

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Juli 2007 (26.07.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/082402 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12P 17/18 (2006.01) **C12N 9/10** (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/CH2007/000022

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Januar 2007 (18.01.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
83/06 19. Januar 2006 (19.01.2006) CH

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CERBIOS-PHARMA S.A.** [CH/CH]; Via Pian Scairolo 6, CH-6917 Barbengo (CH).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ARINI, Achille** [CH/CH]; Via Torriani 1, CH-6922 Morcote (CH). **COPPOLECCHIA, Raffaella** [CH/CH]; Via Torriani 1, CH-6922 Morcote (CH). **TOGNINI, Antonio** [CH/CH]; CH-6919 Carabietta (CH). **MANZOTTI, Raffaella** [IT/IT]; Via Montenero 26, I-22100 Como (IT). **MARAZZA, Fabrizio** [CH/CH]; Via Selva Bella, CH-6986 Novaggio (CH).

(74) Anwalt: **POZZI, Andrea**; c/o KEMIA SA, Via Senago 23, CH-6915 Pambio-Noranco / Lugano (CH).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PROCESS FOR REGIOSELECTIVE N(5)-FORMYLATION OF (6S)-5,6,7,8-TETRAHYDRO-PTEROIC ACID AND DERIVATIVES THEREOF

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REGIOSELEKTIVEN N(5)-FORMYLIERUNG VON (6S)-5,6,7,8-TETRAHYDROPTEROINSÄURE UND DERIVATEN DAVON

(57) Abstract: The process according to the invention for regioselective N(5)-formylation of (6S)-5,6,7,8-tetrahydropteroic acid and derivatives thereof which are defined in formula (I) is characterized in that an aqueous buffer solution having a pH of from 6.5 to 7.5 is added to a mixture of a compound of the formula (I), an antioxidant and a formyl donor in a reaction vessel; an inert gas is blown through the resulting suspension; then an aqueous solution of a base is added dropwise or in portions with constant stirring until a clear solution which has a pH between 6.5 and 8.3 is formed; then a recombinant monofunctional glutamate formyl transferase, abbreviated to rGFT, i.e. the enzyme, is added in an aqueous buffer solution defined above; then the temperature is increased to a range of 30°C to 45°C and the reaction mixture is allowed to react until at least 95% of the formyl has been transferred from the formyl donor to the compound of the formula (I), - then the resulting reaction mixture is cooled to a temperature of from 0°C to 5°C; then an aqueous solution of a mineral acid is added dropwise until a pH of from 2.7 to 3.1 has been attained, which precipitates out the crude compound of the formula (II); the stirring is continued over at least 1 hour in order to complete the abovementioned precipitation, and the crude compound of the formula (II) is obtained.

(57) Zusammenfassung: Das erfindungsgemässe Verfahren zur regioselektiven N(5)-Formylierung von (6S)-5, 6, 7, 8-Tetrahydropteroinsäure und Derivaten davon, welche in Formel (I) definiert sind, ist dadurch gekennzeichnet, dass man zu einem Gemisch aus einer Verbindung der Formel (I), einem Antioxidationsmittel und einem Formyldonor in einem Reaktionsgefäss eine wässrige Pufferlösung mit einem pH Wert von 6,5 bis 7,5 hinzugibt; durch die erhaltene Suspension ein Inertgas durchbläst; dann tropfenweise oder portionenweise unter ständigem Rühren eine wässrige Lösung einer Base hinzugibt, bis eine klare Lösung entsteht, welche einen pH Wert zwischen 6,5 bis 8,3 aufweist; dann eine rekombinante monofunktionelle Glutamat-Formyltransferase, abgekürzt mit rGFT, d.h. das Enzym, in einer wässrigen, weiter oben definierten Pufferlösung hinzugibt; dann die Temperatur auf einen Bereich von 30°C bis 45°C erhöht und das Reaktionsgemisch reagieren lässt, bis wenigstens 95% des Formyltransfers vom Formyldonor auf die Verbindung der Formel (I) erfolgt ist; dann das erhaltene Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 0°C bis 5°C abkühlt; dann eine wässrige Lösung einer Mineralsäure tropfenweise hinzugibt, bis ein pH Wert von 2,7 bis 3,1 erreicht ist, wobei die rohe Verbindung der Formel (II) ausfällt; das Rühren während wenigstens 1 Stunde fortsetzt, um die oben genannte Fällung zu vervollständigen, und die rohe Verbindung der Formel (II) gewinnt.



WO 2007/082402 A2



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur regioselektiven N(5)-Formylierung von
(6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure und Derivaten da-
von

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfah-
5 ren zur regioselektiven N(5)-Formylierung von (6S)-
5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure und Derivaten davon, wel-
che in Formel I definiert sind.

Die Formylierung von 5,6,7,8-Tetrahydrofol-
säure, abgekürzt mit THF, ist ein wichtiges industri-
10 les Verfahren und führt zu N(5)-Formyl-5,6,7,8-Tetrahy-
drofolsäure, auch Folinsäure oder Leucovorin genannt.
Diese Verbindung ist ein pharmazeutisch aktiver Bestand-
teil, welcher im onkologischen und vitaminischen Bereich
breit verwendet wird; siehe zum Beispiel "Folates and
15 Pterins", R. L. Blakley, V. M. Whitehead Ed., Vol. 1-3,
(1986), John Wiley & Sons.

Reagenzien, die für Ausführung dieser Trans-
formation verwendet werden, umfassen Formamid und/oder
Ameisensäure; siehe zum Beispiel das norwegische Patent
20 Nr. NO 172 492 und das US Patent Nr. 5 198 547.

