

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

212 925 B

(21) A bejelentés ügyszáma: 1854/91
(22) A bejelentés napja: 1991. 06. 03.
(30) Elsőbbségi adatok:
532 845 1990. 06. 04. US

(51) Int. Cl.⁶
C 12 P 13/04

(40) A közzététel napja: 1993. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1996. 12. 30.

(72) Feltaláló:

Miller, Marvin Joseph, South Bend, Indiana (US)

(73) Szabadalmas:

University of Notre Dame du Lac (Notre Dame
University), South Bend, Indiana (US)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

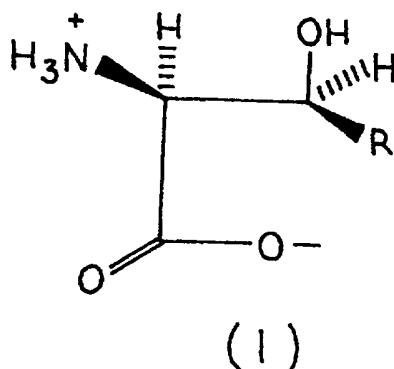
(54)

Eljárás béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás (I) általános képletű béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására – a képletben R jelentése 2–6 szénatomos alkenil- vagy alkinilcsoport vagy észterezett karboxil-, 1–4 szénatomos alkoxycsoporttal, ciano-, hidroxi-, 1–4 szénatomos alkanoil-oxi-, fenil- vagy furilcsoporttal helyettesített alkilcsoport.

A találmány szerinti eljárás során 30 °C és 55 °C közötti hőmérsékleten vizes oldatban 5,5 és 9,0 közötti pH-értéken egy RCHO általános képletű aldehidet – amelyben R jelentése a fenti – és glicint piridoxál-5'-foszfát jelenlétében szerin-hidroxi-metil-transzferázzal reagáltatnak. A béta-hidroxi-alfa-aminosavat számos esetben L-eritro-diasztereomer alakban kapják.



A találmány tárgya eljárás béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására. Közelebbről egy enzimikus eljárásra vonatkozik, amely béta-hidroxi-alfa aminosavaknak lényegében az L-eritro-alakban való előállítására irányul.

A béta-hidroxi-alfa-aminosavak számos területen használhatók fel, ideértve köztiterméként való alkalmazásukat a béta-laktám antibiotikumok előállítása területén; l. pl. a következő irodalmi helyeket: P. G. Mattingly et al., J. Org. Chem. 1981, 46, 1557 és M. J. Miller et al., J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7026.

Számos kémiai eljárás ismert béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására, ezek többsége azonban egy vagy több hátránnyal jár. Ezek közé tartozik az általánosság hiánya, a sztereokémiai viszonyok befolyásolásának nehézségei, királis segédanyagok szükségessége, valamint az a körülmény, hogy primer módon a treo (vagy szin-) – izomerek keletkeznek.

Az enzimikus eljárások bizonyos szempontból előnyökkel rendelkeznek a kémiai eljárásokkal szemben. Ilyen pl. az, hogy vizes közegben hajthatók végre, enyhe körülmények között és gyakran sztereoselektívek. A találmány szerinti eljárásban alkalmazott enzim általában aldolázként ismert. Egy ilyen aldoláz a szerin-hidroxi-metil-transzferáz (SHMT) (L. Schirch: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1982, 53, 83 és L. Schirch et al.: J. Biol. Chem. 1968, 243, 5651).

Az aldolázok biológiai szerepe a természetben az, hogy 1 szénatomos egységeket vigyenek rá a szerinre vagy hasítsanak le abból és elvégezzék a béta-hidroxi-alfa-aminosavak retroaldol-hasítását (amilyen pl. a treonin és az allo-treonin) egy aldehid és glicin keletkezésével.

Az aldolázok mindenütt előfordulnak a növényekben, baktériumokban és állatokban (pl. kukoricamagocokban, csírázó babban és nyúl májban). A találmány szerinti eljárás során SHMT-t használunk fel béta-hidroxi-alfa-aminosavak – a béta-laktám antibiotikumok prekursorai – enyhe körülmények között való előállítására. Az eljárás segítségével a béta-hidroxi-aminosav számos esetben az L-eritro-izomer alakjában képződik. Ez a prekursor keresett alakja, amely a béta-laktám antibiotikumok megfelelő diasztereomer alakjait szolgáltatja.

A GB 2 130 216 számú szabadalmi leírás glicinből és formaldehidből SHMT jelenlétében L-szerin előállítását ismerteti. Ez olyan (I) általános képletű vegyületnek felel meg, ahol R hidrogénatom. A JP 01 104 185 számú szabadalmi leírás glicinből és benzaldehidből SHMT-vel béta-fenil-szerin előállítására vonatkozik, ez az R helyén fenilcsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületnek felel meg.

A találmány tárgya enzimikus eljárás (I) általános képletű béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására, ahol R jelentése 2–6 szénatomos alkenil-, 2–6 szénatomos alkinilcsoport vagy észterezett karboxil-, 1–4 szénatomos alkoxycsoporttal, ciano-, hidroxi-, 1–4 szénatomos alkanol-oxi-, fenil- vagy furilcsoporttal helyettesített 1–6 szénatomos alkilcsoport, amely abból áll, hogy vizes közegben körülbelül 5,5 és körülbelül 9,0 közötti pH-értéken és körülbelül 30 °C

és körülbelül 55 °C közötti hőmérsékleten glicint és egy alifás aldehidet vagy egy gyűrűs aldehidet (például 2-furfurilt) szerin-hidroxi-metil-transzferázzal (SHMT) inkubálunk. Így például a borostyánkősav-félaldehid egy észterét az eljárás során béta-hidroxi-alfa-adipinsav-monoészterre alakítjuk át.

