

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 97.847**

**REQUERENTE:** THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC., norte-  
-americana, industrial, em South Bend India  
na 46556 - ESTADOS UNIDOS AMERICA NORTE

**EPIGRAFE:** "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE B-HIDROXI-  
- AMINOÁCIDOS"

**INVENTORES:** MARVIN JOSEPH MILLER

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris  
de 20 de Março de 1883.

ESTADOS UNIDOS DA AMERICA DO NORTE, EM 4 DE JUNHO DE  
1990, SOB O No.07/532,845

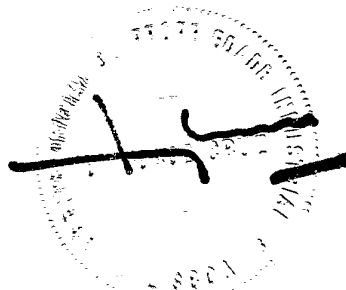
THE UNIVERSITY OF NOTRE DAME DU LAC  
"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE  $\beta$ -HIDROXI- $\alpha$ -AMINOÁCIDOS"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a preparação de  $\beta$ -Hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos os quais são obtidos por meio da condensação de aldeídos com glicina catalisada por hidroximetiltransferase de serina. O produto predominante com a maioria dos aldeídos é o diastereómero L-eritro. Por exemplo, éster metílico de semialdeído succínico é condensado com glicina no processo a fim de proporcionar éster monometílico de ácido L-eritro- $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-adípico.

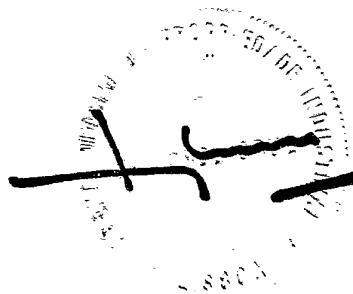


Este invento diz respeito a um processo para a preparação de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos. Em particular, diz respeito a um processo enzimático para a preparação de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos que se encontram substancialmente na forma L-eritro. .

Os  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos têm muitas utilizações, incluindo a utilização como compostos intermédios na preparação de antibióticos  $\beta$ -lactam. Ver, por exemplo, Mattingly, P.G.; Miller, M.J., J. Org. Chem. 1981, 46, 1557 e Miller, M.J., et al. J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 7026. São conhecidos vários métodos químicos de preparação de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos; contudo, a maioria apresenta uma ou mais desvantagens. Estas incluem a ausência de generalidade, controlo estereoquímico deficiente, exigência de agentes auxiliares quirais, ou produção, principalmente, dos isómeros treo (ou sin).

Os processos enzimáticos apresentam algumas vantagens óbvias relativamente aos processos químicos. Por exemplo, são realizados em sistemas aquosos sob condições suaves, sendo frequentemente estereoselectivos. A enzima utilizada no processo do invento é conhecida, de um modo geral, como uma aldolase. Uma dessas aldolases é a hidroximetiltransferase de serina (HMTS), L. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1982, 53, 83 e Schirch, L.; Gross, T. J. Biol. Chem. 1968, 243, 5651. Os papéis biológicos naturais das aldolases envolvem a transferência de unidades de um átomo de carbono para ou da serina e a dissociação retroaldol de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos tais como treonina e alg-treonina para dar origem a um aldeído e glicina.

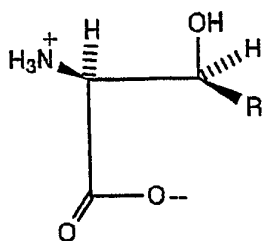
As aldolases existem em plantas, bactérias e animais, por exemplo, rebentos de milho, rebentos de feijão "mung", e fígado de coelho. O processo deste invento compreende a utilização de HMTS para preparar, sob condições suaves, precursores



$\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos de antibióticos  $\beta$ -lactam. O processo proporciona em muitos casos o  $\beta$ -hidroxi aminoácido na forma isomérica L-eritro que é a forma desejada do precursor proporcionando a forma diastereomérica correcta do antibiótico  $\beta$ -lactam.

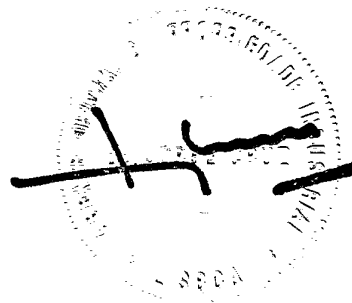
O invento proporciona um processo enzimático para a preparação de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos que compreende a incubação num meio aquoso a um valor de pH entre cerca de 7 e cerca de 8 e a uma temperatura entre cerca de 30°C e cerca de 55°C de glicina e de um aldeído alifático, por ex. acetaldeído ou butanal ou de um aldeído aromático, por ex. 2-furfural, com hidroximetiltransferase de serina (HMTS). Por exemplo, um éster de semialdeído succínico é convertido no processo em mono éster de ácido  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoadípico.