Gemäss der modernen Tendenz, umweltbelastende
und toxische Reagenzien zu vermeiden, besteht der Be-
darf, eine sicherere Alternative für die Formylierung
von THF und von anderen Pteroinsäure-Derivaten zu fin-
25 den.

Ein anderer Grund für das Auffinden einer Al-
ternative zur Verwendung von Formamid und/oder Ameisen-
säure für die oben genannte Formylierung besteht darin,
dass die Verwendung dieser "aggressiven" Reagenzien zur
30 Bildung von verschiedenen unerwünschten Nebenprodukten

führt: das isolierte Rohprodukt, zum Beispiel Folinsäure, muss daher mittels einer langen und komplexen Serie von Schritten gereinigt werden, um den hohen Reinheitskriterien zu entsprechen, die heutzutage für einen pharmazeutischen Aktivstoff verlangt werden; siehe wieder
5 das oben genannte norwegische Patent Nr. NO 172 492.

Gemäss der allgemeinen Klassifizierung durch die Enzymkommission (EC), umfassend die EC Nummer und den Namen, gehört das Enzym, welches die Addition einer
10 Formylgruppe an die N(5)-Stelle einer Verbindung der Formel I katalysiert, zur Klasse der Transferasen und entspricht der Code-Nummer EC 2.1.2.5. Mehrere Definitionen, welche diesem Enzym zugeordnet sind, gehören immer noch der gegenwärtigen Nomenklatur an und werden wie
15 folgt zitiert:

Glutamat-formimidoyltransferase;

Glutamat-formyltransferase;

Formiminoglutaminsäure-transferase;

Formiminoglutaminsäure-formiminotransferase;

20 Glutamat-formiminotransferase;

5-Formimidoyltetrahydrofolat: L-Glutamat-N-formimidoyltransferase.

Wichtig ist die Code-Nummer EC 2.1.2.5.

In der Natur ist Glutamat-formyltransferase,
25 abgekürzt mit GFT, sowohl als Bestandteil des biochemi-

schen Abbauweges von Histidin als auch im "C₁ Stoffwechsel durch Folat" wirksam.

In Säugetieren ist GFT als ein bifunktionelles Enzym vorhanden, da es neben der Formyltransferase Aktivität auch die Cyclodesaminierung von N(5)-Formimino-THF katalysiert, indem es diese Verbindung zu N(5),N(10)-Methenyl-THF umwandelt.

Alle in der Literatur vorhandenen Studien über das EC 2.1.2.5 Enzym sind mit dem aus der Säugetierleber gewonnenen bifunktionellen Enzym durchgeführt worden. Diese Studien beziehen sich sowohl auf die Hauptaktivität als Formimino-transferase als auch auf die Minderaktivität als Formyl-transferase (Miller A. und Waelsch H., J. Biol. Chem. 1957, Vol. 228, Seiten 397-417; Tabor H. und Wyngarden, L. J. Biol. Chem. 1959, Vol. 234, Seiten 1830-1849; Silverman et al. J. Biol. Chem. 1957, Vol. 226, Seiten 83-84; Bortoluzzi und McKenzie J. Biol. Chem. 1983, Vol. 61, Seiten 248-253).

Nach der Klonierung und Sequenzierung des aus der Schweineleber gewonnenen GFT Enzyms (Murley L.L. et. al, Journal of Biol. Chem. 1993. Vol 268, Seiten 22820-22824) sind andere DNA Sequenzen gefunden worden, die für mutmassliche Formimino-transferasen kodieren könnten. Diese DNA Sequenzen sind auch in anderen Organismen als in Säugetieren gefunden worden. Mit den neuesten Fortschritten in der automatischen Sequenzierung hat man tatsächlich eine grosse Anzahl an genomischen Daten von relativ zahlreichen Prokaryoten und Eukaryoten gewinnen können.

Es sind auch Berichte über Pflanzenenzyme mit Glutaminsäure-formimino-transferase Aktivität veröffentlicht.

licht worden, die sich auf Arbeiten über *Oryza sativa*, *Triticum aestivum* und *Glycine max* (siehe die US Patent Anmeldung Nr. 2002/0102689) beziehen.

Aufgrund der Literaturangaben, die die Funkti-
5 onalität des aus Schweineleber gewonnenen GFT Enzyms
nachweisen, wäre es sicher naheliegender gewesen, die
entsprechende GFT-kodierende DNA Sequenz zu klonieren
und somit das mit hoher Wahrscheinlichkeit funktionsfä-
10 tionell ist, wäre es nicht geeignet für die industrielle
Produktion der (6S)-N(5)-formylierten Verbindung der
Formel I, insbesondere weil die enzymatische Reaktion
als Endprodukt die N(5),N(10)-Methenyl- anstatt der
N(5)-Formylform ergeben hätte.

15 Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung,
ein "milderes" und umweltfreundliches Formylierungsver-
fahren zu Verfügung zu stellen, welches die Bildung der
meisten beobachteten Nebenprodukte vermeidet.

Dieses Verfahren soll ein Rohprodukt, insbe-
20 sondere Folinsäure, ergeben, welches ein viel kürzeres
Reinigungsverfahren benötigt, und eine höhere Gesamtaus-
beute an reinem Produkt, insbesondere (6S)-N(5)-Formyl-
THF, ergibt.

Dieses Verfahren soll eine enzymatische Alter-
25 native zum oben genannten rein chemischen Verfahren
beinhalten.

Dieses Verfahren soll für die industrielle
Herstellung von (6S)-N(5)-formylierten Verbindungen der
Formel II geeignet sein.

