl, acylgrupper, såsom formyl, trifluoracetyl, phthaloyl, benzensulphenyl og o-nitrophenylsulphenyl, grupper afledt ud fra carbonsyre eller thiocarbonsyre, såsom carbobenzoxycygrupper, som eventuelt er substitueret i den aromatiske del med halogenatomer, nitrogrupper, eller lavere alkyl-, lavere alkoxy- eller lavere carboalkoxygrupper,

25

f.eks. carbobenzoxy, p-bromcarbobenzoxy eller p-chlorcarbobenzoxy, p-nitrocarbobenzoxy og p-methoxycarbobenzoxy, farvede benzyloxycarbonylgrupper, såsom p-phenylazobenzyloxycarbonyl og p-(p-methoxyphenylazo)-benzyloxycarbonyl, tolyloxycarbonyl, 2-phenyl-2-propoxycarbonyl, 2-tolyl-2-propoxycarbonyl og 2-(p-biphenyl)-2-propoxycarbonyl, og aliphatiske oxy-carbonylgrupper, såsom t-butoxycarbonyl, alkyloxycarbonyl, cyclopentyloxycarbonyl og t-amylloxycarbonyl. En især foretrukket N-beskyttelsesgruppe til anvendelse ifølge opfindelsen er carbobenzoxycygruppen.

35

0

Aminogruupperne kan også beskyttes ved dannelse af enaminer, opnået ved omsætning af aminogruppen med 1,3-diketoner, f.eks. benzoylacetone eller acetylacetone.

5 Beskyttelsesgrupper fjernes bekvemt ved sådanne reaktioner som hydrogenolyse (f.eks. i nærværelse af en palladium-sortkatalysator), behandling med en hydrogenhalogenidsyre (såsom hydrogenbromidsyre, hydrogenfluoridsyre eller saltsyre) i eddikesyre eller behandling med trifluoreddikesyre.

10 Den omsætning, ved hvilken esterbindingen dannes, kan gennemføres i en vandig puffer-alkohol-opløsning med en pH-værdi på 4-7. Typiske pufferopløsninger omfatter natriumpyrophosphatpufferopløsning, citronsyrepufferopløsning, eddikesyre-pufferopløsning eller tris-HCl-pufferopløsning.

15 Den esterase, som anvendes ifølge opfindelsen, er en alkalisk serinproteinase. Disse enzymer udviser høj esterase-aktivitet og virker selektivt på aromatiske aminosyrer. Typiske alkaliske serinproteinaser omfatter subtilisin og alkaliske proteinaser fra forskellige stammer af Bacillus, Aspergillus, Streptomyces, Penicillium og Arthrobacter. En foretrukket alkalisk serinproteinase er subtilisin Carlsberg, 20 som er kommerciel tilgængelig. En katalytisk mængde enzym anvendes ved reaktionen, fortrinsvis 10-500 mg pr. 1 mmol α -L-aspartyl-L-phenylalanin eller N-beskyttet α -L-aspartyl-L-phenylalanin. Et calciumsalt kan også tilsættes for at fremme enzymaktiviteten. 25

Enzymet kan være til stede i fri tilstand eller kan være ubevægeliggjort ved binding til en egnet bærer, såsom porøst glas, polyacrylamidgel, carboxymethylcellulose eller aminoethylcellulose. "IMMOBILIZED ENZYMES", bind 44, METHODS 30 IN ENZYMOLOGY, udgiver Klaus Mosback, diskuterer forskellige metoder til at gøre enzymer ubevægelige.

Den anvendte reaktionstemperatur er sædvanligvis i området 10-50°C, hvilket er tilstrækkeligt til opretholdelse af enzymaktiviteten. Et foretrukket interval er 20-40°C.

35

0

Reaktionen gennemføres i et medium af vand og alkohol, hvori alkoholkoncentrationen er tilstrækkelig til at reverse-
re enzymets esteraseaktivitet. Alkoholkoncentrationen kan
være 10-90% efter rumfang. En foretrukket alkoholkoncentra-
tion er 30-70% efter rumfang. En især foretrukket alkohol-
5 koncentration er 50-60% med 60% alkohol efter rumfang som
det optimale.

