DESCRIÇÃO

DA

PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 84 995

REQUERENTE: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã,com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal da Alemanha.

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE L-TERC.-LEUCINA E DE L-FOSFINOTRICINA POR TRANS-AMINAÇÃO"

INVENTORES: Dr. Johann Then, Dr. Klaus Bartsch, Dr.Hans--Matthias Deger, Dr. Susanne Grabley e Dr. Rüdiger Marquardt.

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883. República Federal da Alemanha, em 4 de Junho de 1986, sob o nº P 36 18 812.3.

P.I.M: 84995

Memória descritiva referente à patente de invenção de HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-6230 Frankfurt/Main 80, República Federal Alemã, (inventores: Dr.Johann Then, Dr.Klaus Bartsch, Dr. Hans-Matthias Deger, Dr. Susanne Grabley e Dr. Rüdiger Marquardt residentes na República Federal Alemã), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE L-TERC.-LEUCINA E DE L--FOSFINOTRICINA POR TRANS-AMINAÇÃO".

Memória descritiva

Os aminoácidos não proteinogénicos opticamente activos têm uma grande importância por causa da sua actividade biológica conhecida ou potencial. Por consequência, alguns são empregados na indústria farmacêutica como L-di-hidroxifenil-alanina (L-Dopa) ou α-metil-dopa ou são utilizados na protecção de plantas como Fosfinotricina. Outros são produtos intermediários prévios para produtos farmacêuticos como D-fenil-glicina ou β-p-hidroxifenil-glicina na preparação das penicilinas semissintéticas . Eles podem também ser produtos intermédios prévios para a síntese de produtos químí

cos finos. Na síntese assimétrica de derivados de aminoácidos, a leucina terciária também é empregada [U. Schöllkopf, Pure and Appl. Chem., 55 1799 - 1806, (1983)].

Os aminoácidos opticamente activos não proteinogénicos são preparados de preferência por via química. Neste caso, é prejudicial que não se possa trabalhar estereosselectivamente e que, como produto final, se obtenha o racemato. Pelo contrário, os processos enzimáticos muito frequentemente têm a vantagem de, a partir de produtos intermediários prévios que se preparam de maneira simples com emprego duma fase enzimática se poder sintetizar selectivamente um composto quiral. Isso é especialmente vantajoso se apenas um dos dois compostos estereo-isoméricos for biologicamente activo.

A síntese de aminoácidos naturais chamados proteinogénicos por biotransformação com trans-aminases é em si conhecida. No pedido de Patente Europeia Nº 152 275, descreve-se um processo para a preparação de fenil-alanina por trans-aminação com o auxílio dum microrganismo geneticamente modificado, que se caracteriza por sobreprodução de amino-transferases. De acordo com o pedido de Patente Europeia Nº 135 846 a preparação de L-aminoácidos naturais realiza-se fazendo reagir α -cetoácidos com ácido aspártico como dador de grupos amina em presença duma trans-aminase que se isola a partir de E. coli. Obtêm-se os L-aminoácidos que correspondem ao α -ceto-ácido assim como oxalacetato a partir do ácido aspártico.

A selecção e a mutação de microrganismos a partir da série de E. coli, Paracoccus denitrificans, Torula, Rhodotorula e Streptomyces para a preparação de L-fenil-alanina a partir de ácido fenil-pirúvico com um rendimento melhorado é descrita no pedido de Patente Alemã DE 3 423 936.

Os aminoácidos não existentes na natureza, chamados aminoácidos não proteinogénicos, não são preparados por biotransformação enzimática até hoje.

A Requerente descobriu agora que a síntese dos minoácidos não proteinogénicos L-terciária-leucina e L-fosfino-tricina com muito bom rendimento com o auxílio da trans-aminação. Isso é muito surpreendente porque, na verdade, se sabia que não se podia esperar sintetizar diferentes aminoá

cidos naturais proteinogénicos por causa da especificidade das enzimas e que igualmente não se poderiam preparar aminoácidos não proteinogénicos com α-cetoácidos não existentes na natureza como produtos intermediários prévios por este processo. Por esse motivo, é surpreendente que os correspondentes produtos intermediários não obstante o seu radical hidrofóbico que não se encontra nos compostos intermediários prévios para aminoácidos, sejam tolerados pelo centro activo da trans-aminase e sejam feitos reagir.

A invenção refere-se a um processo para a preparação de L-ter.-leucina e de L-fosfinotricina que se caracteriza pelo facto de se trans-aminar o ácido 3,3-dimetil--2-oxo-butanóico e o ácido (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfínico ou os correspondentes sais em presença de dadores de grupos amino.

Em seguida, esclarece-se detalhadamente a invenção e define-se nas reivindicações da patente.

Enzimas de inúmeros organismos, por exemplo, de microrganismos, plantas e órgãos de animais, como por exemplo do coração de porcos, estão em posição de transformar α-ceto-ácidos em L-aminoácidos naturais por trans-aminação. De acordo com a presente invenção, podem-se empregar estes organismos ou as suas enzimas. De preferência, no entanto trabalha-se com microrganismos que possuem uma trans-aminase como, por exemplo, microrganismos das espécies Paracoccus, Alkaligenes, Rhizobium, Pseudomonas, Serratia, Agrobacterium, Streptomyces assim como Enterobactérias. São especialmente vantajosos microrganismos como por exemplo Alicaligenes faecalis DSM 4115, Alcaligenes denitrificans DSM 4114, Pseudomonas paucimobilis DSM 4120, Pseudomonas spec. DSM 4119, Serratia plymuthica DSM 4116, Agrobacterium tumefaciens, Escherichia coli DH1, Escherichia coli ATCC 11303, Enterobacter agglomerans DSM 4121, Paracoccus denitrificans DSM 65, Streptomyces hygroscopicus e Streptomyces viridochromogenes assim como 3 microrganismos isolados do solo DSM 4113, DSM 4117 e DSM 4118. Estes microrganismos foram depositados na Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM) (Colecção Alemã de Microrganismos) sempre que eles não tenham sido obtidos livremente ou descritos.