In der vorliegenden Erfindung soll ein rekombinantes Enzym prokaryotischer bakterieller Herkunft, das ausschliesslich die Formimino (formyl) transferase Funktion aufweist und das somit für die industrielle
5 Produktion der N(5)-formylierten Verbindung der Formel I geeignet ist, verwendet werden.

Mit der vorliegenden Erfindung werden die obigen Ziele erreicht.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur regioselektiven N(5)-Formyl-ierung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure und Derivaten davon, welche in Formel I definiert sind, ist dadurch gekennzeichnet, dass man
10

- zu einem Gemisch aus einer Verbindung der Formel I, einem Antioxidationsmittel und einem Formyl-donator in einem Reaktionsgefäss eine wässrige Pufferlösung mit einem pH Wert von 6,5 bis 7,5 hinzugibt,
15

- durch die erhaltene Suspension ein Inertgas durchbläst,

- dann tropfenweise oder portionenweise unter ständigem Rühren eine wässrige Lösung einer Base hinzugibt, bis eine klare Lösung entsteht, welche einen pH Wert zwischen 6,5 bis 8,3 aufweist,
20

- dann eine rekombinante monofunktionelle Glutamat-Formyltransferase, abgekürzt mit rGFT, d.h. das Enzym, in einer wässrigen, weiter oben definierten Pufferlösung hinzugibt,
25

- dann die Temperatur auf einen Bereich von 30°C bis 45°C erhöht und das Reaktionsgemisch reagieren

lässt, bis wenigstens 95% des Formyltransfers vom Formyl-donator auf die Verbindung der Formel I erfolgt ist,

- dann das erhaltene Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 0°C bis 5°C abkühlt,

5 - dann eine wässrige Lösung einer Mineralsäure tropfenweise hinzugibt, bis ein pH Wert von 2,7 bis 3,1 erreicht ist, wobei die rohe Verbindung der Formel II ausfällt,

10 - das Rühren während wenigstens 1 Stunde fortsetzt, um die oben genannte Fällung zu vervollständigen, und

- die rohe Verbindung der Formel II gewinnt.

Bevorzugte Ausführungsformen dieser Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen definiert.

15 Im folgenden Teil werden mögliche Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung beschrieben.

Dabei wird Bezug auf die Figuren genommen.

Figur 1 zeigt das Reaktionsschema, worin auch der Rest R definiert ist.

20 Figur 2 zeigt ein HPLC Chromatogramm an einer "reverse phase" Säule von roher (6S)-N(5)-Formyl-THF, hergestellt gemäss dem norwegischen Patent Nr. NO 172 492.

25 Figur 3A zeigt ein HPLC Chromatogramm an einer "reverse phase" Säule von roher (6S)-N(5)-Formyl-THF,

hergestellt gemäss Beispiel 2 der vorliegenden Erfindung. Es ist festgehalten, dass der grosse Peak bei der Retentionszeit 1 min Ascorbinsäure entspricht.

Figur 3B zeigt ein HPLC Chromatogramm an einer "reverse phase" Säule von gereinigter (6S)-N(5)-Formyl-THF, hergestellt gemäss Beispiel 2 der vorliegenden Erfindung, nach einer Resuspension in kaltem Wasser und einer Filtration.

In der vorliegenden Erfindung wird ein rekombinantes monofunktionelles Enzym prokaryotischen, bakteriellen Ursprungs verwendet, welches nur die Funktion der Formimino (Formyl) Transferase zeigt.

Dieses Enzym ist nicht das gleiche wie das oben erwähnte bifunktionelle Leberenzym, aber es ist in Teilen ähnlich, insbesondere im Teil, welcher der Formimino Transferase Domäne entspricht.

Der Vorteil der Verwendung eines aus einem Mikroorganismus gewonnenen prokaryotischen, bakteriellen Enzyms, und insbesondere des von *Streptococcus pyogenes* kodierten Enzyms, besteht in seiner monofunktionellen Glutamat Formimino (Formyl) Transferase Aktivität.

Die monofunktionelle Eigenschaft dieses Enzyms liess sich durch die vergleichende Analyse seiner Aminosäuresequenz in der genomischen Datenbank herleiten, obwohl keine Voraussage über seine tatsächliche Aktivität getroffen werden konnte, bevor die biochemische Reaktion durchgeführt wurde.

Die in der vorliegenden Erfindung verwendete DNA-Sequenz und die Aminosäuresequenz von GFT sind ver-

schieden von den pflanzlichen Sequenzen, die in der oben genannten US Patentanmeldung Nr. 2002/0102689 beschrieben wurden.

Bedingt durch die inhärente Stereoselektivität
5 des Enzyms resultiert die Verwendung von (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure als Substrat in der ausschliesslichen Formylierung des (6S)-Isomers.

Die folgenden Beispiele illustrieren die vorliegende Erfindung.

10 Beispiel 1

Herkunft des *S.pyogenes* Glutamat-formyl-
transferase (GFT) Gens

Das Gen, das für GFT von *S.pyogenes* (ATCC 19615) kodiert, wurde in *Escherichia coli* (*E.coli*) Stamm
15 BL21 (DE) kloniert und überexprimiert.

Auf diese Weise wurde genügend rekombinantes monofunktionelles Enzym hergestellt.

Extraktion der genomischen DNA

25 ml einer Kultur von *S.pyogenes* ATCC 19615
20 wurden über Nacht in MRS Brühe (Oxoid) bei einer Temperatur von 37°C gezüchtet.

Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde anhand einer Verfahrensanleitung weiter verarbeitet, die im Vergleich zu derjenigen im Kit für die Ex-
25 traktion genomischer DNA (Qiagen) modifiziert wurde.

Das Pellet wurde in 500 µl STET Puffer (8% Saccharose, 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) in Lösung gebracht und 400 µl einer Lysozym-lösung (50 mg/ml) wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde
5 bei einer Temperatur von 37°C während 150 Minuten bis zur vollständigen Lyse der Zellen inkubiert.

Das lysierte Gemisch wurde gemäss der Anleitung des Kit-Herstellers (Qiagen) weiter verarbeitet, mit der Ausnahme, dass nur die Hälfte der angegebenen
10 Volumina verwendet wurde.

Nach der Isopropanol-Präzipitierung wurde die erhaltene DNA ein zweites Mal gereinigt, indem zuerst eine Behandlung mit Phenol/Chloroform (1:1), dann mit Chloroform und schliesslich eine Ethanol-Präzipitierung
15 eingesetzt wurden.

GFT DNA Isolierung und Amplifizierung

Genomische DNA aus *S.pyogenes* ATCC 19615 wurde für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) verwendet, um die GFT DNA Sequenz zu amplifizieren, wobei das folgende
20 Oligonukleotidpaar bei einer Hybridisierungstemperatur von 45°C eingesetzt wurde:

Oligo 1:

5' AGGAGGAAATAAAATGGCGAAAATTGTTGAATGTATTCCC 3'

25 Oligo 2:

5' TAAGAATTCCTACTAACCTAGCAAATGGTTTTCAAGAATC 3'

Die Klonierung und die anschliessende Sequenzierung der kodierenden Region ergaben die folgende Sequenz:

```
ATGGCGAAAATTGTTGAATGTATTCCCAACTTCTCAGAAGGCCAAAATCAGGCTGTTATC
5 GATGGTTTGGTAGCGACGGCCAAAAGTATTCTGGAGTGACCCCTTCTCGACTACTCTTCT
GATGCGAGCCACAACCGGAGCGTGTTTACCTTGGTTGGAGATGACCAGTCTATTCAAGAA
GCAGCTTTCCAACCTGGTGAAATACGCTTCTGAAAACATTGATATGACCAAACATCATGGC
GAACACCTCGTATGGGAGCAACTGATGTCTGCCCATTGTTCCGATCAAAGACATCACT
ACACAAGAATGTGTTGAGATTTCAAAACAAGTCGCAGAACGGATTAAACCGTGAACCTTGAC
10 ATTCCAATCTTCTTTATGAAGATTCTGCCACACGTCCAGAACGTCAAAACCTTGCTAAA
ATCCGTAAAGGTCAGTTTGAAGGCATGCCAGAAAACTGTTGGAAGAGGACTGGGCACCT
GACTACGGAGATCGTAAGATTCACCCAACTGCTGGGGTAACTGCCGTTGGTGCTCGCATG
CCATTGGTTGCCCTCAATGTTAATTGGATACTGACAATATCGACATTGCTCATAAAATT
GCTAAAATTATCCGCGGTTCAAGTGGTGGCTACAAATATTGTAAGGCTATCGGTGTCATG
15 TTAGAAGACCGTCATATTGCCCAAGTCTCCATGAACATGGTTAACTTTGAAAAATGTTCT
CTTTACCGTACTTTTGAACCATCAAATTTGAAGCGCGTCGCTACGGTGTTGAATGTTATT
GGTTCGAAGTCATCGGCTTAGCGCCAGCCAAGGCCTTAATCGATGTGGCTGAATACTAC
TTACAAGTTGAGGACTTTGACTACCCTAAACAGGTTCTTGAAAACCATTTGCTAGGTTAG
```

20 Klonierung in den Expressionsvektor pET22b

Um eine hohe Ausbeute hinsichtlich Expression und Reinigung des rekombinanten monofunktionellen rGFT zu erhalten, wurde eine Sequenz, die für 6 Histidine (His-tag) kodiert, an das carboxylterminale Ende des
25 rGFT angefügt.

Dies wurde erhalten, indem das rGFT DNA Fragment in die XbaI/BamHI Restriktionsstelle des kommerziellen Expressionsvektors pET22b (Novagen, EMD Biosciences) hinein kloniert wurde.

30 Zuerst wurden die XbaI/BamHI Restriktionsstellen ins rGFT DNA Fragment hineingeführt, um dieselbe Sequenz mit dem "His-Tag" im Expressionsvektor fusionieren zu können. Dies wurde erhalten, indem rGFT DNA mit dem

folgenden Oligonukleotidpaar bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C amplifiziert wurde:

Oligo 3:

5' CCCTCTAGAAGGAGGAAATAAAAATGGCG 3'

5

Oligo 4:

5'GTCCCAGGATCCAAACCTAGCAAATGGTTTTCAAGAATCTG 3'

10 Dann wurde das neu amplifizierte rGFT DNA
Fragment in die XbaI/BamHI Restriktionsstellen von
pET22b kloniert, und das klonierte Konstrukt wurde in
E.coli BL21 (DE) transformiert.

15 Das nach der Klonierung in *E.coli* BL21 (DE)
erhaltene Plasmid erlaubt die Expression des rGFT Gens
(mit dem C-terminalen His-tag), das unter der Kontrolle
des T7 Promoters steht.

Die Expression des so modifizierten Enzyms
wurde durch Western-Blotting unter Verwendung von anti-
His Antikörpern (Novagen) überprüft.

