



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

228431

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 04 05 83
(21) (PV 3186-82)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/22

(40) Zveřejněno 15 09 83

(45) Vydáno 15 04 86

(75)
Autor vynálezu

LEBL MICHAL ing. CSc., KROJIDLO MILAN CSc.,
FLEGEL MARTIN RNDr., CSc., BÁRTA MIROSLAV prom. chem.,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr., CSc., ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

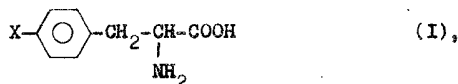
(54) Způsob dělení optických isomerů derivátů fenylalaninu substituovaných
v p-poloze

1

Vynález se týká způsobu dělení optických isomerů derivátů fenylalaninu substituovaných v p-poloze. Tyto deriváty fenylalaninu jsou součástí syntetických peptidů, které mohou sloužit např. jako selektivně natriuretické působící látky a pro tento účel je nutno je připravit v opticky jednotné formě.

Již dříve bylo zjištěno, že pomocí penicilin-amidohydrolázy (E. C. 3.5.1.11.) je možno odštěpit acylovou skupinu z L-formy aminokyseliny (Lucente G., Romeo A., Rossi S.: *Experientia* 21, 317 (1965); Sovětské a.o. 487940; Britský patent 1 369 462; čsl. a.o. 209 633 a Vojtišek V., Slezák J.: *Folia Microbiologica* 20, 224 (1975); Šimek P. a kol.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 46, 2 263 (1981). Dále bylo zjištěno, že specifita enzymu není zcela absolutní a že i D-forma aminokyseliny je uvolňována z acylovaného derivátu. Pro deriváty fenylalaninu substituované v p-poloze však tato metoda enzymatického štěpení nebyla dosud ověřena.

Předmětem vynálezu je způsob enzymatického dělení optických isomerů derivátů fenylalaninu substituovaných v p-poloze obecného vzorce (I),



kde X je alkyl obsahující 1 až 4 atomy uhlíku nebo halogen, jehož podstatou je, že D,L-N-fenylacetyl-derivát fenylalaninu, zejména D,L-N-fenylacetyl-p-ethylfenylalanin, se inkubuje s enzymem s penicilinamidohydrolázovou aktivitou, s výhodou s jejich nerozpustnými formami, a to diskontinuálním nebo kontinuálním způsobem v rozmezí teplot 15 až 45 °C, při hodnotách pH 7,0 až 8,5, s výhodou 7,6 až 7,8, a vzniklá směs derivátů L-fenylalaninu a D-N-fenyl-

acetylderivátu fenylalaninu, zejména L-p-ethylfenylalanin a D-N-fenylacetyl-p-ethylfenylalanin, se dělí, s výhodou pomocí měniče iontů. Enzymovou reakcí je výhodné vzhledem k optimálnímu složení produktu zastavit, když je dosaženo konverze, při které ještě nedochází ke štěpení acylu z D-formy aminokyseliny. Postup využívající penicilinamidohydrolázy (E.C. 3.5.1.11) nebo nerozpustné formy tohoto enzymu, např. enzymu zakotveného na buňkách *B. megaterium* (Čs. AO č. 208 931), navzájem vázaných buněk *E. coli* (Čs. AO č. 203 607) majících zachovanou penicilinamidohydrolázovou aktivitu, zesíťovaných a permeabilizovaných produkčních buněk mikroorganismů (Čs. AO č. 201 621) nebo agregovaných buněk (Čs. AO č. 197 101) je zvláště výhodný z hlediska snadnosti izolace produktu a možnosti práce v kolonovém uspořádání. Pro získání opticky jednotného produktu je nezbytné sledovat průběh reakce vhodnou metodou např. kapalinovou nebo plynovou chromatografií a reakci zastavit při vhodném stupni konverze, s výhodou 50 %, neboť jinak dojde k postupnému odštěpení acylu i z D-formy substrátu.

Způsob dělení optických antipodů je dále objasněn v příkladech provedení:

P ř í k l a d 1

L-p-ethylfenylalanin

K suspenzi D,L-p-ethylfenylalaninu (2 g) v 2M NaOH (7 ml) byl při 10 °C po částech během 30 min. přidáván fenylacetylchlorid (3 ml) a další 2M NaOH, tak aby pH směsi bylo ~ 12. Poté byla suspenze míchána ještě 2 h při teplotě místnosti. Reakční směs byla okyselena koncentrovanou kyselinou solnou na pH 2 a uložena přes noc do lednice. Produkt byl odsát, promyt vodou, vysušen a překrystalován z 30% ethanolu. Bylo získáno 2,65 g (82 %) látky o t. t. 146 až 149 °C.