Podem-se obter maiores actividades enzimáticas se se seleccionarem estirpes que são resistentes contra fosfino-tricina ou utilizam fosfinotricina como fonte de azoto exclusiva, por exemplo, Alcaligenes faecalis DSM 4115, Agrobacterium tumefaciens assim como o microrganismo isolado do solo DSM 4113. Isto é vantajoso muito embora não seja absolutamente necessário. Igualmente, por selecção e mutação, de maneira em si conhecida se escolhem microrganismos resistentes contra quantidades crescentes de ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico, ácido fenil-pirúvico e ácido (3-carboxi-3-oxo-propil)--metil-fosfínico ou os seus sais no meio de cultura para posteriores trabalhos que realizam a trans-aminação com melhores rendimentos em virtude da sua adaptação ao α-ceto-ácido. O ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico ou os seus sais podem-se obter facilmente por saponificação de ácido trimetil-acético em presença de cloreto de tionilo e de KCN de acordo com métodos clássicos. A preparação de ácido (3-carboxi-3-oxo-propil)--metil-fosfínico e dos seus sais realiza-se igualmente de acordo com métodos conhecidos (Hans Beyer, Lehrbuch der organischen Chemie, S. Hirzel Verlarg, Stuttgart, Alemanha).

Obtêm-se bons rendimentos se, no processo de acordo com a presente invenção, se empregarem microrganismos manipulados por tecnologia genética. De maneira especialmente preferida trabalha-se com E.coli ATCC, que se transformou com um plasmídio que contém tyrB-Gen ou IlvE-Gen, em que o tyrB-Gen codifica para a trans-aminase aromática e ilvE para a trans-aminase alifática respectivamente em E. coli. As estirpes manipuladas deste modo podem-se por exemplo de acordo com o pedido de Patente Alemã P 36 31 829.9 ou P 36 36 722.2.

A trans-aminação pode realizar-se simultâneamente com a cultura, em que de preferência com microrganismos que são resistentes a fosfinotricina, por exemplo, Alcaligenes faecalis DSM 4115 e Agrobacterium tumefaciens. Os microrganismos no entanto são desenvolvidos vantajosamente num meio nutritivo óptimo para o seu desenvolvimento sob correspondentes condições favoráveis de temperatura e de arejamento até se obter um peso seco desde cerca de 4 até 60 gramas por li-

tro de solução nutritiva. As condições favoráveis para cada um dos microrganismos ou são conhecidos pelos peritos no assunto ou podem ser estabelecidas por meio de ensaios prévios simples. As células são então empregadas para a aminação dos α-ceto-ácidos na solução ou depois de separadas da solução nutritiva. A trans-aminação pode realizar-se com células completas ou também com células abertas, em que se utilizam os métodos habituais de abertura de células. É igualmente possível realizar a trans-aminação com extractos de células, com proteínas totais isoladas assim como com trans-aminase purificada. Por razões de ordem prática, por exemplo, por motivo de custos, trabalha-se no entanto com células intactas. No entanto, pode igualmente ser vantajoso realizar o isolamento da enzima por causa de se conseguir um maior tempo de duração da trans-aminase assim como uma melhor possibilidade de regulação da reacção. É ainda possível empregar os microrganismos ou as enzimas sob a forma fixada. Para a fixação interessam os processos conhecidos, vantajosamente, os métodos de acordo com as memórias descritivas publicadas para inspecção pública das Patentes Alemãs Nº. 32 37 341 e Nº . 32 43 591.

Os microrganismos ou o sistema de enzima isolado, de acordo com a forma de realização preferida, são suspensos num tampão fisiológico de modo que a sua actividade de trans-aminação não seja influenciada negativamente de maneira digna de nota, sob adição do α-ceto-ácido e do dador de grupos amino.

De acordo com cada quantidade dos microrganismos, a actividade enzimática proporcionada à mistura sob a forma de microrganismos ou do sistema enzimático isolado pode variar dentro de largos limites. Convenientemente, ela fica compreendida entre 10 e 20 000 μmole/minuto.litro. De preferência, a mistura contém quantidade de células com uma actividade enzimática de 1500-2000 μmole/minuto. litro.

Como dadores de grupos amino utilizam-se aminoácidos. Qual o aminoácido a empregar vantajosamente depende fundamentalmente do microrganismo ou do sistema enzimático isolado, o que pode ser estabelecido em curtos ensaios prévios. São especialmente apropriados a valina, leucina, iso-



leucina, metionina, tirosina e fenil-alanina, em especial, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutâmico e glicina. Estes aminoácidos são empregados sob a forma L porque só esta forma é aproveitada de acordo com a presente invenção, como ácido livre ou como sal apropriado (correspondentemente ao meio utilizado).