Ved en især foretrukket udførelsesform for opfindelsen
er den alkaliske serinproteinase subtilisin Carlsberg, en
10 proteinase med specifik esteraseaktivitet, og alkoholen er
methanol, som er til stede i en koncentration på 60% efter
rumfang. Vand-alkohol-blandingen indeholder 5,0 mmol calcium-
chlorid og har en pH-værdi på 5,0, og reaktionen gennemføres
ved en temperatur på 25°C.

15 Omsætningen skrider jævnt fremad under disse betingelser,
indtil den er afsluttet. En foretrukket reaktionstid er 1-260
timer. En især foretrukket reaktionstid er 1-90 timer. Reak-
tionsproduktet skilles hensigtsmæssigt fra reaktionssystemet
ved standardchromatografiteknik eller andre metoder, som er
20 kendte.

Opfindelsen er yderligere illustreret i de eksempler,
som følger. I eksemplerne er mængderne af materialer an-
givet i vægtdele, medmindre andet er angivet. Forholdet
mellem vægtdele og rumfangsdele er det samme som mellem
25 gram og milliliter.

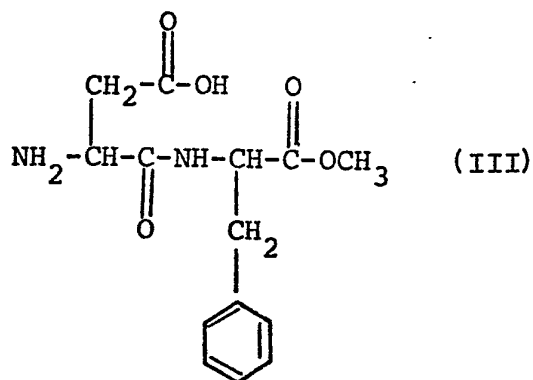
Eksempel 1

Subtilisin Carlsberg (Protease Type VIII, Sigma Chemical
Co.) opløses i destilleret vand i en koncentration på 40 mg/ml
30 og dialyseres imod destilleret vand ved 5°C. 0,1 rumfangsdele
af enzymopløsningen blandes med 0,9 rumfangsdele af en vandig
methanolopløsning indeholdende 0,0056 vægtdele α -L-aspartyl-
-L-phenylalanin. Den vandige methanolopløsning fremstilles
ved blanding af 0,6 rumfangsdele methanol med 0,075 rumfangs-
35 dele 0,33 M natriumacetat, 0,225 rumfangsdele 0,33 M eddike-
syre og 0,002 rumfangsdele 2,5 M calciumchlorid. Før til-
sætning af enzymet lydbehandles den vandige methanolopløsning

0

i 1 minut til dispergering af α -L-aspartyl-L-phenylalaninet. Den samlede pH-værdi indstilles på en pH-værdi på 5,0 med fortyndet saltsyre. Den færdige reaktionsblanding indeholdende 4 mg/ml enzym; 5,0 mmol calciumchlorid, 0,1 M eddikesyrepufer, 60% methanol og 0,02 M α -L-aspartyl-L-phenylalanin får lov at reagere ved ca. 25°C under kontinuerlig omrøring i et tidsrum på 4 døgn. Reaktionsblandingen ledes gennem en kolonne af "Sephadex LH-20" for at skille enzymet fra dipeptidet. Dipeptidfraktionerne slås sammen og behandles med hydrohalogenid ifølge US-patentskrifterne nr. 3.798.207 og 4.173.562 til udfældning og rensning af α -L-aspartyl-L-phenylalanin-methylesteren med formel III