Közelebbről a találmány szerinti, az (I) általános képletű béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására irányuló eljárás abból áll, hogy vizes közegben körülbelül 7,0 és körülbelül 8,0 közötti pH-értéken glicint és egy RCHO általános képletű aldehidet reagáltatunk szerin-hidroxi-metil-transzferáz és piridoxál-5'-foszfát jelenlétében, körülbelül 30 °C és körülbelül 55 °C közötti hőmérsékleten. Az eljárást előnyösen 37 °C-on hajtjuk végre.

A glicin és az RCHO általános képletű aldehid relatív arányai azonban változtathatók. Úgy tűnik, hogy magasabb termék-kitermelések érhetők el, ha ekvimoláris mennyiségeket használunk. A használt enzimmennyiség függ attól, hogy az enzimet milyen mértékben tisztították meg, és hogy a jelenlévő szennyezések milyen vonatkozásban befolyásolhatják az enzimaktivitást.

A reakcióelegy pH-ját a legtöbb szubsztrát esetében kb. 5,5 és kb. 9 közötti értékre állítjuk be, puffer segítségével. Többnyire 7,0 és kb. 8,0 között pH-értéken dolgozunk. A keresett pH-tartomány előállítására alkalmasak például a foszfát-pufferek. Mint más enzimreakciók esetében is, kofaktorok befolyásolhatják az enzim szubsztrát-specifitását, valamint az enzim hatékonyságát, egy adott szubsztrát reakciójának katalízisében. A szerin-hidroxi-metil-transzferáz esetében az eljárásban lényeges szerepet játszó kofaktor a piridoxál-5'-foszfát. A PLP-n kívül más kofaktorok is alkalmazhatók és ezek kedvezően befolyásolhatják az egyes szubsztrátok esetében előállított termék kitermelését. A tetrahydrofolsav például növeli az enzimek a piroszőlősav-aldehid átalakítására irányuló aktivitását. A nátrium-metavanadát ugyancsak kofaktorként szolgál ugyanennek az aldehidnek az átalakítására.

(I) általános képlet az eljárással előállítható béta-hidroxi-alfa-aminosavakat belső só alakban mutatja be. Az eljárás pH-ján ez a só-alak várható, más körülmények között viszont létezik az (Ia) általános képlet által leírt nemionos alak is.

Az eljárásban alkalmazott RCHO általános képletű aldehid egyenes vagy elágazó láncú szubsztituált alkil-, alkenil- vagy alkinil-aldehid vagy heterociklusos aldehid lehet. Az alkilcsoport helyettesítői például a következő csoportok lehetnek:

- alkoxi-, például metoxi- vagy etoxycsoport,
- észterezett karboxilcsoport, például az 1–4 szénatomos alkilészterek,
- ciano-, hidroxycsoport,
- acilezett hidroxycsoport, például formil-oxi-, acetoxi-, propionoxi- vagy butanol-oxi-csoport,
- vagy alifás aldehidek oxocsoportokat tartalmazhatnak, például az RCHO általános képletű vegyület lehet egy keto-aldehid, például 4-oxo-pentanal, piroszőlősav-aldehid, stb.

Az eljárásban alkalmazható RCHO általános képletű alkil-aldehidekre a következő konkrét példákat említjük meg: borostyánkősav-félaldehid-metil-észter, bo-

rostyánkősav-félaldehyd-benzil-észter, 4-hidroxi-valeraldehyd, glutársav-félaldehyd-metil-észter, piroszölő-sav-aldehyd, O-formil-4-hidroxi-valer-aldehyd, propargil-aldehyd és az (Ib) általános képletű alkén-aldehydek, amelyekben R' jelentése hidrogénatom vagy 1-4 szénatomos alkilcsoport, pl. az akrolein és 4-pentanol.

A találmány szerinti eljárásban az (I) általános képletben

R jelentése előnyösen észterezett karboxilcsoporttal vagy 1-4 szénatomos alkanoil-oxi-csoporttal helyettesített 1-6 szénatomos alkilcsoport.

Az „észterezett karboxilcsoporttal helyettesített 1-6 szénatomos alkil”-csoport egyenes vagy elágazó láncú, észterezett karboxilcsoporttal helyettesített alkilcsoportokat jelent, amelyekben az észterező csoport 1-4 szénatomos alkil-, fenil-, benzil-, helyettesített benzil- (például p-metoxi-benzil-, metil-benzil-, p-nitro-benzil-) csoport, difenil-metil- vagy valamely más, szokásos karboxil-védőcsoport.

Az utóbbi csoportokra példák: etoxi-karbonil-metil-, 2-metoxi-karbonil-etil-, 3-(tercier-butyl-oxi-karbonil)-propil-, 3-benzil-oxi-karbonil-butyl-, 5-(4-metoxi-benzil-oxi-karbonil)-hexil-, és hasonló észterezett karboxilcsoporttal helyettesített alkilcsoport.

Az „1-4 szénatomos alkoxycsoporttal helyettesített 1-4 szénatomos alkil”-csoport jelentése például a következő: metoxi-metil-, 2-etoxi-etil-, 4-tercier-butyl-oxi-butyl-, 3-izopropoxi-pentil-, 2-etoxi-hexil- stb. csoport.

A „cianocsoporttal helyettesített 1-6 szénatomos alkil-csoport” megjelölés például a következőkre utal: ciano-metil-, 2-ciano-etil-, 4-ciano-butyl-, 3-ciano-butyl-, 3-ciano-hexil- stb. csoport.