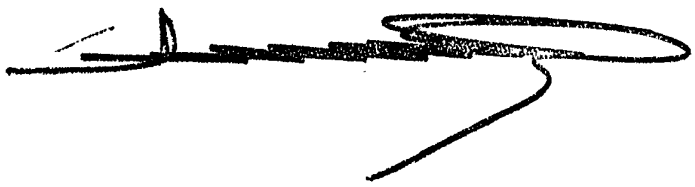
Para a preparação de L-terc.-leucina parte-se de ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico, enquanto para a preparação de L-fosfino-tricina como α-ceto-ácido utiliza-se ácido (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfínico. Podem-se também utilizar os seus sais, escolhendo-se naturalmente os iões que não influenciam negativamente a actividade de trans-aminação de maneira digna de nota. Os preferidos são os sais de sódio, de potássio e de amónio. O dador de grupos amino é adicionado em quantidades equimolares ou em excesso em relação ao α-ceto-ácido. Deram resultados especialmente bons proporções de 1 : 1 até 5 : 1, de maneira vantajosa, 1 : 1 até 2 : 1.

A adição dos componentes da reacção à mistura reaccional pode efectuar-se sob a forma de solução em água por adição das substâncias sólidas simultâneamente. Prefere-se, no entanto, uma adição escalonada ou continuamente em quantidades de 0,1 - 4,5 %, em especial, 0,2 - 2%, em cacada caso em relação ao peso da mistura reaccional, durante um intervalo de tempo de 1 - 90 horas, de preferência, 2 - 40 horas.

De maneira vantajosa, trabalha-se a um valor de pH compreendido entre 5 e 9, em especial, entre 7 e 8,5. É, além disso, conveniente realizar a trans-aminação num intervalo de temperatura de 10 - 65ºC, em especial, 20 até 50ºC. Às temperaturas baixas, a reacção enzimática realiza-se de maneira progressivamente mais lenta, enquanto a temperaturas mais altas a enzima é desactivada.

A maneira de proceder mais favorável depende do respectivo microrganismo e pode estabelecer-se facilmente por meio de ensaios prévios simples.

Deu especialmente bom resultado permeabilizar os microrganismos antes ou durante a reacção de trans



-aminação. Isso pode realizar-se por adição de reagentes apropriados tais como tolueno, brometo de cetil-trimetilamónio, sulfóxido de dimetilo, etc., ao meio de incubação.

Os seguintes exemplos servem para ilustrar melhor a presente invenção. As indicações das percentagens referem-se a peso, quando não se indica outra referência.

EXEMPLO 1

Cultura e processamento dos microrganismos

Cultivaram-se as bactérias que depositadas e se podem obter livremente em 400 mililitros de cultura líquida em meio de LB [meio de Luria-Bertani: 10 gramas de tripton Bacto/5 gramas de extracto de levedura Bacto/10 gramas de NaCl por litro, (pH 7,5)] ou meio mínimo M9 [6 gramas de Na_2HPO_4/3 gramas de KH_2PO_4/0,5 grama de NaCl/1 grama de NH_4Cl/2 mililitros de $MgSO_4$ 1 molar + 10 mililitros de glucose a 20% + 0,1 mililitro de $CaCl_2$ 1 molar + 1 mililitro de vitamina B1 (tiamina) a 1% por litro (pH 7,4)] a 30ºC (todas as bactérias diferentes de E.coli) ou a 37ºC (E.coli, DH1) durante a noite.

Em seguida, separaram-se as bactérias por centrifugação e lavaram-se os sedimentos das células por várias vezes com Na_2HPO_4 10 milimolar e NaCl 10 milimolar (pH = 7,0) (tampão de lavagem) e, por fim, suspendeu-se em 5 mililitros de tampão de lavagem por 3 gramas de sedimento de células. As células foram abertas por exposição a ultrassons de 1 minuto por 5 vezes e, em seguida, centrifugaram-se os resíduos das células. Os sobrenadantes do lisado assim obtidos podem ser guardados a -20ºC durante vários meses.

EXEMPLO 2

Isolamento das proteínas

Para o isolamento das proteínas, diluiram-se 5 mililitros dos sobrenadantes do lisado com tampão de lavagem até se perfazer 50 mililitros e precipitaram-se as proteínas por adição de sulfato de amónio a 65 por cento. Depois da separação por centrifugação durante 15 minutos a

10 000 g, ressuspenderam-se os sólidos de proteína em cada 5 mililitros de Na_2HPO_4 10 milimolar (pH 7,0), EDTA 1 milimolar, 2% de glicerina e ditiotreitol (DTT) 1 milimolar. Esta suspensão pode igualmente ser guardada a -20ºC. Para se conseguir um melhor efeito de purificação, as proteínas foram precipitadas parcialmente por duas vezes com sulfato de amónio.

As determinações das proteínas realizaram-se de acordo com o método de biureto. O teor de proteína determinado nas preparações acima referidas de acordo com este processo está, na sua maior parte, compreendida entre 5 e 10 mg/ml. Para a purificação parcial das trans-aminases provenientes de Alcaligenes faecalis DSM 4115 e de DSM 4113, precipitaram-se fraccionadamente as proteínas com sulfato de amónio a 25% até 75%, adicionado respectivamente em degraus de 10% e ensaiaram-se as fracções individuais relativamente à actividade de trans-aminase (veja-se abaixo). As fracções das proteínas com a maior actividade específica foram aplicadas a uma coluna de filtração de gel contendo Sephadex G 100 e eluídas com Na_2HPO_4 10 milimolar (pH 7,0). As fracções do eluído com a maior actividade específica de trans-aminase foram concentradas por nova precipitação com sulfato de amónio e retomou-se na proporção de 5 mg/ml com Na_2HPO_4 10 milimolar (pH 7,0), EDTA 1 milimolar, 2% de glicerina e DTT 1 milimolar. Os pesos moleculares das fracções da coluna de polidextrano (® Sephadex G 100) foram determinados por comparação com proteínas de peso molecular padrão. A pureza das fracções isoladas de trans-aminase isoladas pode ser examinada por electroforese de amostras de proteína em geles de SDS/poliacrilamida.