15



20

Eksempel 2

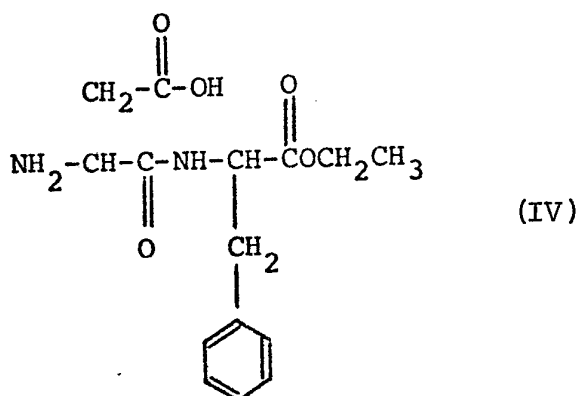
Frengangsmaiden ifølge eksempel 1 gentages, bortset fra at der som katalysator anvendes ubevægeliggjort enzym. Enzymet er gjort kovalent ubevægeligt til DEAE-cellulose, som er aktiveret med cyanogenbromid. DEAE-cellulosen (præ-kvældet DE52, Whatman) aktiveres ved, at 0,075 vægtdele vaskes med 0,1 M natriumbicarbonat og derefter omsættes med 3 rumfangsdele cyanogenbromidopløsning (25 mg/ml). pH-Værdien indstilles og holdes på 11,0 med 2 M natriumhydroxid, og der omrøres svagt i 6 minutter ved 25°C. Gelen frafiltreres og vaskes med 100 rumfangsdele 0,1 M natriumbicarbonat. 0,025 Vægtdele subtilisin Carlsberg, opløst i 0,25 rumfangsdele 0,1 M natriumbicarbonat og dialyseret i 4 timer imod samme puffer ved 5°C, blandes med cyanogenbromidaktiveret gel i et lukket polypro-

35

pylenrør (under argon) ved 5°C i 17 timer. Derefter vaskes det bundne enzym med destilleret vand og omsættes med 5 rumfangsdele 1 M ethanolamin (pH-værdi 9,0) under svag omrøring i 2 timer ved 25°C. Gelen vaskes to gange med destilleret vand og suspenderes igen i 0,3 rumfangsdele destilleret vand. Denne suspension af ubevægeliggjort enzym blandes med 0,7 rumfangsdele af en vand-methanol-blanding, således at den færdige reaktionsblanding indeholder samme koncentration af materialer som i eksempel 1. Reaktionen gennemføres som i eksempel 1, bortset fra at det ubevægeliggjorte enzym fjernes ved centrifugering forud for rensningen af produktet.

Eksempel 3

Anvendelse af en ækvivalent mængde ethanol i stedet for methanolet i eksempel 1 og 2 og i det væsentlige eftergørelse af de deri skitserede metoder giver α-L-aspartyl-L-phenylalanin-ethylester med formel IV



Eksempel 4

Anvendelse af 0,0125 vægtdele N-carbobenzoxy-α-L-aspartyl-L-phenylalanin i stedet for α-L-aspartyl-L-phenylalaninet i eksempel 1 og 2 og i det væsentlige gentagelse af de deri detaljeret beskrevne metoder giver N-carbobenzoxy-α-L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester. Reduktion af denne forbindelse ved den af M. Bergmann og L. Zervas, Ber. 65, 1192 (1932), beskrevne metode fjerner den N-beskyttende carbobenzoxygruppe til dannelse af α-L-aspartyl-L-phenylalanin-methylester.

0

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til esterificering af α -L-aspartyl-
-L-phenylalanin til de tilsvarende alkylestere esterifi-
ceret i L-phenylalaningruppen, k e n d e t e g n e t ved,
5 at eventuelt N-beskyttet α -L-aspartyl-L-phenylalanin
bringes i kontakt med en alkohol i nærværelse af en ef-
fektiv mængde af en alkalisk serinproteinase i et vandigt
alkoholmedium ved en pH-værdi på 4-7, hvori alkoholkon-
centrationen er mindst 10%, hvorpå en eventuelt tilste-
10 deværende N-beskyttelsesgruppe fjernes.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
n e t ved, at den alkaliske serinproteinase er subtilisin
Carlsberg.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g-
15 n e t ved, at alkoholen er methanol i en koncentration
på 10-90%, fortrinsvis 60%.

20

25

30

35