A „hidroxilcsoporttal helyettesített 1-6 szénatomos alkil-csoport” kifejezés pl. a következőkre utal: hidroxi-metil-, 2-hidroxi-metil-, 4-hidroxi-butyl-, 3-hidroxi-propil-, 3-hidroxi-hexil- és hasonló csoport.

Az „1-4 szénatomos alkanoil-oxi-csoporttal helyettesített 1-6 szénatomos alkil” -csoport kifejezés pl. a következő csoportokat jelenti: 2-acet-oxi-etil-, 2-formil-oxi-etil-, 3-acet-oxi-propil-, 4-propion-oxi-butyl- és hasonló csoportok.

A találmány szerinti eljárásban különösen kitüntettek azok az RCHO általános képletű aldehydek, amelyekben R egy észterezett karboxil-csoporttal helyettesített 1-4 szénatomos alkil-csoport. Az ilyen csoportokra példa a 2-(metoxi-karbonil)-etil-, 2-(benzil-oxi-karbonil)-etil-, 3-(etoxi-karbonil)-propil-, 2-(formil-oxi)-etil- és 2-acet-oxi-etil-csoport.

Az eljárásban használt RCHO általános képletű vegyületek ismertek: a kereskedelembe hozzáférhetők vagy a szokásos módszerekkel előállíthatók. A találmány szerinti eljárás egy kitüntetett megvalósítási módja szerint olyan RCHO általános képletű aldehydet alkalmazunk, amelyben R jelentése 2-(észterezett karboxi)-etil-, 2-ciano-etil-, 2-(észterezett karboxi)-etinil-, 2-(észterezett karboxi)-vinil-, 3-(észterezett karboxi)-propil-, 2-formil-oxi-etil-, 2-acet-oxi-metil-, 3-formil-oxi-propil-, vagy 3-acet-oxi-propil-csoport és az észterezett karboxil-csoportban az észter-maradék 1-4 szénatomos alkil-, (pl. metil-, etil- vagy terc-butyl-), fenil-,

benzil-, difenil-metil-, tritil- vagy helyettesített benzil- (pl. 4-metoxi-benzil- vagy 4-nitro-benzil-) csoport.

A találmány szerinti eljárásban való felhasználás szempontjából különösen kitüntetett aldehyd a borostyánkősav-félaldehyd-észter. Egy másik, különösen kitüntetett aldehyd a glutársav-félaldehyd egy észtere.

A találmány szerinti eljárásban végbemenő reakciót az 1. reakcióvázlat mutatja be, ahol R jelentése az előbbieken megadott.

Mint az előbbieken említettük, a szerin-hidroxi-metil-transzferáz számos forrásból hozzáférhető. Három ilyen forrás a nyúlmáj (LaVerne Schirch et al., J. Biol. Chem. vol. 237, no. 8, 1962), a kukoricamagocok (T. Masuda et al., Agric. Biol. Chem. 1986, 50, 2763) és a csírázó bab (D. N. Rao és N. A. Rao, Plant Physiol. 1982, 69, 11).

A következő 1. táblázatban jellegzetes aldehyd szubsztrátumokat sorolunk fel, amelyeket az eljárás során két forrásból származó SHMT-vel béta-hidroxi-alfa-aminosavakká alakítottunk át. Az 1. táblázatban szereplő szubsztrátumok konverzióját úgy hajtjuk végre, hogy a szubsztrátumot és a glicint az eljárás körülményei között SHMT-vel inkubáljuk. Az eljárási paraméterek egy hányada azonos volt valamennyi szubsztrát esetében; ezeket a következő bekezdésekben részletezzük. A kivételeket – ha előfordulnak – esetenként jelezzük.

Az inkubálást 10 mM foszfát-pufferben végezzük (pH 7,3), amely kb. 80 μ M koncentrációban piridioxál-5'-foszfátot tartalmaz. A jobb eredmények elérése érdekében valamennyi oldatot desztillált, ionmentesített vízzel készítettük el. Az átalakítást kb. 37 °C-on végezzük, leforrasztott, 500 μ l térfogatú polipropilén mikrocentrifuga-csővekben, állandó hőmérsékletű vízfürdőben.

A kémcsöveket fénytől óvjuk, eltekintve azokról az esetektől, amikor ezeket kiemeljük a vízfürdőből, alikvot mennyiségeknek elemzési célokra való levételéhez. Valamennyi átalakítási kísérletben az SHMT-vel való inkubálással párhuzamosan egy vak enzimes inkubálást is végzünk. Az inkubálási elegy össz térfogata általában kb. 200 μ l. A vakpróba esetében a körülmények megegyeznek az inkubációs elegyével, eltekintve attól, hogy enzim nincs jelen.

1. táblázat
Az SHMT aldehyd (RCHO) szubsztrátumai

Aldehyd (RCHO) R	Enzim*	
	nyúlmáj	kukoricamagonc
$-(CH_2)-CO_2CH_3$	+	+
$-(CH_2)_2-CO_2(CH_3)_2$	+	ND
$-(CH_2)_2-CO_2CH_3$	+	+
$-C(O)CH_2^{**}$	+	+
$-(CH_2)_3-O-CHO$	+	ND
$-CH_2OCH_2C_6H_5$	ND	+
2-(2-furil)-etil	+	-

* + = konverzió; - = nincs kimutatható konverzió; ND = nem határoztuk meg,

** a nyúlmáj-SHMT esetében VO_3^- van jelen; a kukorica-SHMT esetében tetrahydrofolát van jelen.

Az eljárás a béta-hidroxi-alfa-aminosav megállapítására oly módon követhető, hogy az inkubációs elegyből időnként alikvot mennyiségeket veszünk ki és a mintákat elemzésnek vetjük alá, a keverékben jelenlevő valamennyi primer amin vegyület HPLC segítségével végzett elkülönítésével és az O-ftáldialdehid-izoindol-származékok fluoreszcenciás kimutatásával. A meghatározási eljárást a következő helyeken írják le: B. N. Jones et al., J. Chrom. 1983, 266, 471; B. N. Jones et al., J. Liq. Chrom. 1981, 4, 565 és S. S. Simons Jr. et al., J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 7098.