EXEMPLO 3

Ensaios de síntese de fosfinotricina em culturas líquidas

Cultivaram-se culturas de 5 mililitros cada uma da estirpe de bactérias em meio LB com 3 gramas/litro de ácido L-glutâmico (20 como única fonte de N e 2 gramas/litro (10 milimolar) de (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfinato de sódio a 30ºC. Depois de 1 e de 2 dias, retiraram-



-se amostras de 1 mililitro e mataram-se as células das bactérias por aquecimento a 95ºC durante 20 minutos. Depois da centrifugação, retomaram-se os sobrenadantes e ensaiaram-se relativamente à formação de fosfinotricina num analisador de aminoácidos. O Alcaligenes faecalis DSM 4115 tinha reagido com o substracto de maneira a obter-se 0,3 grama/litro de L-fosfinotricina (15% de rendimento em relação ao α-ceto-ácido). Depois de 48 horas, obtêm-se 5 gramas por litro de L-fosfinotricina (25% de rendimento).

EXEMPLO 4

Ensaios de trans-aminase com extractos de células e isolatos de proteínas

Os sobrenadantes do lisado e proteínas totais isoladas das bactérias assim como as fracções de trans-aminase enriquecidas de Alcaligenes faecalis DSM 4115 e de DSM 4113 foram reguladas a um teor de Proteína compreendido entre 20 e 60 mg/ml com Na_2HPO_4 10 milimolar e NaCl 10 milimolar (pH 7,0) e incubaram-se na mistura padrão com ácido L-glutâmico 80 milimolar dador de NH_2 e (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfinato de sódio 20 milimolar a 30ºC. De acordo com as condições de realização do ensaio retiraram-se amostras de 100 μlitros entre 0 e 24 horas de tempo incubação, desnaturaram-se as proteínas a 95ºC durante 10 minutos, centrifugaram-se e submeteram-se os sobrenadantes da reacção num analisador de aminoácidos a ensaio de fosfinotricina.

As misturas reaccionais de controlo não continham aminoácidos nem (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfinato de sódio ou forma realizadas com proteínas desactivadas pelo calor (10 minutos a 95ºC).

Por adição de hidroxilamina 10 milimolar como agente inibidor específico da trans-aminase, suprimiu-se completamente a formação de fosfinotricina.

As actividades específicas de trans-aminase e fosfinotricina foram expressas em nmoles de fosfinotricina formada por mg de proteína e por hora. As reactividades de trans-aminase foram indicadas em micromoles de fosfinotricina por minuto e mg de proteína ou litro (U/mg de pro-



teína; U/litro). 1 unidade (U) corresponde a 1 μmole de L-fosfinotricina/minuto.

a) Síntese de L-Fosfinotricina (PTC) com lisado - -sobrenadantes (impurificado)

Estirpes	Actividades das enzimas	Rendimentos em L-PTC(depois de 20 horas de tempo de reacção): Concentrações de partida:12 gramas /litro de L-glutamato, 4 gramas/litro de C-ceto-PTC)	Taxas de reacção(depois de 20 horas de tempo de reacção)
Alcaligenes faecalis DSM 4115	0,1 U/mg de proteína (2500 U/litro)	3,6 gramas/litro	90%
DSM 4113	0,04 U/mg de proteína (2000 U/litro)	3,8 gramas/litro	95%
E.coli(DH1)	0,02 U/mg de proteína (900 U/litro)	3,2 grama/litro	80%

b) Síntese de L-PTC com proteínas totais isoladas (purificada com $(NH_4)_2SO_4$)

Estirpe	Actividades das enzimas	Rendimentos em L-PTC (ver 4ª)	Taxas da reacção (ver 4ª)
Alcaligenes faecalis DSM 4115	0,05 U/mg de proteína 1000 U/litro	3,8 gramas/litro	95%
E.coli(DH1)	0,01 U/mg de proteína 500 U/litro	3,6 gramas/litro	90%

c) Síntese de L-PTC com enzima trans-aminase purificada

Estirpe	Actividades das enzimas	Rendimentos em L-PTC (ver 4ª)	Taxas de reacção (ver 4ªa)
Alcaligenes faecalis DSM 4115	0,5 U/mg de proteína 10 000 U/litro	3,9gramas/litro	97,5%
DSM 4113	0,2 U/mg de proteína 6000 U/litro	3,8gramas/litro	95%

EXEMPLO 5

Ensaios sobre a estereo-selectividade da síntese de fosfinotricina

Ensaiou-se a estereo-especificidade da formação de fosfinotricina por trans-aminação por meio da reacção de N-acetil-transferase.Esta enzima foi detectada nalgumas bactérias do solo (por exemplo, pedido de Patente Alemã P 36 28 747.4) e pode isolar-se de acordo com métodos conhecidos. Ela reage estereo-especificamente apenas com L--fosfinotricina, que se transforma quantitativamente no correspondente derivado de N-acetilo numa reacção de acetilo dependente de CoA.

No ensaio, incubaram-se sobrenadantes da reacção do Exemplo 4, nas quais fosfinotricina se formou por trans-aminação, com proteína de Alcaligenes faecalis DSM 4115 (1mg/ml) e CoA acetilo 10 milimolar a 30ºC durante 5 horas. Os sobrenadantes da reacção são de novo ensaiados no analisador de aminoácidos relativamente à fosfinotricina que não reagiu.