20 Züchtung von rGFT-Enzym exprimierendem *E.coli*
BL21 (DE)

25 Eine Kultur von rekombinantem *E.coli* BL21
(DE), welches das rGFT Enzym exprimiert, wurde über
Nacht gezüchtet, dann 1:50 in 300 ml frischer Luria Brü-
he (LB) verdünnt und in Gegenwart von Ampicillin (100
µg/ml) bei einer Temperatur von 37°C in einem Schüttler
(180 rpm) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 gezüch-
tet.

Nach Induzierung mit 1,4 ml von 0,1 M IPTG (Isopropyl-thio-galaktosid) wurde die Inkubation für etwa 3 Stunden fortgesetzt.

Reinigung von rGFT

- 5 Die erhaltene Zellkultur wurde abzentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen.

Das Zellpellet wurde bei einer Temperatur von -70°C aufbewahrt.

- 10 Das Zellpellet wurde dann in 30 ml Puffer A (20 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Phenylmethylsulphonylfluorid; pH 7,4) aufgenommen.

Das resuspendierte Zellpellet wurde dann für 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C in Gegenwart von 0,5 g/l Lysozym inkubiert.

- 15 Die erhaltene Suspension wurde in einem Mikrofluidizer bei einem Druck von 10'000 psi behandelt.

Dann wurde die Suspension während 45 Minuten bei einer Temperatur von 4°C mit DNase/RNase (jeweils 10 µg/ml) inkubiert.

- 20 Die Suspension wurde dann während 10 Minuten bei 10'000 rpm zentrifugiert, und das Pellet wurde verworfen.

Der Überstand wurde auf eine 5 ml Ni²⁺-Sepharose 6 FF Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen.

Die Bindung und das Waschen des ungebundenen Probenmaterials wurden mit Puffer B (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl; pH 7,5) durchgeführt.

Die Eluierung des gebundenen rGFT erfolgte
5 durch Puffer C (20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol; pH 7,5).

Für die endgültige Formulierung und Aufbewahrung wurde ein Pufferaustausch (Puffer D: 100 mM Kaliumphosphat; pH 7,0) durchgeführt, wobei eine 5 ml Sephadex
10 G25-F Säule verwendet wurde.

Die Lösung mit dem rekombinanten monofunktionalen rGFT Enzym wurde bei einer Temperatur von -70°C gelagert.

Die Aktivität (Units/ml und Units/mg) einer
15 Kontrollprobe wurde entsprechend dem Sigma-Test für das EC 2.1.2.5 Enzym gemessen, wobei Formyl-(L)-glutaminsäure anstelle von Formimino-(L)-glutaminsäure und eine Inkubation bei einer Temperatur von 37°C statt 25°C benutzt wurden.

Der Sigma-Test ist eine Modifizierung des in
20 Tabor H. und Wyngarden L., Journal of Clinical Investigation, 1958, Vol. 37, Seiten 824-828 beschriebenen Tests.

Beispiel 2

25 445 mg (1 mMol) (6S)-THF, hergestellt gemäss EP 0 600 460 B1, 880 mg (5 mMol) Ascorbinsäure und 875 mg (5 mMol) N-Formyl-(L)-glutaminsäure wurden in einen 25 ml Dreihalskolben gegeben, welcher mit einem

Magnetrührer, einem Stickstoffeinleitungsrohr und einem Thermometer ausgerüstet war.

N-Formyl-(L)-glutaminsäure wurde nach der Vorschrift von H. Tabor, A. H. Mehler, J. Biol. Chem., 210, 559 (1954) hergestellt.

Zum oben beschriebenen Gemisch wurden unter Rühren und einer Stickstoffatmosphäre 5 ml eines 100 mM Kaliumphosphat Puffers zugegeben, welcher einen pH Wert von 6,7 hatte.

10 Zur erhaltenen Suspension wurde tropfenweise 20%-ige NaOH solange zugegeben, bis eine homogene Lösung erhalten wurde, welche einen pH Wert von 6,7 hatte.

Um Spuren von Sauerstoff zu entfernen, wurde dann das Reaktionsgefäß evakuiert und mit Stickstoff 15 gespült; diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt.

Dann wurden 0,35 U der rekombinanten monofunktionellen Glutamat-formyltransferase, gelöst in 0,32 ml eines 100 mM Kaliumphosphat Puffers bei pH 6,7, zugegeben. Dieses Enzym wurde gemäss dem oben beschriebenen 20 Beispiel 1 hergestellt.

Dann wurden erneut 3 Zyklen des Evakuieren und der Stickstoffspülung durchgeführt.

Die Temperatur dieses Reaktionsgemisches wurde auf 40°C erhöht und während insgesamt 72 Stunden ge- 25 rührt.

15

Der Fortschritt der Formylierungsreaktion wurde mittels HPLC unter Verwendung einer "reverse phase" Säule verfolgt.

5 Während der oben erwähnten 72-stündigen Reaktionszeit wurden noch zusätzliche 100 mg von N-Formyl-(L)-glutaminsäure (0,57 mMol) in 4 Portionen zugegeben.

Das am Schluss der Reaktion durchgeführte HPLC Chromatogramm zeigte, dass die erhaltene (6S)-N(5)-Formyl-THF eine Reinheit von 95,07% hatte. Siehe die
10 Figur 3A.

Dann wurde das Reaktionsgemisch auf eine Temperatur von 5°C abgekühlt.

Unter Rühren wurde 18%-ige HCl zugegeben, bis ein pH Wert von 3,0 erreicht wurde.

