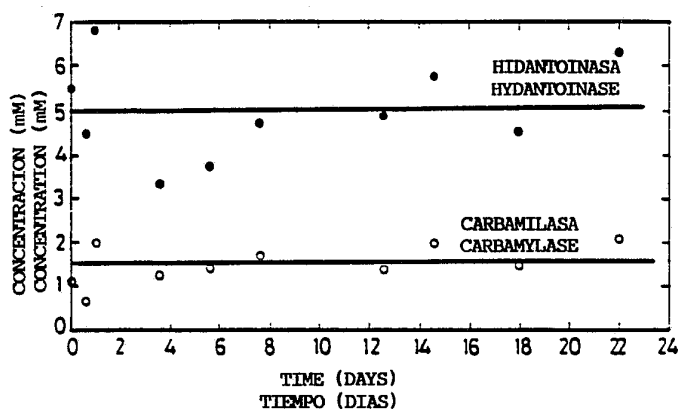


Publicada
Con informe de búsqueda internacional.
Antes de la expiración del plazo previsto para la modificación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente si se reciben tales modificaciones.

(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE D-AMINOACIDOS O DERIVADOS DE D-AMINOACIDOS



The present invention relates to a new method for the preparation of D-aminoacids or derivatives of D-aminoacids from the racemic mixture of the corresponding hydantoin using cells of *Agrobacterium radiobacter* immobilized by inclusion into natural polymer gels.

La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo para la preparación de D-aminoácidos o derivados de D-aminoácidos, a partir de la mezcla racémica de la hidantoína correspondiente empleando células de *Agrobacterium radiobacter* inmovilizadas por inclusión en geles de polímeros naturales.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AT	Austria	FR	Francia	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabón	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Reino Unido	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	GN	Guinea	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	HU	Hungria	PL	Polonia
BJ	Benin	IE	Irlanda	PT	Portugal
BR	Brasil	IT	Italia	RO	Rumania
CA	Canada	JP	Japón	RU	Federación de Rusia
CF	República Centroafricana	KP	República Popular	SD	Sudán
CG	Congo		Democrática de Corea	SE	Suecia
CH	Suiza	KR	República de Corea	SK	República Eslovaca
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kazajstán	SN	Senegal
CM	Camerún	LI	Liechtenstein	SU	Unión Soviética
CS	Checoslovaquia	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CZ	República Checa	LU	Luxemburgo	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	UA	Ucrania
DK	Dinamarca	MG	Madagascar	US	Estados Unidos de América
ES	España	ML	Mali	VN	Viet Nam
FI	Finlandia	MN	Mongolia		

-1-

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE D-AMINOACIDOS
O DERIVADOS DE D-AMINOACIDOS

5 DESCRIPCION

La presente invención se refiere a un procedimiento nuevo para la preparación de D- aminoácidos o derivados de D-aminoácidos, a partir de la mezcla racémica de la hidantoína correspondiente, empleando células de *Agrobacterium radiobacter* inmovilizadas por inclusión en geles de polímeros naturales.

La utilización de biocatalizadores que emplean microorganismos inmovilizados presenta importantes ventajas para un proceso continuo. El objetivo es la transformación bioquímica estereoselectiva de una D-hidantoína para la obtención del D-aminoácido correspondiente. Los productos que pueden obtenerse son de interés en la industria farmacéutica, como, por ejemplo, la p-hidroxifenilglicina.

ESTADO DE LA TECNICA ANTERIOR

La utilización del sistema enzimático hidantoinasa y/o carbamilasa para la transformación de hidantoínas es bien conocida (Biotechnology: A Comprehensive Treatise. Vol 6a. H.-J. Rehm, G. Reed Eds., Verlag Chemie, Weinheim, 1984).

30

Un elevado número de microorganismos se han propuesto como productores del sistema enzimático mencionado, entre ellos: *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Arthrobacter*, siendo de especial interés *Agrobacterium radiobacter* por presentar un sistema enzimático completo con ambas actividades.

-2-

Entre las patentes relacionadas con el tema cabe destacar aquellas que se refieren a la utilización de *Agrobacterium radiobacter* para la obtención de D-fenilglicina o derivados (Ger. Offen. 2,621,076; Ger. Offen. 5 2,920,963), así como los los artículos: R. Olivieri et al. "Enzymatic conversion of N carbamoyl-D-aminoacides to D-amino acids" *Enzyme Microb. Technol.* 1, 201-204 (1979) y R. Olivieri et al. "Microbial transformation of racemic hydantoins to D-amino acids" *Biotechnol. Bioeng.* 23, 10 2173-83 (1981). En ellos se presenta un proceso microbio- no utilizando biomasa libre.

Con respecto a la utilización de sistemas enzimáticos de otros microorganismos, cabe mencionar *Agrobacterium tumefaciens* (EP 0 309 310), *Pseudomonas* (Ger. Offen. 15 3,018,581), *Candida* (JP 61,177,992), *Hansenula* (JP 61,177,991).

La utilización de microorganismos inmovilizados 20 presenta importantes ventajas de operación y separación que son objeto de la presente invención. Aunque se ha patentado la utilización de células de *Agrobacterium radiobacter* inmovilizadas en geles de polímero (ES 523.360), se utilizaba este biocatalizador con fines 25 agronómicos, no interesándose por la retención de las actividades enzimáticas hidantoinasa y carbamilasa.