A fosfinotricina formada enzimaticamente por trans-aminação não pôde ser completamente degradada por reacção com N-acetil-transferase. Isso demonstra a estereo--selectividade da trans-aminação. Forma-se L-fosfinotricina pura.

EXEMPLO 6

Selecção de Escherichia coli ATCC 11303

Cultivou-se Escherichia coli ATCC 11303



de acordo com o método convencional e mutagenizou-se com N--metil-N-nitroguanidina (MNG)de acordo com E. Adelberg et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 18, 788 (1965). As células tratadas com MNG foram colocadas em agar aquecido em autoclave com a seguinte composição:

Ácido fumárico	5 gramas /litro
Extracto de carne	20 gramas /litro
Ácido aspártico	20 gramas /litro
KH_2PO_4	2 gramas /litro
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,5 gramas/litro
$CaCl_2 . 2 H_2O$	0,1 grama /litro
Agar	20 gramas /litro

Regulou-se a pH 7,2 com lixívia de hidróxido de sódio.

No agar ainda quente despejou-se uma solução de piruvato de fenilo esterilizada por filtração de maneira a atingir-se uma concentração final de 24 gramas/litro de piruvato de fenilo. As placas foram incubadas a 37ºC durante 4 dias. Isolaram-se as colónias com um diâmetro $>$ 1 mm. 20% das estirpes em desenvolvimento tinham uma maior actividade de trans-aminação maior do que a estirpe de partida.

A determinação da actividade de trans--aminase foi realizada com kit de ensaio Sigma G 0390.

EXEMPLO 7

a) Isolamento e utilização do cosmídio pIMS 6026 de E. coli

O cosmídio pIMS6026 deriva do cosmídio pLAFRI (ATCC 37167) em que se clonou o fragmento EcoRI corrente no comércio nalguns dos seus sítios de corte com EcoRI, sobre o qual se aplicou o gene da resistência a canamicina da transposão Tn 903 (Pharmacia, Upsala, Suécia). Por digestão com BamHI e subsequente religação separaram-se a maior parte do fragmento EcoRI existente à venda no comércio de maneira que apenas uma curta peça de DNA se conservasse como inserção, em que um sítio de corte com BamHI é flanqueado por dois



sítios de corte com EcoRI.

Para o isolamento do cosmídio pIMS 6026 a partir de E. coli HB101, realizou-se ou a maneira de proceder de acordo com Humphreys et al. [Biochem. Biophys. Acta 383, 457-463 (1975)] ou uma lise alcalina de acordo com Birnboim e Doly [Nucleic Acids Res. 7 1513 (1979)] em escala 10 vezes maior. Em qualquer caso o DNA-plasmídio foi purificado pelo menos uma vez por centrifugação com CsCl/EtBr em gradiente de concentração.

O cosmídeo pIMS 6026 foi completamente digerido com a enzima de restrição BamHI, tendo-se procedido de acordo com as indicações do fabricante, New England Biolabs. Para verificar se esta digestão estava completa, retirou-se uma amostra da mistura de restrição e colocou-se sobre um gel de agarose a 0,8 % e submeteu-se a electroforese. O aparecimento de apenas uma banda depois de tingimento com brometo de etídio e iluminação com luz ultravioleta de comprimento de onda curto (254 nm) demonstrou que a digestão tinha sido completa. A enzima de restrição foi eliminada do cosmídio -DNA digerido por fenolização, precipitou-se o DNA por meio de etanol, lavou-se com etanol a 70 por cento e, depois de secar sob vácuo, retomou-se num volume apropriado de tampão de TE (tris 10 milimolar, EDTA 1 milimolar, pH 8,0). Se assim se escolher, realizou-se ainda um tratamento com fosfatase alcalina de acordo com as indicações do fabricante,a firma Boehringer Mannheim. Depois de se adicionar 1 microlitro de fosfatase alcalina (CIP),incubou-se a 37ºC durante 30 minutos, eliminou-se a enzima da mistura reaccional por fenolização e purificou-se o DNA como se descreveu anteriormente. Finalmente, ressuspendeu-se em tampão TE.

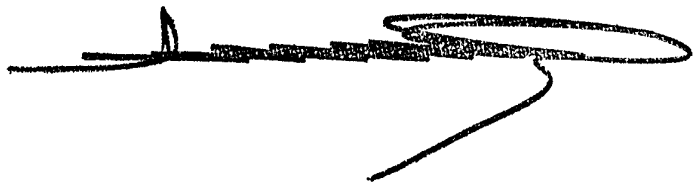
b) Digestão parcial do DNA de E. coli ATCC 11303



Realizou-se o isolamento do DNA total de E.coli ATCC 11303 de acordo com o método de Marmur em J. Mol. Biol. 53, 155 - 162, (1961). O DNA total isolado foi parcialmente digerido com a enzima de restrição Sau3A de modo que se obtivessem principalmente fragmentos com uma gama de tamanhos de 20 - 30 kb. Para isso, em ensaios prévios, determina-se a proporção óptima entre DNA e a enzima bem assim como a duração óptima de actuação da enzima sobre DNA. A correspondente maneira de proceder é descrita na revista publicada pela firma BRL "focus", Volume 7, Número 2 (1985), página 3. Depois de decorrido o tempo de reacção que se determinou ser o tempo óptimo, destruíu-se a enzima por aquecimento a 65ºC durante um intervalo de tempo de 10 minutos e ensaiou-se a formação de fragmentos de DNA com a gama de tamanhos pretendida por electroforese em gel de agarose com marcadores de DNA apropriados, por exemplo, DNA digerido com EcoRI do fago λ .