Az inkubációs keverékek és az enzim-vakpróba HPLC elemzése lehetővé teszi annak meghatározását, hogy a kromatogramokon mely csúcsok tulajdoníthatók az enzimes reakció termékeinek.

A találmány szerinti eljárást úgy hajtjuk végre, hogy az aldehidet egy pufferolt glicin-oldathoz adjuk – amely PLP-t és egy másik kofaktort tartalmaz –, majd az oldatot összekeverjük a pufferolt enzim-oldattal.

Egy másik megoldás szerint a pufferolt, PLP-t tartalmazó glicin-oldatot és az enzim-oldatot keverjük össze, majd hozzáadjuk az aldehidet. Ugyancsak lehetséges az a megvalósítási mód, amely szerint az enzim-oldatot hozzáadjuk az aldehidet és a glicint tartalmazó oldathoz, PLP-t tartalmazó pufferben.

Ahhoz, hogy az eljárás szerinti átalakulás végbemenjen, nincs szükség arra, hogy az RCHO általános képletű aldehid teljesen oldatba menjen. Azok az aldehidek, amelyek csak részben oldhatók a vizes reakcióelegyben, ugyancsak enzim-szubsztrátként szolgálhatnak.

A találmány szerinti eljárás abban az esetben, ha aldehidként alifás aldehidet alkalmazunk (azaz az RCHO általános képletű vegyületben az aldehid-csoporthoz kapcsolódó szénatom telített, $-\text{CH}_2-$ csoport) kitüntetetten a béta-hidroxi-alfa-aminosav vagy észter L-eritro-diasztereomerjét szolgáltatja.

A találmány szerinti eljárással előállított béta-hidroxi-alfa-aminosavakra példák a következők:

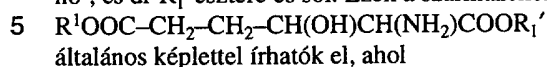
béta-hidroxi-alfa-amino-adipinsav, béta-hidroxi-alfa-amino-hexánsav, béta-hidroxi-alfa-amino-omega-formil-oxi-hexánsav, béta-hidroxi-alfa-amino-gamma-oxo-valeriánsav, béta-hidroxi-alfa-amino-gamma-fenil-vajsav, béta-hidroxi-alfa-aminoheptánsav, béta-hidroxi-alfa-amino-omega-(2-furil)-pentánsav és a hasonló aminosavak.

A találmány szerinti eljárás egy kitüntetett megvalósítási módja szerint a borostyánkősav-féldaldehid egy észterét, amilyen egy 1–4 szénatomos alkil-észter, pl. a metilészter vagy az izopropil-észter, glicinnel és SHMT-vel inkubáljuk PLP jelenlétében. Így a béta-hidroxi-alfa-amino-adipinsav félészterét kapjuk az L-eritro-izomer alakjában. Az eljárás egy másik kitüntetett megvalósítási mód szerint a glutársav-féldaldehid egy észterét, pl. a metilésztert inkubáljuk SHMT-vel; így a béta-hidroxi-alfa-amino-pimelinsav félészterét kapjuk.

A találmány szerinti eljárás említett két megvalósítási módját a 2. reakcióvázlat mutatja be; e képletekben R_1 jelentése 1–4 szénatomos alkil-, fenil-, benzil-, difenil-metil-, 4-metoxi-benzil- vagy 4-nitro-benzil-csoport és

n értéke 2 vagy 3.

A találmány szerinti eljárással előállítható továbbá a sav, a béta-hidroxi-alfa-amino-adipinsav, ennek mono-, és di- R_1 -észtere és sói. Ezek a származékok az



általános képlettel írhatók el, ahol

R_1 jelentése az előbbieken megadott és

R_1' jelentése hidrogénatom vagy R_1 .

Az eljárás során ezt az aminosavat az L-eritro-alakban kapjuk meg. A diacid sói vagy monoészterek a szokásos módon állíthatók elő. Az ilyen sók közé tartoznak a következők:

- alkálifém-sók, így a nátrium- és kálium-sók,
- alkáli földfém-sók, így a kalcium-sók,
- és az ammónium-sók és amin-sók, amelyek pl. a következő aminokkal képezhetők: benzil-amin, dibenzil-amin, ciklohexil-amin, diciklohexil-amin, 1–4 szénatomos alkil-csoport(ka)t tartalmazó primer és szekunder aminok (így a metil-amin, etil-amin, dietil-amin, di-(n-butil)-amin), etanol-amin, dietanol-amin, dipropanol-amin stb.

Ezek a sók hasznosak a disav vagy egy monoésztere elkülönítésében és tisztításában és stabil alakokat jelentenek az aminosav tárolására.

Ugyancsak előállíthatók az aminosavakkal és észterekkel képezett savaddíciós sók. Ilyen sókat azokkal a savakkal képezhetünk, amelyek erősebbek az aminosav savas karboxil-csoportjánál. Példa az ilyen savakra a sósav, hidrogénbromid, foszforsav és kénsav, valamint a szulfonsavak, így a toluol-szulfonsav, naftalin-szulfonsav, metán-szulfonsav és az n-bután-szulfonsav.