Por otra parte, se ha descrito la utilización de otros microorganismos inmovilizados para la bioconversión 30 de hidantoínas, como es el caso de EP 0 261 836, referida a la inmovilización de *Bacillus brevis*. Asimismo, debe citarse la patente US 4,094,741, en cuyas reivindicaciones se incluye, en general, la inmovilización de actividades enzimáticas de un número amplio de microorganismos, 35 entre los que no se cita *Agrobacterium radiobacter* ni métodos concretos de inmovilización.

-3-

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención tiene como objeto un nuevo
5 proceso para la preparación de D- aminoácidos o derivados
de D-aminoácidos, a partir de la mezcla racémica de la
hidantoína correspondiente, empleando células de *Agrobac-*
terium radiobacter inmovilizadas por inclusión en geles
de polímeros naturales.

10

La utilización de microorganismos inmovilizados
permite la reutilización del biocatalizador, obteniéndose
importantes ventajas tanto desde el punto de vista de
separación como de utilización de un proceso en continuo.

15

Por otra parte, el uso de células de *Agrobacterium*
radiobacter presenta la ventaja de la presencia del
sistema enzimático necesario completo, permitiendo una
transformación cuantitativa de la D-hidantoína en el
20 producto deseado.

La estereoespecificidad de los enzimas involucra-
dos, actuando sobre la forma D- de la hidantoína, actúa
desplazando el equilibrio D-L de la mezcla racémica
25 permitiendo la conversión cuantitativa de dicha mezcla
racémica en el D-aminoácido o derivado de D- aminoácido.

La inmovilización de células de *Agrobacterium*
radiobacter (intactas o sometidas a un proceso de
30 disrupción), se realiza por inclusión en geles de
alginato o carragenato formados en presencia de iones
 Ca^{2+} y/o tratamiento térmico. Las partículas esféricas de
tamaño controlado así obtenidas pueden someterse o no a
un tratamiento posterior de endurecimiento para aumentar
35 su resistencia mecánica.

-4-

Como resultado, se obtiene un biocatalizador estable, capaz de realizar la conversión total de la D-L-hidantoína en el derivado de D- aminoácido correspondiente, así como su reutilización durante un período de
5 al menos 22 días.

La presente invención quedará ilustrada más en detalle con el siguiente ejemplo experimental, el cual no debe entenderse con carácter limitativo en cuanto al
10 alcance de la invención. Este ejemplo experimental se basa en las figuras que aparecen al final de esta memoria descriptiva, las cuales tienen el siguiente significado:

La figura 1 representa la variación de la actividad para la hidantoinasa con el pH.
15

La figura 2 representa la variación de la actividad para la carbamilasa.

20 Las figuras 3 y 4 representan la variación de las actividades enzimáticas con la temperatura.

Las figuras 5 y 6 representan la estabilidad de la biomasa libre a 45 y 50°C.
25

La figura 7 representa la estabilidad de las 2 actividades enzimáticas ensayadas durante un período de 22 días a 40°C.

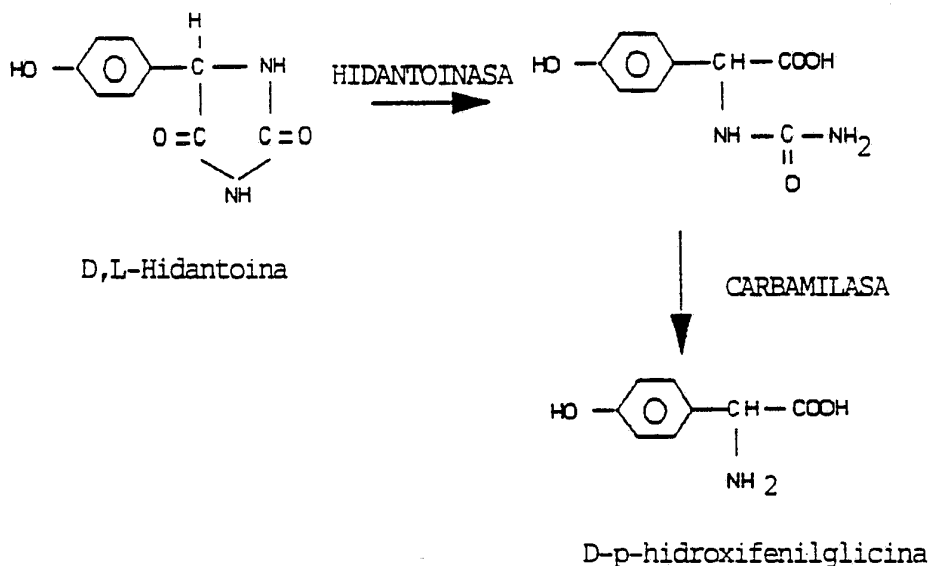
30 La figura 8 refleja el comportamiento de la biomasa libre ensayada en las mismas condiciones.

EJEMPLO EXPERIMENTAL

35 1.- Se utilizaron células de *Agrobacterium radiobacter* para la obtención de D-p hidroxifenilglicina

-5-

a partir de la hidantoína correspondiente. Dicha obtención siguió el esquema siguiente:



5

2.- Ensayos de actividad

2.1.- La actividad enzimática de la biomasa de *Agrobacterium radiobacter* se determinó de la forma siguiente: 1 ml de suspensión de biocatalizador se añade a 11 ml de una solución de hidantoína en tampón pH 8, siendo la concentración final de substrato 0,02 M. Se incuba a 40° C durante 20 minutos, en atmosfera de N₂ y se analiza la D-p-hidroxifenilglicina obtenida por HPLC.