c) Ligação das composições de restrição

Misturou-se DNA total digerido parcialmente com Sau3A de E. coli ATCC 11303 com pIMS 6026 cosmídio-DNA que foi completamente separado com BAMHI e se tratou com fosfatase alcalina, numa proporção molar igual a cerca de 1 : 5. A mistura resultante misturada com um tampão concentrado vários vezes de acordo com as indicações fornecidas por New England Biolabs de maneira a obter-se uma concentração iónica óptima para a enzima T4-DNA-Ligase e incubou-se com 1 microlitro da enzima a 16ºC durante pelo menos 14 horas. O volume total da mistura foi neste caso igual a 50 μlitros com uma concentração de DNA total de 20 μg/ml.



d) Empacotamento em λ-fagos

Depois de realizada a reacção com a ligase, o DNA obtido de acordo com o Exemplo 3 foi embalado in vitro nas cabeças de λ-fagos. Os extractos necessários para isso podem ser obtidos a partir de duas estirpes de bactérias diferentes de acordo com B. Hohn, em R. Wu, editor, Recombinant DNA, Methods in Enzymology, Volume 68, Academic Press, Nova Iorque, pág. 299-309 (1979) ou são vendidos por Boehringer Mannheim ou Amersham Buchler, Braunschweig.
3 microlitros da mistura obtida de acordo com o Exemplo 3 foram misturados a fundo com extractos de bactérias fundidos imediatamente antes sob arrefecimento com gelo. Incubou-se a mistura a 20ºC durante 30 - 60 minutos e, em seguida, adicionaram-se 200 microlitros de tampão de SM (NaCl 100 milimolar, $MgSO_4$ 10 milimolar, tris-HCl 50 milimolar (pH 7,5), gelatina 0,01%). Esta mistura foi empregada ou directamente numa reacção de transdução ou foi guardada depois da adição de 10 microlitros até posterior utilização, a 4ºC.

e) Transdução de E. coli DG 30

Adicionou-se 0,4% de maltose a 5 mililitros de caldo L que consiste em 1% de tripton Bacto, 0,5 % de extracto de levedura e 0,5% de NaCl e vacinou-se com 50 microlitros duma cultura líquida de E. coli DG 30 na fase de desenvolvimento estacionária. Incubou-se a 37ºC durante 12 horas até se ter atingido a prematura fase estacionária. As bactérias foram separadas por centrifugação e cuidadosamente ressuspensas em 2,5 mililitros duma solução aquosa que era 10 milimolar em $MgCl_2$. Misturaram-se 10 microlitros da mistura de acordo com o Exemplo 4 com 20 microlitros

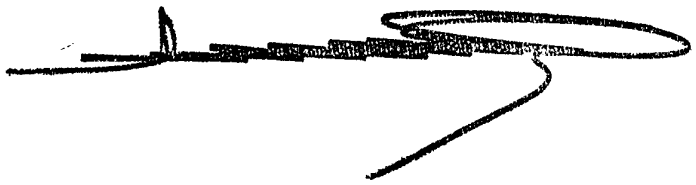


da suspensão de células concentrada e incubou-se à temperatura ambiente durante 50 minutos.

Em seguida, adicionou-se 200 microlitros de caldo L e incubou-se a 37ºC durante 1 hora, agitando ocasionalmente a mistura por sacudimento. Placaram-se respectivamente 50 microlitros da mistura sobre agar/caldo-L que continha 20 µg/ml de tetraciclina.
As placas foram cultivadas a 37ºC durante pelo menos 12 horas. De acordo com a maneira de proceder descrita foi possível obter-se em média 1000 colónias a partir duma mistura reaccional.

f) <u>Seleccionamento de E.coli DG com um gene-aspC ou com um gene-ilvE ou com gene tyrB.</u>

Repicaram-se sobre agar mínimo à volta de 800 colónias que foram obtidas por transdução de E. coli DG 30 de acordo com o processo descrito em agar com caldo-L que continha 20 µg/ml de tetraciclina. O agar mínimo consistia em meio M9 com glucose (Miller, Experiments im Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, 1972) que foi suplementado com os aminoácidos isoleucina, leucina, valina, ácido aspártico e fenil-alanina. O aminoácido tirosina, que a estirpe DG 30 não pode sintetizar igualmente, não foi no entanto adicionado ao meio. Das 800 colónias repicadas, 7 desenvolveram-se no meio mínimo.
Para a diferenciação dos três genes possíveis aspC, ilvE e TyrB em E. coli 30, estas 7 colónias foram de novo repicadas sobre o mencionado meio mínimo que foi suplementado com os mencionados aminoácidos até respectivamente uma apresentar substracto-especificidade para uma das trans-aminases que é codificada por um dos genes. O resultado está indicado na seguinte Tabela.