R_1 -észtereken a mono- és a diésztereket értjük, amelyekben R_1 jelentése azonos az előbbi reakcióvázlatban megadottal. Az ilyen észterekre példa a monometil-, mono-etil-, dimetil-, dietil-, terc.butil-, di-terc-butil-, benzil-, 4-metoxi-benzil- és a dibenzil-észter.

A találmány szerinti eljárással előállított béta-hidroxi-alfa-aminosavak fontos béta-laktám vegyületek hasznos köztitermékei. Ezek a termékek ismert eljárásokkal béta-laktám vegyületekké alakíthatók át, amelyek ismert antibiotikumok előállításához használhatók fel. A béta-hidroxi-alfa-aminosavak pl. hidroxamát származékokká alakíthatók át és az utóbbiak ciklizálhatók, 3-amino-4-helyettesített béta-laktám-származékok képződése közben, amint ezt a 3. reakcióvázlat bemutatja; e képletekben

R jelentése az előbbieken és az (I) képlettel kapcsolatban megadott és

R_2 jelentése alkil-, alkanoil- vagy aralkil-csoport.

A hidroxamát-képzéshez és a hidroxamát béta-laktámmá való ciklizálásához a következő módszereket használjuk fel: M. J. Miller, Acts. Chem. Res. 1986, 19, 49; G. Rajendra et al., Tetrahedron Lett. 1987, 28, 6257 és T. Kolasa et al., Tetrahedron Lett. 1987, 28, 1861.

Egy másik megoldás szerint a béta-hidroxi-alfa-aminosavak N-(helyettesített metil)-azetidinonokká alakíthatók át (4 595 532 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás, szabadalmas M. J. Miller). Ezenkívül az eljárással kapott aminosav termékek N-(foszfono-metil)-azetidinonokká is átalakíthatók (M. J.

Miller, 4 820 815 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

A következő előállítási eljárások és példák részleteiben írják le a találmány szerinti eljárást, de nem áll szándékunkban a találmány tárgyát ezekre korlátozni.

A szerin-hidroxi-metil-transzferáz előállítása kukoricamagoncokból

Valamennyi következő eljárást 4 °C-on hajtjuk végre. 5–7 napos kukoricamagoncokat megmosunk és Waring blender-ben homogenizálunk 100 mM-os kálium-monohidrogénfoszfát pufferben, amely 1 mM etiléndiamin-tetraecetsav-(EDTA)-dinátriumsót, 1 mM ditiotreitol és 125 µM piridoxál-5'-foszfátot tartalmaz. A keverék kb. 960 g/l magoncot tartalmaz.

A homogenizátumot sejtvásznon szűrjük át és a szűrletet ammónium-szulfáttal kezeljük. A 35–50%-os ammónium-szulfátos telítés során kicsapódott fehérjét 13,800×g-vel 40 percen át centrifugáljuk, majd pH 7,8 10 µM-os foszfát-pufferben oldjuk, amely 125 µM piridoxál-5'-foszfátot és 1 mM EDTA-t tartalmaz. Az oldatot dializáljuk és 5–15 mg/ml fehérje értékre töményítjük. Ennek során ugyanazt a puffert használjuk, EDTA nélkül.

A fehérje aldoláz-aktivitásának meghatározásához többkomponensű rendszert használunk, amely a következőkből épül fel: az L-allo-treonin aldolázzal katalizált retroaldolja és a kapott acetaldehid NADH-tól (a nikotin-amid-adenin-dinukleotid redukált alakja) függő, élesítő-alkohol-dehidrogenáz (ADH) hatására végbemenő redukciója.

Fajlagos aktivitás: átlagosan 78 milliegyeség/mg fehérje. Az enzimaktivitás egységét úgy definiáljuk, mint az ahhoz szükséges enzim-mennyiséget, hogy 1 optikai sűrűség egységnyi változás következzen be 340 nm-en 1 perc alatt, szobahőmérsékleten, a következő összetételű közegben: ADH, 120 mM L-allo-treonin, 125 µM PLP és 120 µM NADH 100 mM pH 7,5 foszfát-pufferben.

A SHMT-t, amikor nem használjuk, előállítása után vagy liofilizált alakban, vagy lefagyasztva, 10% glicerinrel tároljuk. A következő példákban, hacsak másként nem jelezzük, a pufferrendszer pH 7,3 10 mM kálium-foszfát oldat, amely kb. 80 µM piridoxál-5'-foszfátot (PLP) tartalmaz. Valamennyi oldatot desztillált, ionmentes vízzel készítünk el.

Az enzim inkubálást 37 °C-on lezár, 500 µl térfogatú polipropilén mikrocentrifuga-csővekben végezzük, állandó hőmérsékletű vízfürdőben.

A példákban közölt retenciós idők esetenként kissé különbözhetnek, mivel a HPLC elemzés során kismértékű változások következhetnek be olyan tényezőkben, mint az oszlop működése, ekvibrálás, puffer-minőség stb.

A következő példákban alkalmazott SHMT-t nyúl májból állítottuk elő, Schirch (1. az előzőekben) szerint.

1. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-adipinsav-monometil-észter
13,3 g (0,177 mmól) glicint és 20 mg (0,172 mmól) borostyánkősav-félaldehid-metil-észtert 5,0 ml pufferben oldunk; így a koncentrációkat 35 mM ill. 34 mM

értékre állítjuk be. Az ebben a kísérletben használt aldehid DMSO-mentes, bár korábbi inkubálások alkalmával megfigyelhető volt, hogy az aldehid még mindig tartalmazott szennyezést (abból következően, hogy szintézise $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$ -ből kiindulva ózonolózissal történt és a feldolgozás során dimetil-szulfoxidot alkalmaztak).