15

Cuando se quiere determinar la actividad carbamila-
 lasa, se utiliza el mismo ensayo de actividad, sustituyendo la hidantoína por el carbamil derivado.

20

La actividad del biocatalizador inmovilizado se determinaba mediante el mismo procedimiento, trabajando con 5 ml de biocatalizador.

-6-

2.2.- Para determinar el pH óptimo de cada actividad enzimática, se prepararon disoluciones 10 mM de cada uno de los substratos (hidantoína y derivado carbamil), en tampón tris-HCl o tampón carbonato/carbónico según el pH deseado. Se añadía 1 ml de suspensión de biomasa a 10 ml de solución de substratos y se realizaba el ensayo a 40°C como se indica en el apartado 2.1.

2.3.- Para determinar la temperatura óptima de cada actividad se disolvieron los substratos (10 mM) en tampón tris-HCl a pH óptimo en cada caso (pH 8 para la actividad hidantoinasa y 8,5 para la carbamilasa), realizándose ensayos de actividad a diferentes temperaturas.

15

2.4.- La actividad hidantoinasa se expresa en mmoles/l convertidos en 20 min de reacción (suma de producto + carbamil derivado). La actividad carbamilasa se expresa en mmoles /l de p-hidroxifenilglicina obtenidos en 20 min de reacción a partir del intermedio.

20

3.- Inmovilización

Una suspensión de células de *Agrobacterium radiobacter* se inmovilizó en geles de alginato, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Materiales: Alginato sódico (Protanal LF 10/60) al 40% del volumen final. biomasa de *Agrobacterium radiobacter* al 21 % también del volumen final, CaCl₂ al 1.5 %.

30

Se tomaban 20 ml de biomasa (0,7 g/ml) y se mezclaban con la disolución de alginato sódico (2,6 g/46.67 ml). Se agitaba magnéticamente hasta obtener una mezcla homogénea. Mediante una bomba peristáltica se hace llegar el gel hasta una aguja (0,5 mm de diámetro) a 30

35

-7-

cm de una solución de CaCl_2 , la cual se agita magnéticamente. La solidificación de las gotas se produce al entrar en contacto el gel con los iones Ca^{2+} . Todos los pasos de la inmovilización se efectuaron en atmósfera de

5 N_2 .

4.- Estabilidad

4.1.- Estabilidad de la biomasa libre

10

Se mantuvieron 25 ml de biomasa a la temperatura ensayada y atmósfera de nitrógeno, durante el tiempo que duró el experimento. A intervalos determinados de tiempo, se extraía 1 ml de suspensión y se realizaba un test de

15 actividad.

4.2.- Estabilidad de la biomasa inmovilizada

Para determinar la estabilidad del biocatalizador obtenido se realizaban ensayos de actividad periódicamente. El biocatalizador inmovilizado se mantenía en recipientes cerrados a la temperatura deseada y en atmósfera de N_2 , con una concentración de hidantoína del 3% (p/v). Los ensayos de actividad se precedían de un lavado completo del biocatalizador.

25

5.- Resultados

5.1.- Determinación de las condiciones de operación de cada actividad enzimática.

30

La variación de la actividad hidantoinasa con el pH se muestra en la figura 1, obteniéndose un máximo para $\text{pH}=8$. Análogamente, la figura 2 presenta la variación de actividad para la carbamilasa, con un pH óptimo de 8.5.

35

Las figuras 3 y 4 muestran la variación de las

-8-

actividades enzimáticas con la temperatura. La máxima actividad se obtiene a 45°C para la hidantoinasa y a 50°C para la carbamilasa.

5 La estabilidad de la biomasa libre a 45 y 50°C se ha representado en las figuras 5 y 6. Para ambas actividades enzimáticas se observa una alta estabilidad en el período de 10 días estudiado, aunque la actividad carbamilasa a 50°C sufre una pérdida de alrededor del
10 20%.

Los datos obtenidos de las actividades y estabilidad permiten concluir que la temperatura de operación debe estar entre 45 y 50 °C y el pH óptimo entre 8 y 8,5.
15 Sin embargo, la menor actividad carbamilasa presente en la biomasa, en comparación con la hidantoinasa, aconseja proponer el operar a valores más cercanos a los óptimos para esta actividad (pH 8.5 y temperatura 50°C).

20 5.2.- Operación con biocatalizador inmovilizado
Los resultados obtenidos de la inmovilización muestran una retención entre el 50-80 % de la actividad del catalizador inmovilizado (hay que tener en cuenta que la medida de la actividad refleja no sólo la actividad
25 enzimática intrínseca sino también limitaciones difusionales en el caso del biocatalizador inmovilizado).

Las partículas de biocatalizador obtenidas mostraron una estabilidad del 100% por lo que respecta a
30 las 2 actividades enzimáticas ensayadas durante un período de 22 días a 40°C. (figura 7).

Este comportamiento es idéntico al de la biomasa libre ensayado en las mismas condiciones (figura 8).

35

El biocatalizador inmovilizado era pues, capaz de

-9-

mantener en las condiciones de operación , las actividades enzimáticas de las células de *Agrobacterium radiobacter*, y realizar la transformación específica de la D-hidantoína a la D-p-hidroxifenilglicina.