15 Während der Säurezugabe entstand ein weisser Festkörper.

Um die Fällung zu vervollständigen wurde die erhaltene Suspension während einer weiteren Stunde bei einer Temperatur von 5°C gerührt.

20 Der erhaltene Festkörper wurde mittels Filtration isoliert, dann in 2 ml kaltem Wasser resuspendiert und erneut filtriert.

Die so erhaltene feste (6S)-N(5)-Formyl-THF zeigte im HPLC Chromatogramm eine Reinheit von 96,88%.
25 Siehe die Figur 3B.

Das Produkt kann zusätzlich gereinigt werden, indem man zum Beispiel das entsprechende Ca^{2+} -Salz herstellt, wie das im norwegischen Patent Nr. NO 172 492 beschrieben ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur regioselektiven N(5)-Formylierung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroidsäure und Derivaten davon, welche in Formel I definiert sind, dadurch gekennzeichnet, dass man

- zu einem Gemisch aus einer Verbindung der Formel I, einem Antioxidationsmittel und einem Formyl-donator in einem Reaktionsgefäß eine wässrige Pufferlösung mit einem pH Wert von 6,5 bis 7,5 hinzugibt,

10 - durch die erhaltene Suspension ein Inertgas durchbläst,

- dann tropfenweise oder portionenweise unter ständigem Rühren eine wässrige Lösung einer Base hinzugibt, bis eine klare Lösung entsteht, welche einen pH

15 Wert zwischen 6,5 bis 8,3 aufweist,

- dann eine rekombinante monofunktionelle Glutamyl-Formyltransferase, abgekürzt mit rGFT, d.h. das Enzym, in einer wässrigen, weiter oben definierten Pufferlösung hinzugibt,

20 - dann die Temperatur auf einen Bereich von 30°C bis 45°C erhöht und das Reaktionsgemisch reagieren lässt, bis wenigstens 95% des Formyltransfers vom Formyl-donator auf die Verbindung der Formel I erfolgt ist,

- dann das erhaltene Reaktionsgemisch auf eine

25 Temperatur von 0°C bis 5°C abkühlt,

- dann eine wässrige Lösung einer Mineralsäure tropfenweise hinzugibt, bis ein pH Wert von 2,7 bis 3,1

erreicht ist, wobei die rohe Verbindung der Formel II ausfällt,

- das Rühren während wenigstens 1 Stunde fortsetzt, um die oben genannte Fällung zu vervollständigen,
5 und

- die rohe Verbindung der Formel II gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel I (6S)-5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure ist, abgekürzt mit (6S)-THF.

10 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass man in das genannte Reaktionsgefäß

zuerst die Verbindung der Formel I in fester Form hinzugibt,

15 dann das Antioxidationsmittel hinzugibt, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Ascorbinsäure, Mercaptoethanol und Dithiotreithol, und

dann den Formyl-donator hinzugibt, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus N-Formyl-
20 (L)-glutaminsäure, N-Formyl-(L)-glutamin, N-Formyl-(L)-isoglutamin und N-Formyl-(L)-asparaginsäure, oder deren wasserlösliche Salze, vorzugsweise die Natriumsalze oder die Kaliumsalze, und

dass man das Gemisch bei Raumtemperatur und
25 unter einem Inertgas herstellt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Pufferlösung
mit einem pH Wert von 6,5 bis 7,5 ein Phosphatpuffer
ist, vorzugsweise ein 10 mM bis 1 M, insbesondere 100
5 mM, Natrium- oder Kaliumphosphatpuffer.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung einer
Base eine 20% NaOH Lösung oder eine 20% KOH Lösung ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
10 dadurch gekennzeichnet, dass die klare Lösung, welche
nach der Hinzugabe der Base erhalten wird, einen pH Wert
von 6,5 bis 6,8 aufweist.

7.. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, dass nach der Hinzugabe des En-
zyms die Temperatur auf einen Bereich von 37°C bis 42°C
15 erhöht wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, dass man nach der Hinzugabe des
Enzyms die Komponenten während wenigstens 8 Stunden,
20 vorzugsweise während 1 bis 5 Tag(en) reagieren lässt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, dass die Mineralsäure HCl, vor-
zugsweise 18% HCl, oder H₂SO₄ ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis
25 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Rühren für die Ver-
vollständigung der Fällung der rohen Verbindung der For-
mel II während wenigstens 2 Stunden erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die rohe Verbindung der Formel II mittels Filtration oder mittels Zentrifugation gewonnen wird.

5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass das molare Verhältnis zwischen dem Formyl-donator und der Verbindung der Formel I während der Formylierungsreaktion im Bereich von 2:1 bis 10:1, insbesondere von 5:1 bis 3:1, gehalten
10 wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das molare Verhältnis zwischen dem Antioxidationsmittel und der Verbindung der Formel I im Bereich von 1:1 bis 5:1, insbesondere von
15 2:1 bis 3:1, ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass eine Menge von 0,01 bis 0,1 U/ml, insbesondere von 0,03 bis 0,04 U/ml, an Enzym von 1 mM bis 200 mM an (6S)-THF in einer Zeit von 24
20 Stunden bis 48 Stunden bei einer Temperatur von 37°C bis 42°C und einem pH Wert von 6,5 bis 6,8 formyliert.