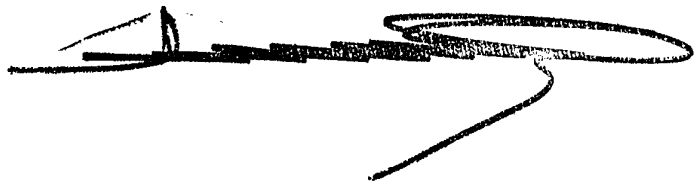
Clono no meio mínimo suplementado até provável

	Asp	Leu	Ile	Tyr	Gene
1	+	+	-	+	tyrB
2	+	+	-	+	tyrB
3	-	+-	+	+-	ilvE
4	-	+-	+	+-	ilvE
5	+	+	-	+	tyrB
6	+	+	-	+	tyrB
7	-	+-	+	+-	ilvE

\+ = bom desenvolvimento
+- = mau desenvolvimento
\- = ausência de desenvolvimento

g) Localização do gene tyrB

Por minilise de acordo com Maniatis et al.,Cold Spring Harbor, pág. 366 - 370 (1982), obteve-se o cosmídio -DNA dos clonos 1 a 7 que se obtiveram de acordo com o Exemplo 6. Em seguida, represou-se este cosmídio-DNA em E. coli DH1 (ATCC 33849) a partir do qual pode ser de novo reisolado com bons rendimentos.
Obteve-se plasmídio-DNA que foi obtido primitivamente a partir de clono 3 de E. coli DG 30 (ver Exemplo 6), a partir do qual se isolou com esta estirpe de E.coli DH1 com DNA transformado e digeriu-se completamente com as enzimas de restrição SaII e SmaI, seguindo as indicações do fabricante, New England Biolabs. De igual maneira, digeriu-se completamente o vector pAT 153 com ClaI, que se submeteu em seguida a um tratamento com fosfatase alcalina. Adicionaram-se os dois DNA, ligaram-se um com o outro procedendo como já se descreveu no Exemplo 4 e transformaram-se as células competentes da estirpe E.coli



ATCC 11303 com uma alíquota da mistura de ligase, por exemplo, 10 microlitros.
Seleccionaram-se as colónias residuais em placas de caldo L que continham 50 µg/ml de Ampicilina e ensaiaram-se por "placagem de réplica" sobre placas de caldo L com 20 µg/ml de tetraciclina sobre a inactivação de marcadores e por consequência integração. Das colónias que possuíam o fenotipo AprTcs, isolou-se plasmídio-DNA por minilise e ensaiou-se a existência de fragmentos ClaI no vector pAT153 por digestão completa com a enzima de restrição ClaI.

h) Ensaio da actividade de trans-aminase

Os clones obtidos de acordo com o Exemplo 7 foram ensaiados por meio do Ensaio APPAT (Ensaio de aspartato-fenilpiruvato-aminotransferase, Sigma Testkit GO390, em que o α-cetoglutarato foi substituído por fenilpiruvato) relativamente à actividade da trans-aminase aromática, ou seja, do produto genético de tyrB. Como comparação serviu a estirpe de partida E.coli ATCC 11303 não transformada. Dessa forma, foi possível num caso medir um nítido incremento da actividade tyrB e, na verdade, do factor 5 até 10, em relação à estirpe de partida E.coli ATCC 11303.
Por electroforese em gel de agarose, com utilização de marcadores apropriados, foi possível verificar-se que, na estirpe que possuía uma elevada actividade genética tyrB, estava contido um vector pAT 153 que continha incorporado um fragmento ClaI com um tamanho de cerca de 2,7MD. Se se transformar de novo a estirpe E. coli ATCC 11303 sem plasmídio com o plasmídio-DNA isolado, então foi possível observar-se em cada caso um aumento da actividade genética tyrB de um factor de 5 - 10.



A transformação de E.coli ATCC 11303 com o gene ilV realiza-se procedendo de maneira análoga.

EXEMPLO 8

Preparação de L-terc.-leucina

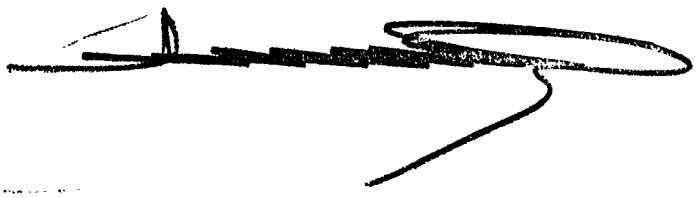
a) Cultivou-se uma estirpe de Escherichia coli ATCC 11303 seleccionada de acordo com o Exemplo 6 na seguinte solução nutritiva:

Ácido fumárico	10 gramas/litro
Extracto de carne	20 gramas/litro
Ácido aspártico	8 gramas/litro
KH_2PO_4	2 gramas/litro
$MgSO_4.7\ H_2O$	0,5 grama/litro
$CaCl_2.2\ H_2O$	0,1 grama/litro
Ácido 3,3-dimetil-2-oxo--butanóico	4 gramas/litro

Regulou-se a pH 7,4 com lixívia de hidróxido de sódio.

Depois de 48 horas de desenvolvimento a 37ºC, separam-se as células por centrifugação. No sobrenadante, determinou-se a presença de 0,9 gramas/litro de ácido L-2-amino-3,3-dimetil-butanóico (leucina terciária) com utilização do ensaio de cromatografia em fase líquida sob alta pressão numa coluna RPC-8 (fase móvel:gradiente de acetato de Na 100 milimolar (pH 7,2) e metanol).

b) Cultivou-se material celular como se descreveu no Exemplo 8 e incubou-se com agitação por sacudimento numa solução de 10 gramas/litro de ácido aspártico, 4 gramas/litro de ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico em 10 milimoles/litro de tampão de tris.HCl (pH 7,4). Depois de 24 horas a 37ºC foi possível determinar-se o teor de 1,9 gramas/litro de ácido L-2-amino-3,3-dimetil-butanóico.