-10-

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de D-aminoácidos o derivados de D- aminoácidos a partir de la
5 hidantoína correspondiente, caracterizado porque dicha preparación se efectúa mediante la utilización de microorganismos inmovilizados que contengan las actividades enzimáticas hidantoinasa y carbamilasa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los microorganismos se inmovilizan por inclusión en geles de polímeros naturales (ej.: alginato, carragenato).
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado porque el microorganismo es *Agrobacterium radiobacter*.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, carecterizado porque el producto que se obtiene es la D-p-hidroxifenilglicina a partir de la mezcla racémica de hidantoína.
- 25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, caracterizado porque se trabaja en ambiente reductor, bien en atmosfera de N_2 o bien en presencia de reductores químicos, como el Na_2S entre otros.

30

1/8

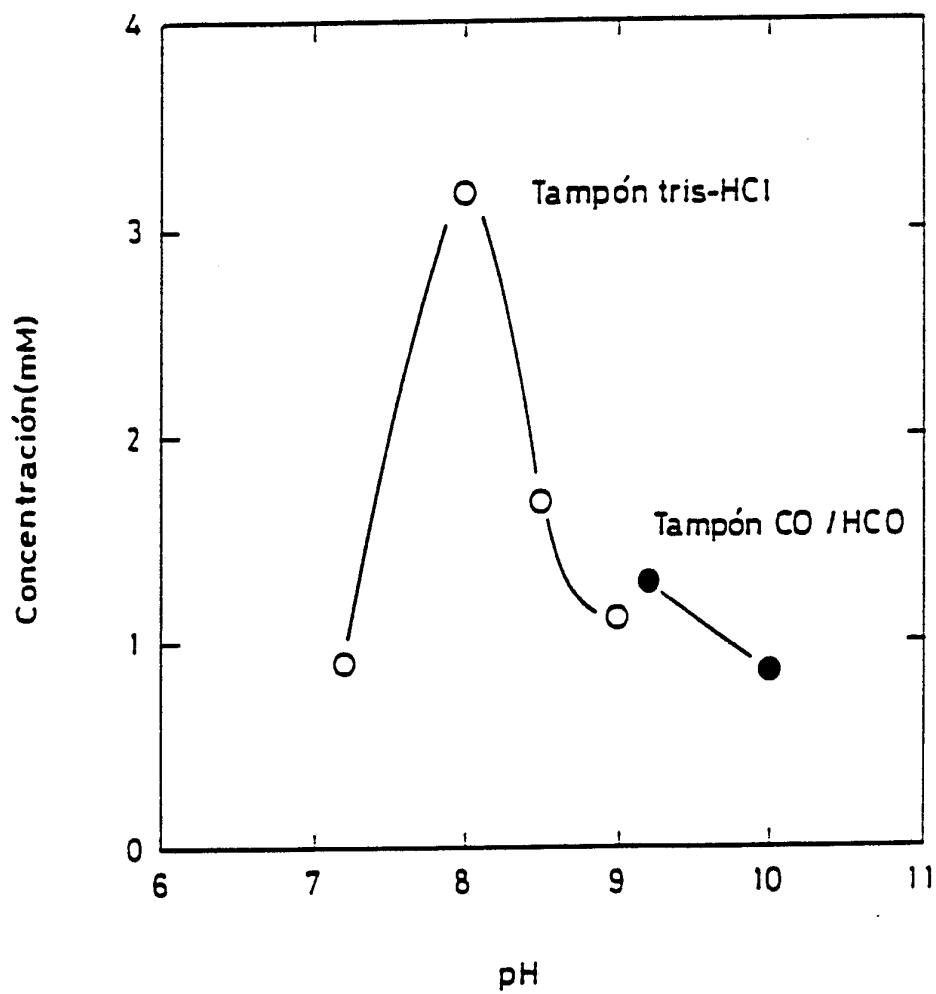


FIG.-1

2/8

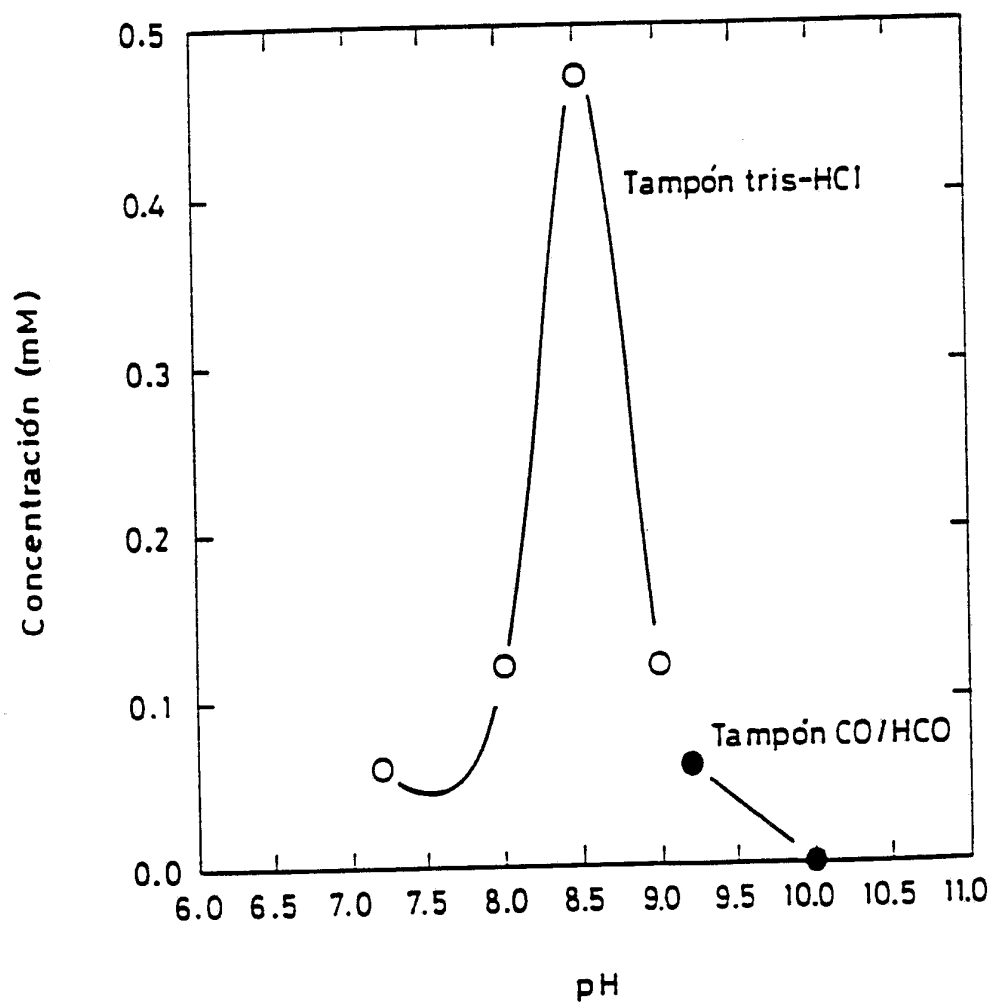


FIG.-2

3/8

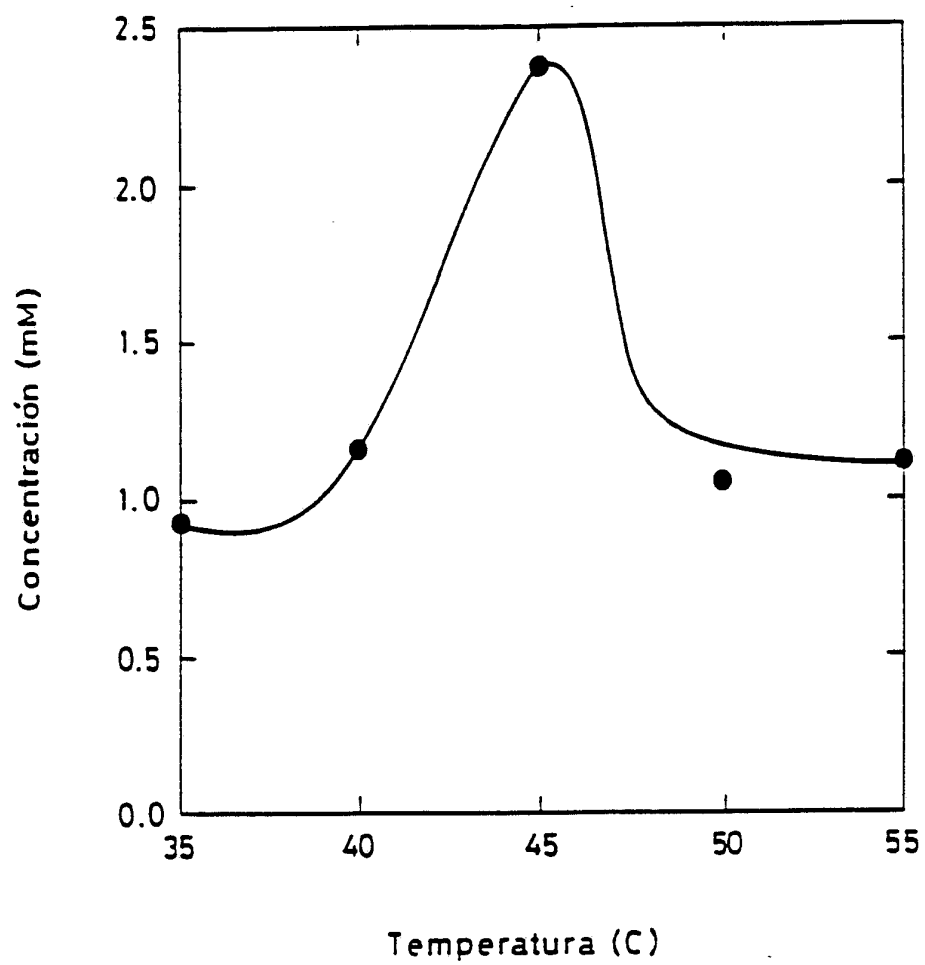


FIG.-3

4/8

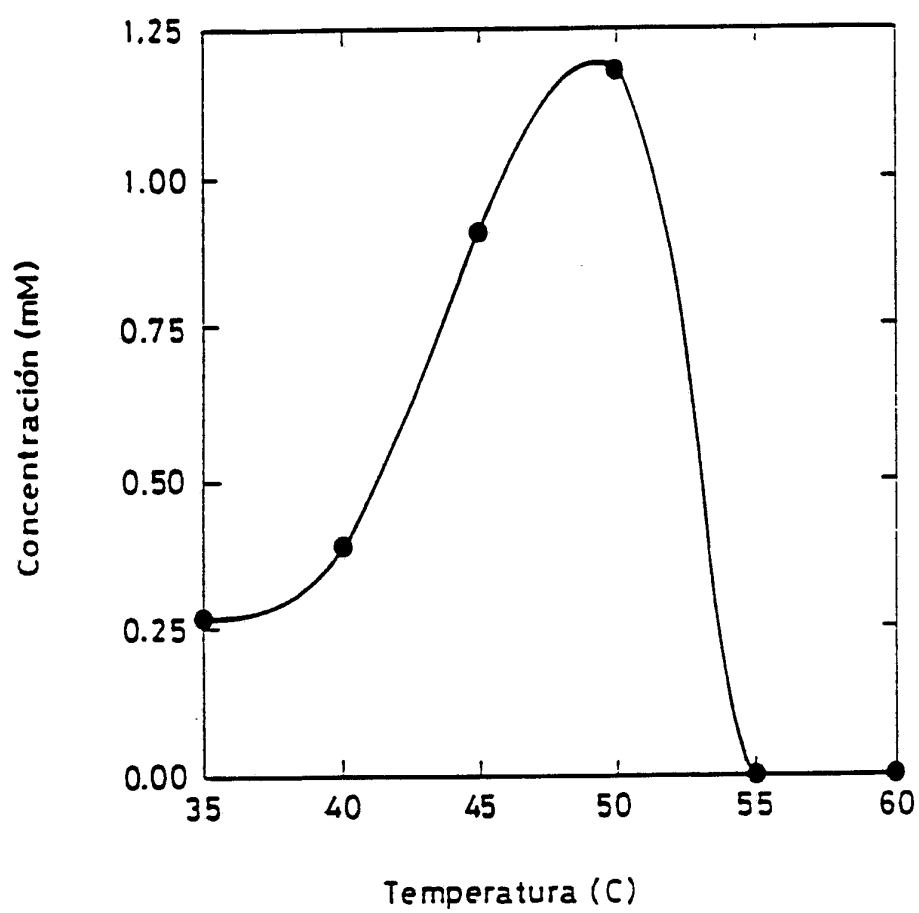


FIG.-4

5/8

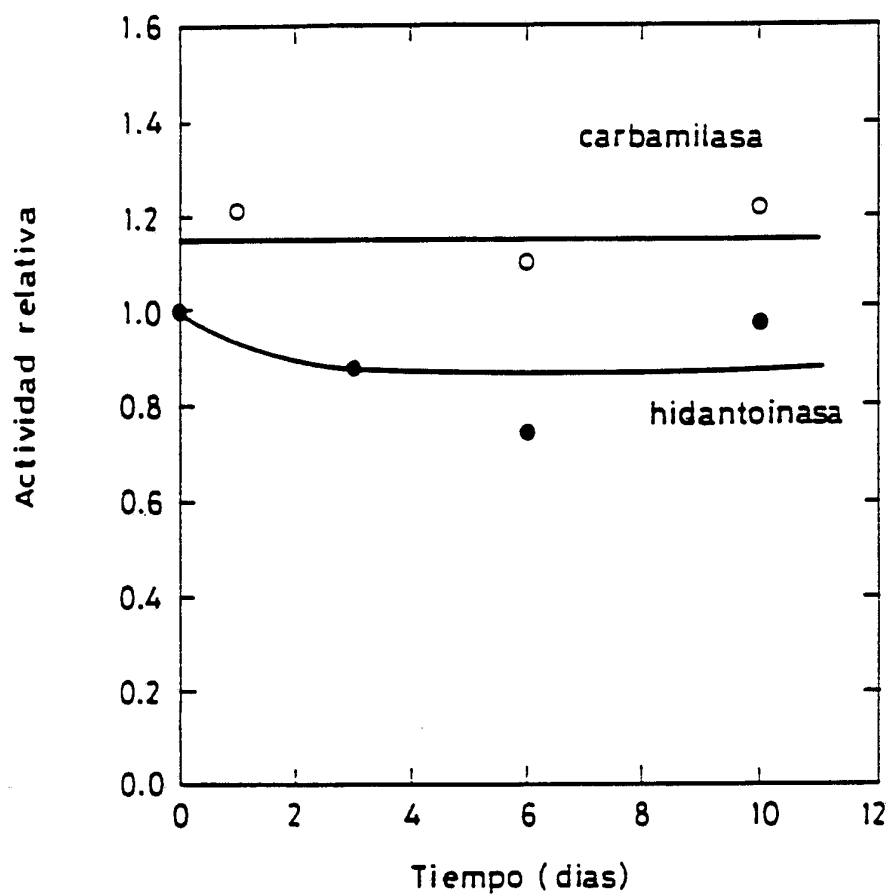


FIG.-5

6/8

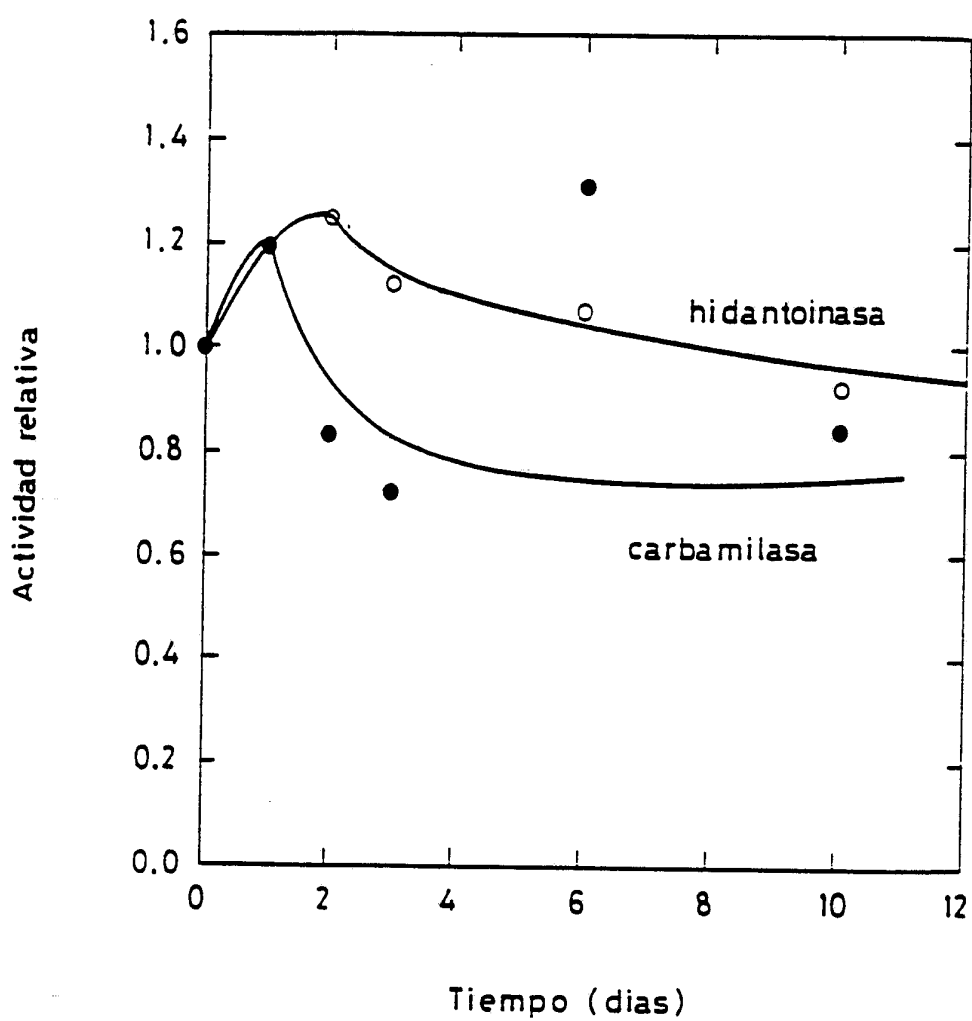


FIG.-6

7/8

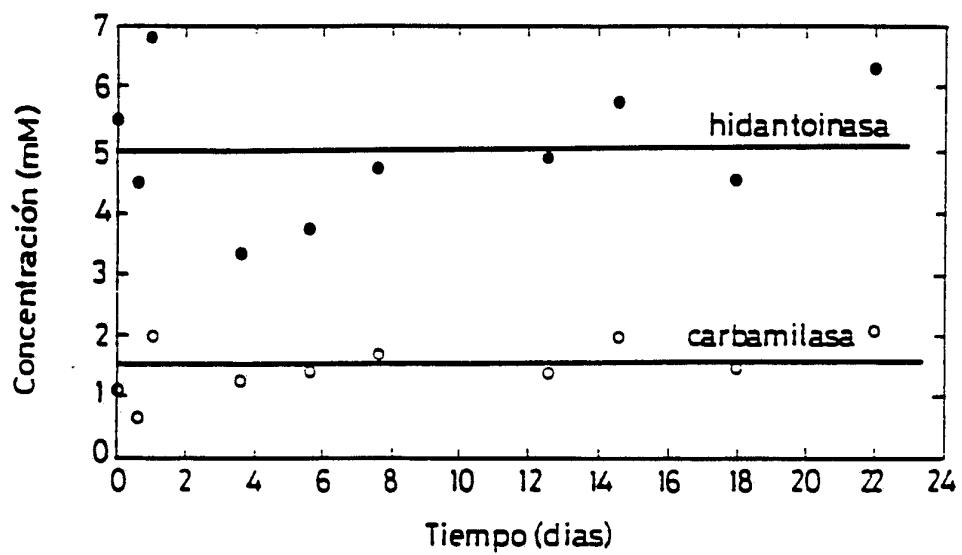


FIG.-7

8/8

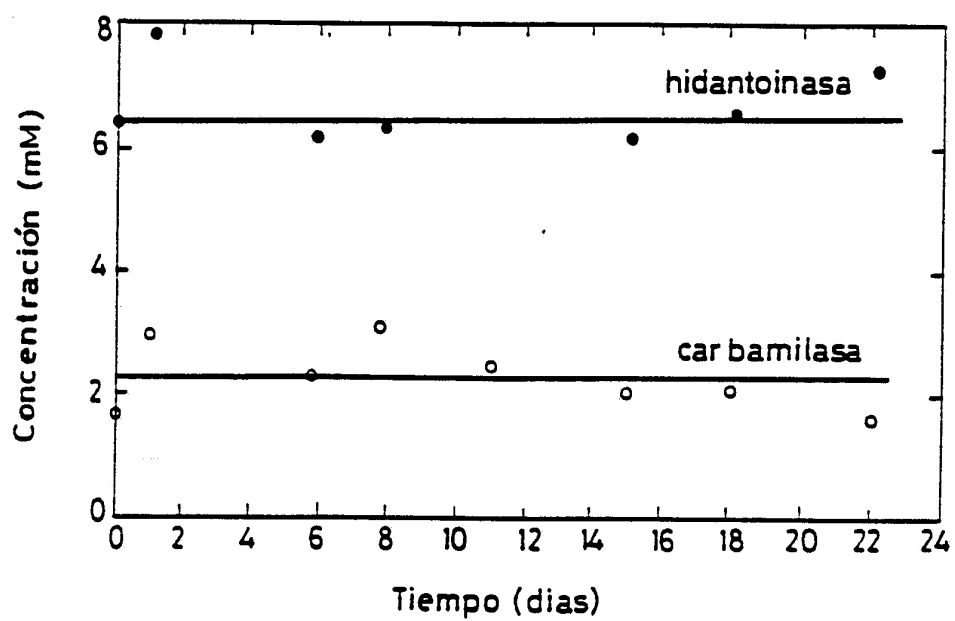


FIG.-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 93/00024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ C12P13/04; C12N11/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁵ C12P ; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 261 836 (BEECHAM GROUP PLC) 30 March 1988 cited in the application	1,2,4,5
Y	see column 1, line 1 - line 8 see column 1, line 39 - line 52 see column 2, line 42 - line 53 see column 3, line 34 - line 57 see column 5, line 1 - line 13; example 8 — ./.	3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 June 1993 (28.06.93)