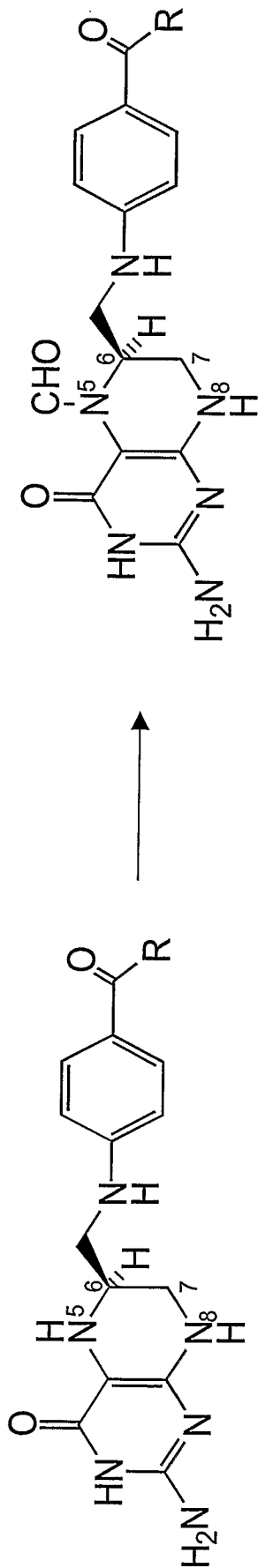
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Reinigung der rohen Verbindung der Formel II eine Resuspension des
25 rohen Gemisches in kaltem Wasser und eine Filtration beinhaltet.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die DNA Sequenz, welche für das genannte rekombinante monofunktionelle Enzym ko-
30 diert, entweder aus einem Mikroorganismus, insbesondere

21

aus der Familie der *Streptococcaceae*, vorzugsweise aus der *S.pyogenes* Art, zum Beispiel aus dem Stamm ATCC 19615, oder aus einem mutanten Stamm mit äquivalenter Funktion, isoliert wird, oder chemisch hergestellt wird.

- 5 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das genannte rekombinante monofunktionelle Enzym in einer immobilisierten Form auf einem Träger vorliegt, zum Beispiel auf einem Epoxy aktivierten Harz.
- 10 18. Verwendung einer rekombinanten monofunktionellen Glutamat-Formyltransferase für die regio-selektive N(5)-Formylierung von (6S)-5,6,7,8-Tetrahydropteroinsäure und Derivaten davon, welche in Formel I definiert sind.
- 15 19. (6S)-N(5)-Formyl-5,6,7,8-tetrahydropteroinsäure und Derivate davon, welche in Formel I definiert sind, erhältlich durch das Verfahren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 17.



I

II

R = OH

R = (L)-GlutamyI (= 5,6,7,8-THF)

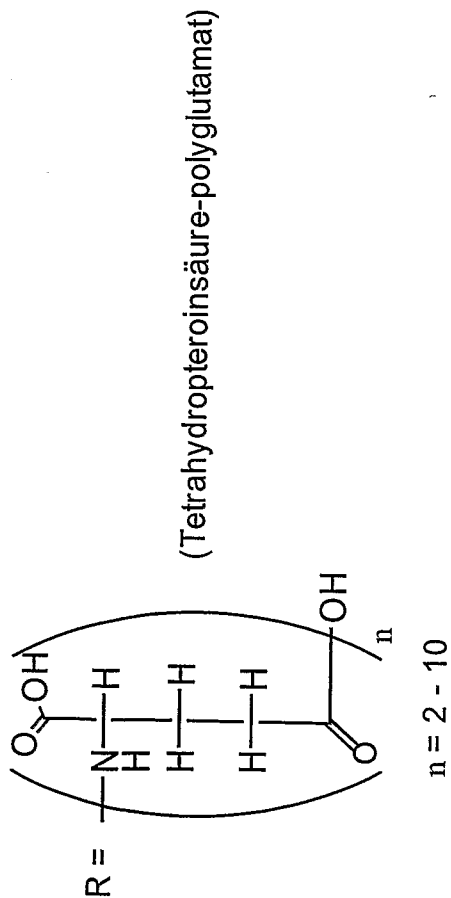


Fig 1

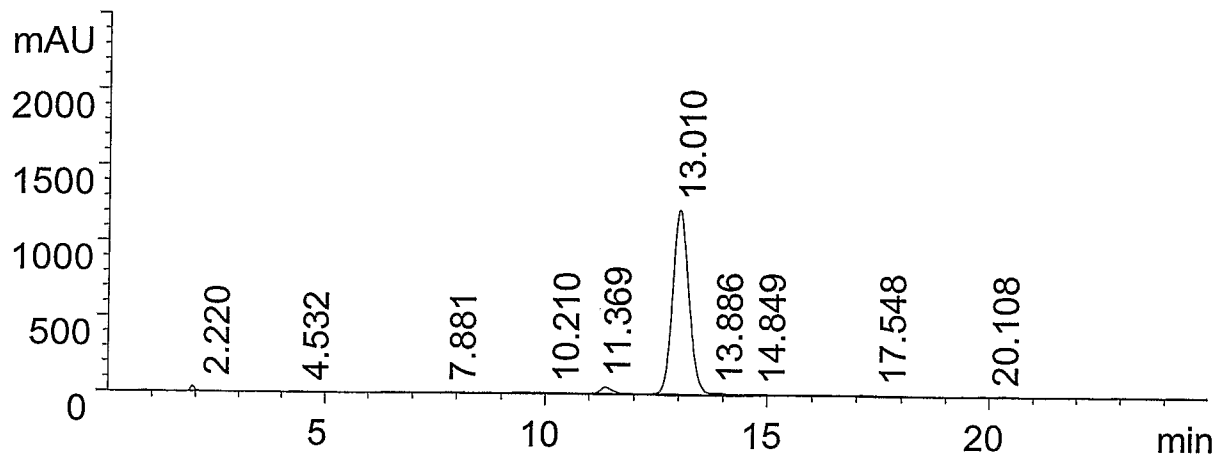


Fig 2

Peak #	Retentions- zeit	Höhe [mAU]	Fläche [mAU*s]	Fläche %
1	2.220	31.07	209.06	0.6321
2	4.532	2.09	66.41	0.2008
3	7.881	4.82	110.81	0.3350
4	10.210	1.82	105.51	0.3190
5	11.369	40.72	776.67	2.3484
6	13.010	1225.08	31262.10	94.5270
7	13.886	8.87	226.21	0.6840
8	14.849	2.65	45.47	0.1375
9	17.548	4.32	139.87	0.4229
10	20.108	3.02	130.04	0.3932