0,1 mg SHMT-t 100 µl pufferben oldunk és az oldathoz hozzáadunk 100 µl szubsztrát-elegyet. Alikvot mintákat veszünk 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 és 24 óra inkubálási idő után.

A nagyobb (L-eritro-) termék-csúcsot 22,5 perces retenciós idő mellett figyeljük meg; ez a maximumot 2 óra alatt éri el.

Az első 2 óra alatt egy új kisebb csúcs jelenik meg a HPLC elemzés során, amelynek retenciós ideje kb. 8 perc. 24 óra alatt ennek intenzitása nő, míg a kiindulási glicinnek és köztermék alfa-amino-béta-hidroxi-adipinsav-metilészternek megfelelő csúcsok csökkennek. 24 óra múlva az új csúcsnak a glicin ill. az észter csúcsához viszonyított aránya 38:47:15.

Az új csúcsnak megfelelő vegyület szerkezetét függetlenül végzett szintézissel és az autentikus és az enzim úton keletkezett termék együtt való injektálásával határoztuk meg és azt találtuk, hogy az L-eritro-alfa-amino-béta-hidroxi-adipinsav ($\text{R} = -\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$).

Az autentikus vegyület kémiai szintézisét a borostyánkősav-félaldehid-metilészter és egy királis oxazin bór enolátja aldol-kondenzációjával végezzük (D. S. Reno et al., Tetrahedron Lett. 1990, 31, 827), majd a kapott terméket védőcsoport-mentesítjük és hidrolízissel a keresett vegyületet kapjuk.

Ebben a kiindulási aminosavnak az enzim szintézis során való képződése az eredetileg képződött aminosav-monometil-észter-hidrolízise segítségével következik be. Mivel a termék egy további ionizált karbonsav-csoportot tartalmaz, nem szubsztrát a reverzibilis enzim aldol-kondenzáció számára. Így az új aminosav-termék (L-eritro-alfa-amino-béta-hidroxi-adipinsav) felhalmozódik.

Mint két karbonsav-csoportot tartalmazó aminosav ez a termék a reakcióelegyből ioncserélő kromatográfiával különíthető el és tisztítható (J. P. Greenstein–M. Winitz: Chemistry of Amino Acids, vol. 2, p. 1452–1460, J. Wiley & Sons, New York, 1961).

2. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-adipinsav-mono-izopropil-észter

26,1 mg (0,348 mmól) glicint 10,0 ml pufferben oldunk és hozzáadunk 34 mg borostyánkősav-félaldehid-izopropil-észtert (amely az előállítási műveletből származó DMSO-t tartalmaz). DMSO-nak az inkubációs elegyben való jelenléte nem befolyásolja hátrányosan az enzimet, illetőleg a reakciót. Az aldehid koncentrációja a pufferben a jelenlevő DMSO mennyiségének levonása után 18 mmól. A glicin kiindulási koncentrációja az inkubálás során az elegyben 17,4 mM, az aldehid pedig 9 mM.

A szubsztrát-keveréket (100 µl) hozzáadjuk 0,1 mg SHMT 100 µl pufferrel elkészített oldatához és a blank enzim oldathoz.

Alikvot mintákat veszünk 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 17,25; 25 és 52 óra elteltével és HPLC-vel megvizsgáljuk ezeket. A fő termék-csúcs (L-eritro-) 25 perces retenciós idő után jelenik meg – azaz 0,5 órán belül – és 2–4 óra alatt nő maximálisra.

3. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-pimelinsav-monometil-észter

Az ebben a reakcióban felhasznált glutársav-félaldehyd-metil-észter kb. 1:1 tömegarányban tartalmaz DMSO-t. A DMSO melléktermék az aldehyd előállítás reakciójában, amelynek lényege az 1-metoxi-ciklopentén ózonolízise és amelynek során a feldolgozási fázisban DMSO-t alkalmaznak (D. L. Cline et al., Tetrahedron Lett. 1980, 36, 1399).

A szubsztrát oldatot úgy készítjük el, hogy 25,6 mg (0,341 mmól) glicint és 66,7 mg aldehyd/DMSO keveréket 10 ml pufferben oldunk. Így a glicin koncentrációja 34,1 mM, míg az aldehyd kb. 25 mM.

Az enzim-oldat 0,1 mg SHMT-t tartalmaz 40 µl (és nem 100 µl) pufferben oldva. 40 µl szubsztrát oldatot hozzáadunk az enzimoldathoz ill. a blankhoz és a szokásos módon végezzük az inkubálást. 10 µl térfogatú alikvot mintákat veszünk 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 és 17,0 óra elteltével. A 0,5 órás mintában a HPLC kromatogramon 23,7 percnél egy enzim hatására keletkezett csúcs jelenik meg, amely a keresett terméknek felel meg. Az integrálás kb. 20%-os kitermelésre mutat. 22,3 percnél egy második kis csúcs jelenik meg, amely ugyancsak enzimhatásra képződik. Ez kisebb mennyiségű treo-izomernek felel meg.

4. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-gamma-oxo-valeriánsav

25,5 mg glicint (0,340 mmól) és piroszölősav-aldehydet (40 tömeg%-os oldatból 61,1 mg; 0,327 mmól piroszölősav-aldehyd) 10 ml pH 7,2 pufferben oldunk; így a törzsoldatban 34 mM glicin és 32,7 mM piroszölősav-aldehyd koncentrációt állítunk be. 1,5 mg nátrium-metavanadátot adunk hozzá (Aldrich, 90% tisztaságú vegyület). Kb. 30 perc alatt ez feloldódik és koncentrációja 1,11 mM.