EXEMPLO 9

Preparação de L-fosfinotricina

Cultivou-se material celular como no Exemplo 8, muito embora se tenha empregado 4 gramas/litro de dimetilpiruvato em vez do ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico. Depois de decorrer 48 horas, as células foram separadas por centrifugação, lavadas com tampão e incubadas numa solução aquosa contendo 4 gramas/litro de (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil--fosfinato de sódio e 8 gramas/litro de sal de sódio de ácido aspártico em solução de 10 milimoles/litro de tris/HCl (pH 7,4) a 37ºC durante 24 horas. Em seguida separaram-se as células por centrifugação e determinou-se a quantidade formada de L-fosfinotricina existente no sobrenadante por análise por cromatografia em fase líquida de alta pressão. Foi possível determinar 3,2 gramas/litro de fosfinotricina.

EXEMPLO 10

Preparação de L-fosfinotricina com bactérias recombinantes

Fermentou-se uma estirpe de E.coli proveniente do Exemplo 7 com actividade de trans-aminase codificada por plasmídio ilvE na seguinte solução nutritiva:

Glucose	5 gramas por litro
Na_2HPO_4	3,5 gramas por litro
$K\ H_2PO_4$	1,8 gramas por litro
$(NH_4)_2HPO_4$	12 gramas por litro
$(NH_4)_2SO_4$	6 gramas por litro
$MgSO_4$	0,2 grama por litro
Extracto de levedura	1 grama por litro

Regulou-se a pH igual a 7,0 com NaOH.

Depois de 4 horas, começou-se o desenvolvimento com uma alimentação exponencial de glucose entre 0,5 e 20 gramas/litro/hora. Depois de 16 horas de desenvolvimento, as células tinham um peso seco de 20 gramas/litro e uma actividade de trans-aminase igual a 15 000 micromoles/minuto/litro. As células foram utilizadas directamente sem outra operação posterior de lavagem numa mistura reaccional com o volume de



100 mililitros. A mistura reaccional contém num tampão com 10 milimoles por litro de tris/HCl (pH 7,4) 1500 micromoles/ /minuto/litro de actividade de trans-aminase, 0,1 ml de mono--oleato de polioxietileno-sorbitano (® Tween 80), 90 milimoles/litro de (3-carboxi-3-oxo-propil)-metil-fosfinato de sódio e 200 milimoles /litro de ácido glutâmico e foi ligeiramente sacudida a 37ºC. Depois de 24 horas, as células foram separadas por centrifugação e no sobrenadante determinou-se a L-fosfinotricina por cromatografia em fase líquida sob alta pressão. Determinaram-se 70 milimoles/litro de L-fosfinotricina.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

-1ª.-

Processo para a preparação de L-terc.--leucina e de L-fosfinotricina, caracterizado pelo facto de se trans-aminar, respectivamente, ácido 3,3-dimetil-2-oxo-butanóico ou ácido 3-carbóxi-3-oxopropil)-metil-fosfónico ou os sais destes compostos, na presença de aminoácidos como dadores de grupos amino.

-2ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se fazer com o auxílio de microrganismos.

-3ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se efectuar com o auxílio de microrganismos das espécies Paracoccus, Alcaligenes, Pseudomonas, Serratia, Agrobacterium e Streptomyces

assim como Entebacter.

-4ª.-

Processo de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se efectuar com o auxílio de Alcaligenes faecalis DSM 4115, Alcaligenes denitrificans DSM 4114. Pseudomonas paucimobilis DSM 4120, Pseudomonas spec. 4119, Serratia plymuthica DSM 4116, Agrobacterium tumefaciens, Escherichia coli DH1, Escherichia coli ATCC 11303, Enterobacter agglomerans DSM 4112, Enterobacter spec. DSM 4121, Paracoccus denitrificans DSM 65,Streptomyces viridochromogenes assim como três microrganismos isolados do solo DSM 4113, DSM 4117 e DSM 4118.

-5ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se realizar com o auxílio de microrganismos manipulados por tecnologia genética.

-6ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se realizar com o auxílio de E. coli ATCC 11303 que é transformado com um plasmídio que contém um tyrB-Gen ou um IlvE-Gen.

-7ª.-

Processo de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se efectuar com extractos de células, proteínas totais isoladas ou trans-aminases purificadas.

-8ª.-

Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo facto de se empregar o dador de grupos amino e α-cetoácido numa proporção compreendida entre 1 : 1 e 5 : 1.

-9ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de se empregar o dador de grupos amino e ácidoα-cetoácido numa proporção compreendida entre 1 : 1

e 2 : 1.

-10ª.-

Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo facto de a transaminação se efectuar a um valor de pH compreendido dentro no intervalo de 5 a 9.

-11ª.-

Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo facto de a trans-aminação se efectuar a um valor de pH compreendido dentro do intervalo de 7 a 8,5.

A requerente declara que o primeiro pedido desta patente foi depositado na República Federal Alemã, em 4 de Junho de 1986, sob o nº P 36 18 812.3.

Lisboa, 3 de Junho de 1987.



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE L-TERC.-LEUCINA E DE L-FOSFINOTRICINA POR TRANS-AMINAÇÃO"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de L-terc.-leucina e de L-fosfinotricina compreendendo trans-aminar-se, respectivamente ácido 3,3-dimetil-2--oxo-butanóico ou ácido (3-carbóxi-3-oxo-propil)-metil-fosfínico ou os sais destes compostos em presença de aminoácidos como doadores de grupos amino e com o auxílio de microrganismos, nomeadamente das espécies DSM (colecção Alemã de Microrganismos) 4115, DSM 4114, DSM 4120, DSM 4119, DSM 4116, DSM 4122, DSM 4121, DSM 4113, DSM 4117 e DSM 4118 assim como as suas mutações e variações.