Date of mailing of the international search report

25 August 1993 (25.08.93)

Name and mailing address of the ISA/
EUROPEAN PATENT OFFICE

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 93/00024

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY vol. 1, No. 1, January 1979, pages 201 - 204 R. OLIVERI ET AL. 'Enzymatic conversion of N carbamoyl-D-amino acids to D-amino acids' cited in the application see page 201, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column, paragraph 1 see page 201, right-hand column, paragraph 4 - paragraph 5 see page 203, right-hand column, paragraph 2 - page 204, right-hand column, paragraph 1	3
A	US,A,4 094 741 (HIDEAKI YAMADA ET AL.) 13 June 1978 cited in the application see column 1, line 34 - line 68 see column 3, line 33 - column 4, line 22	1-4

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

**ES 9300024
SA 72408**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

28/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0261836	30-03-88	AU-B- 603827	29-11-90
		AU-A- 7843287	24-03-88
		JP-A- 63185382	30-07-88

US-A-4094741	13-06-78	JP-C- 1050674	26-06-81
		JP-A- 53044690	21-04-78
		JP-B- 55045195	17-11-80
		JP-C- 1097263	14-05-82
		JP-A- 53069884	21-06-78
		JP-B- 56042914	07-10-81
		GB-A- 1564982	16-04-80

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/ES 93/00024

I. CLASIFICACION DE LA INVENCION (caso de ser aplicables varios simbolos de clasificación, indicarlos todos) ⁶

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

CIP. 5 C12P13/04; C12N11/04

II. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada ⁷

Sistema de clasificación

Símbolos de clasificación

CIP. 5

C12P ; C12N

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda ⁸

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES ⁹

Categoría *	Identificación de los documentos citados, ¹¹ con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes ¹²	N° de las reivindicaciones a las que se refieren ¹³
X	EP,A,0 261 836 (BEECHAM GROUP PLC) 30 Marzo 1988 citado en la solicitud	1,2,4,5
Y	ver columna 1, línea 1 - línea 8 ver columna 1, línea 39 - línea 52 ver columna 2, línea 42 - línea 53 ver columna 3, línea 34 - línea 57 ver columna 5, línea 1 - línea 13; ejemplo 8 --- -/--	3

* Categorías especiales de documentos citados: ¹⁰

- "A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente
- "E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma
- "L" documento que pueda plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada)
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de prioridad y que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención
- "X" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse como nueva ni que implique una actividad inventiva
- "Y" documento particularmente pertinente: la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

IV. CERTIFICACION

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

28 JUNIO 1993

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

25 -08- 1993

Administración encargada de la búsqueda internacional

OFICINA EUROPEA DE PATENTES

Firma del funcionario autorizado

MONTERO LOPEZ B.

EPO FORM (P0436)

III. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES (CONTINUACION DE LOS DATOS INDICADOS EN LA SEGUNDA HOJA)

Categoría *	Identificación de los documentos citados, con indicación, en caso necesario, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones a las que se refieran
Y	ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY vol. 1, núm. 1, Enero 1979, páginas 201 - 204 R. OLIVERI ET AL. 'Enzymatic conversion of N carbamoyl-D-amino acids to D-amino acids' citado en la solicitud ver página 201, columna izquierda, párrafo 1 - columna derecha, párrafo 1 ver página 201, columna derecha, párrafo 4 - párrafo 5 ver página 203, columna derecha, párrafo 2 - página 204, columna derecha, párrafo 1 ---	3
A	US,A,4 094 741 (HIDEAKI YAMADA ET AL.) 13 Junio 1978 citado en la solicitud ver columna 1, línea 34 - línea 68 ver columna 3, línea 33 - columna 4, línea 22 -----	1-4

**ANEXO AL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
CORRESPONDIENTE A LA SOLICITUD INTERNACIONAL Nº ES 9300024
SA 72408**

El presente anexo indica los miembros de la familia de patentes correspondientes a los documentos de patentes citados en el informe de búsqueda internacional arriba mencionado.

Dichos miembros están contenidos en el archivo informática de la Oficina Europea de Patentes con fecha

La Oficina Europea de Patentes no es, en ningún caso, responsable de estos datos meramente dados a título informativo.

28/06/93

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP-A-0261836	30-03-88	AU-B- 603827	29-11-90
		AU-A- 7843287	24-03-88
		JP-A- 63185382	30-07-88

US-A-4094741	13-06-78	JP-C- 1050674	26-06-81
		JP-A- 53044690	21-04-78
		JP-B- 55045195	17-11-80
		JP-C- 1097263	14-05-82
		JP-A- 53069884	21-06-78
		JP-B- 56042914	07-10-81
		GB-A- 1564982	16-04-80