Az enzim oldathoz (0,1 mg SHMT 80 µl-ben) 80 µl szubsztrát oldatot adunk. 10 µl-es mintákat veszünk 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 29 és 53 óra elteltével.

A HPLC-vel végzett aminosav-meghatározás arra mutat, hogy az új aminosav 8,5 perces retenciós idővel jelenik meg. Annak igazolására, hogy ez a keresett aminosav, autentikus racém anyagot állítunk elő a rézglicinát módszerrel. Ezek szerint 4,23 g réz(II)glicinátot (20 mM) 10 ml 9M vizes KOH-ban oldunk. Az oldathoz piroszölősav-aldehydet (40 tömeg%-os vizes oldatból 16,2 ml-t; ez 7,0 g = 9,71 mM aldehydnek felel meg) adunk. 5,25 óra elteltével 3M ammónium-hidroxidot (40 ml) adunk a kapott barna színű oldathoz és az oldószereket ledesztilláljuk. Barna színű olajat ka-

punk. Az olajat NH_4^+ -alakú Dowex-50 gyantát tartalmazó oszlopon vezetjük át; az eluálást vízzel végezzük. Így a félig tisztított aminosavat kapjuk.

5. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-6-formil-hexánsav

Ebben az inkubációs elegyben az aldehyd még tartalmaz jelentős mennyiségű DMSO-t azzal összefüggésben, hogy előállítás a dihidropirán ózonolízisével történt és a feldolgozás során DMSO-t alkalmaztak. 10,0 ml pufferhez 39,5 mg (kb. 0,20 mmól, a DMSO-t is figyelembe véve) O-formil-4-hidroxi-butanolt és 25,5 mg (0,340 mmól) glicint adunk.

40 µl szubsztrát oldatot adunk az enzim-oldathoz (0,1 mg SHMT 40 µl-ben) és a blank oldathoz. A két szubsztrát koncentrációja az inkubációs elegyben 17 mM (glicin) és 10 mM (aldehyd). 10 µl-es alikvot mintákat veszünk 0,5; 1,0+ 2,0+, 3,0+ 7,0 és 24 órai inkubálási idő után.

A 0,5 órákor levett első mintában aminosav-elemzéssel két új aminosav mutatható ki. 15,6 percnél – közvetlenül a glicin csúcs után – egy kis csúcs jelenik meg. A másik egy nagy, éles körvonalú csúcs 22,5 percnél. A harmadik órában a 22,5 percnél levő csúcs – amely a várt aminosavnak felel meg – maximumot ér el, a glicin-csúcs kb. 10%-ának megfelelő mértékben, majd lassan csökken, míg a 15,6 percnél megjelenő csúcs intenzitása kissé nő. A 15,6 percnél eluálódó aminosav az a termék, amely a hangyasav-észternek a reakcióelegyben végbemenő lassú hidrolízise során keletkezik. Szerkezete az alfa-amino-béta-hidroxi-6-hidroxi-hexánsavénak felel meg.

6. példa

alfa-Amino-béta-hidroxi-delta-(2-furil)-valeriánsav

A szubsztrát oldatot úgy állítjuk elő, hogy 25,5 mg (0,340 mmól) glicint és 46,3 g (0,373 mmól) aldehydet 10,0 ml pufferben oldunk. Az aldehyd (egy folyadék) oldódása kb. 15 percet vesz igénybe.

100 µl szubsztrát oldatot hozzáadunk az enzim oldathoz (0,1 mg SHMT 100 µl pufferben) és az elegyet 37 °C-on inkubáljuk. 0,55; 1,0; 2,0; 4,25+ 8,0 és 21 óra múlva veszünk alikvot mintákat. 0,5 óra alatt egy 21,3 perces retenciós idővel rendelkező csúcs jelenik meg a HPLC elemzés során, amely arra mutat, hogy a glicin kb. 3%-ban alakult át az aldol-termékké.

7. példa

Az alfa-amino-béta-hidroxi-hex-5-ínsavat propargil-aldehyddel állítjuk elő, az előbbi példákban leírt inkubációs eljárások szerint.

8. példa

Az alfa-amino-béta-hidroxi-hex-5-énsavat allil-aldehyd alkalmazásával kapjuk, az előző példákban leírt inkubációs körülmények között.

9. példa

Az alfa-amino-béta-hidroxi-pent-4-énsavat úgy állítjuk elő, hogy akroleint használunk és az előző pél-

dákban leírt eljárásokat követjük ill. körülményeket alkalmazzuk.

10. példa

Az alfa-amino-béta-hidroxi-delta-ciano-valeriánsavat béta-ciano-propion-aldehid felhasználásával kapjuk, az előző példákban megadott körülmények között.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás (I) általános képletű béta-hidroxi-alfa-aminosavak előállítására – a képletben
R jelentése 2–6 szénatomos alkenil-, 2–6 szénatomos alkinil-csoport vagy észterezett karboxil-, 1–4 szénatomos alkoxicsoporthal, ciano-, hidroxi-, 1–4 szénatomos alkanoil-oxi-, fenil- vagy furilcsoporttal helyettesített 1–6 szénatomos alkilcsoport –,
azzal jellemezve, hogy 30 °C és 55 °C közötti hőmérsékleten vizes oldatban 5,5 és 9,0 közötti pH-értéken egy RCHO általános képletű aldehidet – amelyben R jelentése a fenti – és glicint piridoxál-5'-foszfát jelenlétében szerin-hidroxi-metil-transzferázzal reagáltatunk.
2. Az 1. igénypont szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy R helyén észterezett karboxilcsoporttal vagy 1–4

szénatomos alkanoil-oxi-csoporttal helyettesített 1–4 szénatomos alkilcsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületeket állítunk elő.