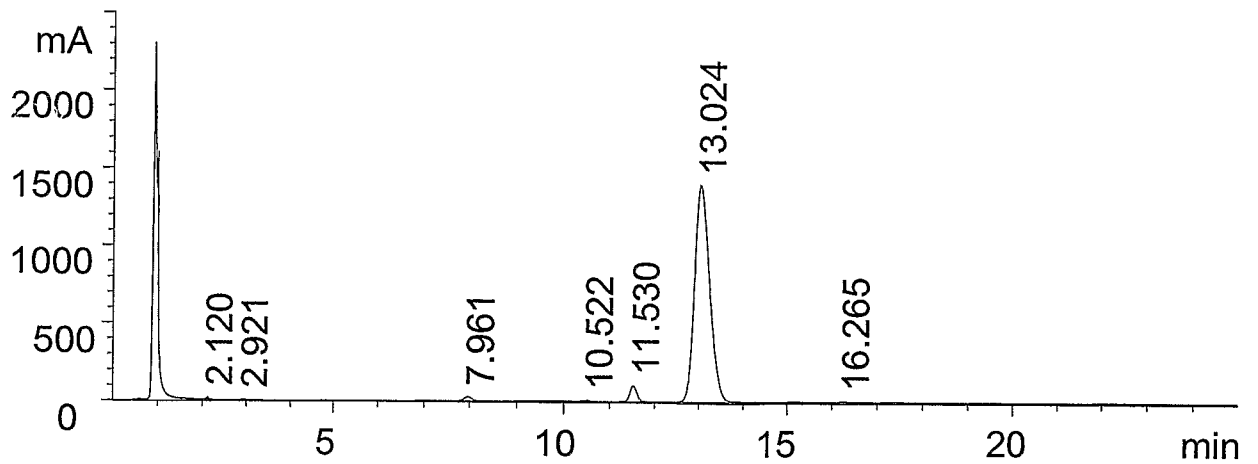


Fig 3A

Peak #	Retentions- zeit	Höhe [mAU]	Fläche [mAU*s]	Fläche %
1	2.120	17.57	54.22	0.1568
2	2.921	4.12	37.99	0.1098
3	7.961	26.29	316.80	0.9158
4	10.522	6.90	82.89	0.2396
5	11.530	103.87	1150.06	3.3247
6	13.024	1402.41	32887.60	95.0747
7	16.265	6.16	61.78	0.1786

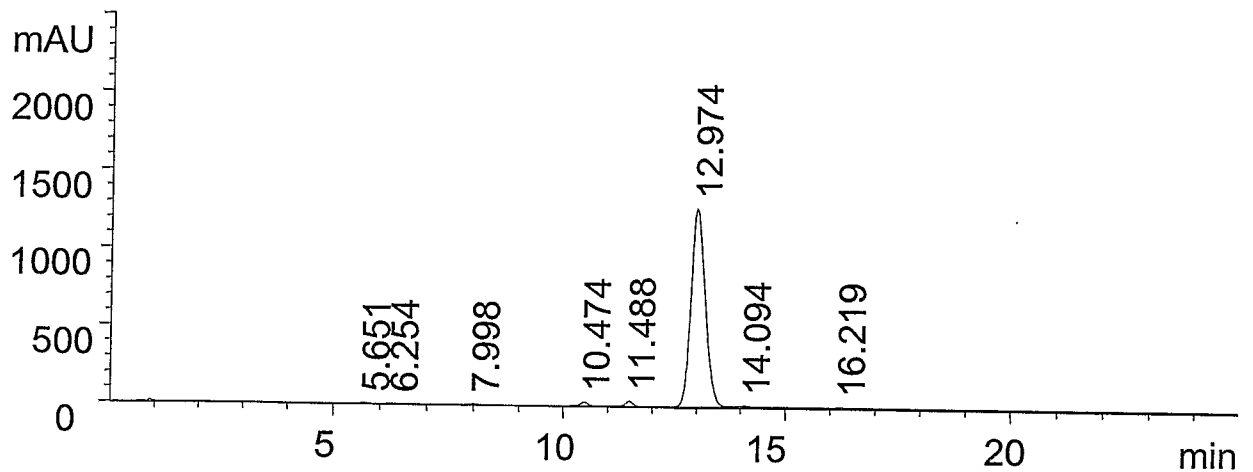


Fig 3B

Peak #	Retentions-zeit	Höhe [mAU]	Fläche [mAU*s]	Fläche %
1	5.651	3.67	46.44	0.1565
2	6.254	2.61	38.65	0.1303
3	7.998	4.62	58.78	0.1981
4	10.474	23.66	271.91	0.9165
5	11.488	33.29	396.89	1.3377
6	12.974	1274.22	28744.00	96.88
7	14.094	7.13	75.28	0.2537
8	16.219	3.76	37.24	0.1255