R_F 0,93 (S 1), 0,50 (S 2), 0,86 (S 3), 0,61 (S 4).

Pro $C_{19}H_{21}NO_3$ (311,4)

vypočteno: 73,29 % C, 6,80 % H, 4,50 % N;
nalezeno: 72,98 % C, 6,67 % H, 4,32 % N.

Vzniklý meziprodukt (fenylacetyl-DL-p-ethylfenylalanin 1,1 g) byl suspendován ve vodě (40 ml) a pH bylo upraveno na hodnotu 7,5 přidávkou 0,1 M NaOH (3,1 ml). K vzniklému roztoku byl přidán 0,2 M fosfátový pufr (13 ml) o pH 7,5 a navzájem vázané buňky *E. coli* získané podle Čs. AO č. 203 607 v množství 1 g a směs byla míchána při 40 °C.

Pomocí kapalinové chromatografie byl sledován průběh štěpení MeOH-0,05% kyselina trifluorocetová 80:20): hodnoty k' : kyselina fenylacetyl-p-ethylfenylalanin - 2,11, p-ethylfenylalanin - 2,84. Po 3 h byla reakční směs zfiltrována, okyselena 1M HCl (10 ml), zfiltrována a nanášena na sloupec sulfonátového latexu (60 ml). Po promytí vodou byl produkt eluován 15% pyridinem a odpařen. Bylo získáno 234 mg (68,5 %) L-p-ethylfenylalaninu dle tenkovrstvé chromatografie ve čtyřech rozpouštědlových systémech a dle elektroforézy při dvou rozdílných pH shodného se standardem. Optická čistota zjištěná pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie s chirální mobilní fází (0,008 mol.l⁻¹ L-fenylalanin a 0,004 mol.l⁻¹ CuSO₄ - methanol; (55:45) byla > 99% a tato hodnota byla potvrzena i inkubací vzorku s oxidázou L-aminokyselin. Produkt byl překrystalován z 1M HCl; t. t. 206 až 208 °C, $[\alpha]_D^{20}$ - 23,9° (c 0,12; voda). Literatura (Zhuze A. L., Jošt K., Kasafírek E., Rudinger J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 2 648: 1964) udává $[\alpha]_D^{20}$ -23,1° (c 0,12; voda).

P ř í k l a d 2

L-p-methylfenylalanin

Fenylacetyl-D,L-p-methylfenylalanin byl inkubován stejným způsobem jako v příkladu 1, s výjimkou toho, že byl použit enzym zakotvený na buňkách *Bacillus megaterium* (čs. AO č. 208 931). Po izolaci byl získán ve výtěžku 65 % čistý L-p-methylfenylalanin shodný svými vlastnostmi se standardem (Zhuze A. L. a spol.: Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 2 648 /1964/). Optická čistota byla ověřena stejným způsobem jako v příkladu 1.

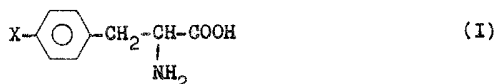
P ř í k l a d 3

L-p-chlorfenylalanin

Fenylacetyl-D,L-p-chlorfenylalanin byl inkubován jako v příkladu 1 s výjimkou toho, že bylo použito zesíťovaných a permeabilizovaných buněk (čs. AO č. 201 621). Obvyklým zpracováním byl získán L-p-chlorfenylalanin ve výtěžku 52 %, jehož optická čistota byla ověřena stejně jako v příkladu 1.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob enzymatického dělení optických isomerů derivátů fenylalaninu substituovaných v p-poloze obecného vzorce (I),



kde X je alkyl obsahující 1 až 4 atomy uhlíku nebo halogen, vyznačený tím, že D,L-N-fenylacetylderivát fenylalaninu, zejména D,L-N-fenylacetyl-p-ethylfenylalanin, se inkubuje s enzymem s penicilinamidohydrolázovou aktivitou, s výhodou s jejich nerozpustnými formami, a to diskontinuálním nebo kontinuálním způsobem v rozmezí teplot 15 až 45 °C, při hodnotách pH 7,0 až 8,5, s výhodou 7,6 až 7,8, a vzniklá směs derivátů L-fenylalaninu a D-N-fenylacetylderivátů fenylalaninu, zejména L-p-ethylfenylalaninu a D-N-fenylacetyl-p-ethylfenylalaninu se dělí, s výhodou pomocí měniče iontů.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že enzymová reakce je zastavena, když je dosaženo konverze, při které ještě nedochází ke štěpení acylu z D-formy aminokyseliny.