3. Az 1. igénypont szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy RCHO általános képletű aldehidként (Ic) általános képletű aldehidet alkalmazunk, amelyben
R₁ jelentése 1–4 szénatomos alkil-, benzil-, difenil-metil-, 4-metoxi-benzil- vagy 4-nitro-benzil-csoport, és

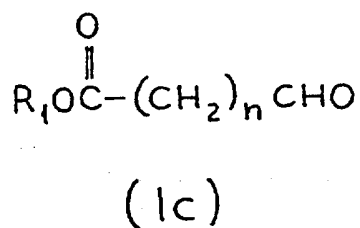
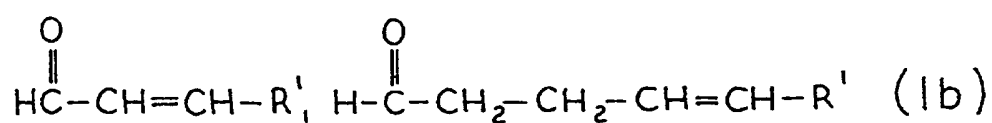
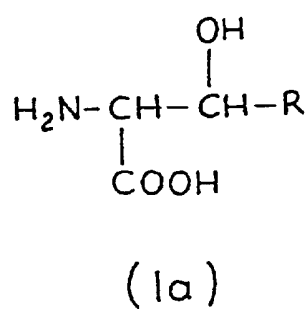
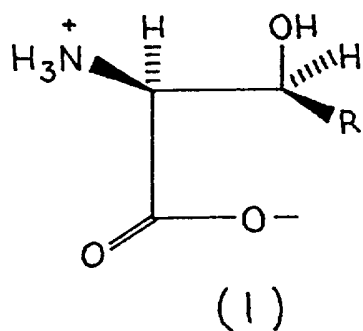
- 10 n értéke 2 vagy 3.

4. A 3. igénypont szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy RCHO általános képletű aldehidként borostyánkősav-félaldehid-metil-észtert alkalmazunk.

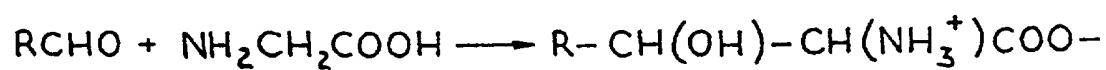
5. A 3. igénypont szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy RCHO általános képletű aldehidként glutársav-félaldehid-metil-észtert alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az R helyén észterezett karboxil-, 1–4 szénatomos alkanoil-oxi-, fenil- vagy furil-csoporttal helyettesített 1–6 szénatomos alkilcsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületeket állítunk elő.

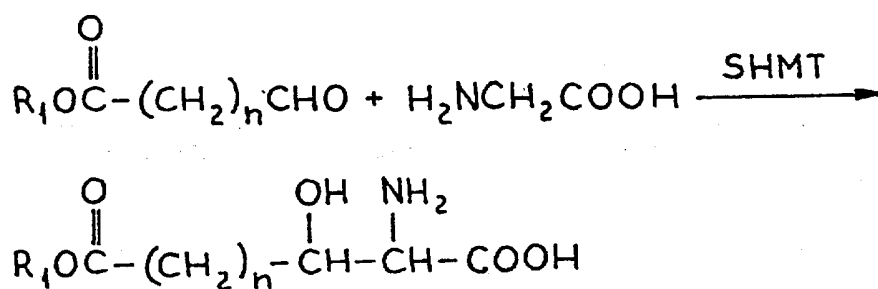
7. A 6. igénypont szerint eljárás, azzal jellemezve, hogy a béta-hidroxi-alfa-aminosavat L-eritro-diasztereomer alakban állítjuk elő.



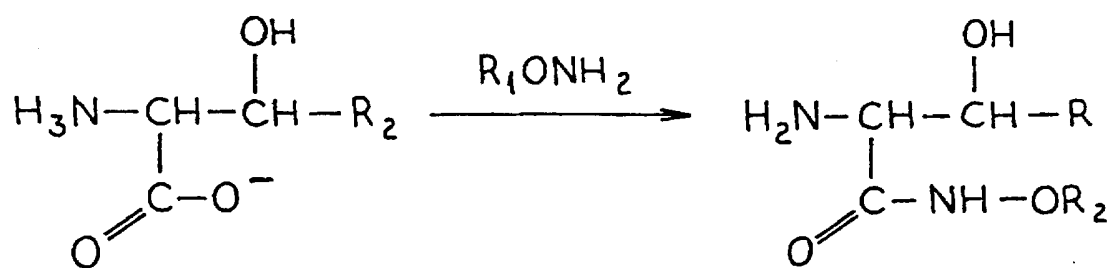
1. reakcióvázlat



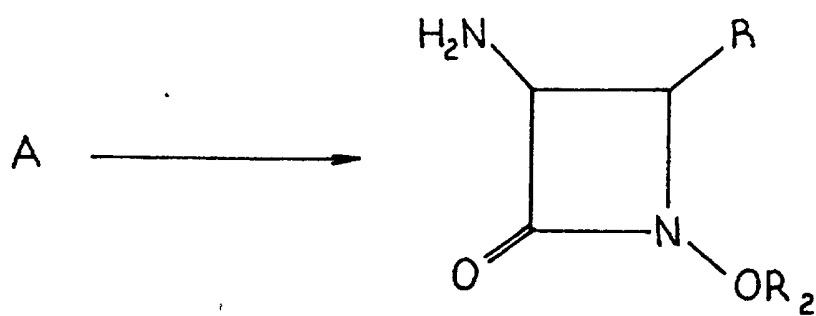
2. reakcióvázlat



3. reakcióvázlat



A



B