O processo aqui apresentado para a preparação de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos representados pela fórmula 1



compreende a mistura num meio aquoso a um valor de pH entre cerca de 5,5 e cerca de 9 de glicina e de um aldeído  $RCHO$  na presença de hidroximetiltransferase de serina e 5'-fosfato de piridoxal. O processo é levado a cabo a uma temperatura entre cerca de 30°C e cerca de 55°C e de preferência a cerca de 37°C.

As proporções relativas de glicina e do aldeído  $RCHO$  podem variar; todavia, os maiores rendimentos de produto parecem ser obtidos quando se utilizam quantidades equimolares. A

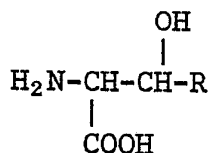


quantidade de enzima utilizada depende do grau de purificação da enzima e do efeito que quaisquer impurezas presentes possam ter sobre a actividade enzimática.

O pH do meio de reacção é tamponado a um valor entre 5,5 e cerca de 9 e, com a maioria dos substratos, de preferência a um valor de pH entre 7,0 e cerca de 8,0. Os tampões fosfato são adequados para se obter a gama de valores de pH desejada.

Como acontece com outras reacções enzimáticas, cofactores podem influenciar a especificidade relativamente ao substrato da enzima, bem como a eficiência da enzima na catálise da reacção de um dado substrato. Um cofactor essencial para a hidroximetiltransferase de serina no processo é o 5'-fosfato de piridoxal. Outros factores para além de FPL que podem ser adicionados têm um efeito benéfico sobre o rendimento do produto obtido com alguns substratos. Por exemplo, o ácido tetrahidrofólico intensifica a actividade da enzima na conversão do substrato piruvaldeído. Também o metavanadato de sódio serve como cofactor para a conversão do mesmo aldeído.

A fórmula 1 atrás referida apresenta os  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos proporcionados pelo processo na forma de sal interno. Esta forma sal é a quella que é esperada com o valor de pH do processo; todavia, a forma não-iónica representada pela fórmula

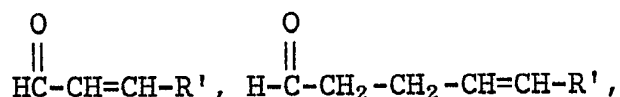


pode também existir sob outras condições.

O aldeído,  $\text{RCHO}$ , utilizado no processo, pode ser um alquil-, alquenil- ou alquinilaldeído de cadeia linear ou



ramificada ou um aldeído aromático ou heterocíclico. O aldeído pode apresentar grupos substituintes, por exemplo, alcoxi tal como metoxi ou etoxi, carboxi esterificado tal como ésteres  $C_1-C_4$  alquílicos do grupo carboxi; ciano; hidroxí; hidroxí acilado tal como formiloxi, acetoxi, propionoxi, ou butiloxi; halogénio tal como flúor ou cloro; haloalquilo tal como trifluorometilo ou clorometilo; ou o aldeído alifático pode conter grupos oxo por ex.  $RCHO$  pode ser um cetoaldeído tal como 4-oxopentanal ou piruvaldeído e outros análogos. O aldeído aromático ou aldeído heterocíclico pode igualmente estar substituído no anel aromático ou heterocíclico ou em qualquer sua porção alquilo ou alquênio. São exemplos de alquil-, alquênil- e alquinilaldeídos  $RCHO$  que podem ser usados no processo acetaldeído, propionaldeído, butiraldeído, valeraldeído, éster metílico de semialdeído succínico, éster benzílico de semialdeído succínico, 4-hidroxí-valeraldeído, éster metílico de semialdeído glutárico, piruvaldeído, O-formil-4-hidroxívaleraldeído, 3-fluorovaleraldeído, 5-clorovaleraldeído, 2-cloropropionaldeído, propargilaldeído, e aldeídos de alquenos representados pelas fórmulas



em que  $R'$  é hidrogénio ou  $C_1-C_4$  alquilo tal como acroleína, crotonaldeído e 4-pentenal.

São exemplos de aldeídos aromáticos e heterocíclicos  $RCHO$  para utilização no processo benzaldeído, tolualdeído, anisaldeído, veratrinaldeído, fenilacetaldeído, 3-fenilpropionaldeído, 2-fenilpropionaldeído, furfural, 2-(2-furil)acetaldeído, 3-furilacroleína, 3-fenilacroleína, 2-tiofenoaldeído, 3-(2-tienil)acroleína, 3-(metoxifenil)acroleína, e aldeídos aromáticos análogos.



No processo do invento, R da fórmula 1 é de preferência  $C_2-C_6$  alquenilo,  $C_2-C_6$  alquinilo, ou  $C_1-C_6$  alquilo substituído com carboxi esterificado,  $C_1-C_4$  alcanoxilo, ou um grupo  $C_1-C_6$  alquilo substituído com arilalcóxi. Na aceção em que é aqui usado, o termo  $C_2-C_6$  alquenilo diz respeito a cadeias hidrocarboneto insaturadas de estrutura linear ou ramificada tais como etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo e hexenilo;  $C_2-C_6$  alquinilo refere-se a grupos etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo e hexinilo que podem ter estrutura ramificada;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com carboxi esterificado refere-se a grupos alquilo de cadeia linear ou ramificada substituídos com um grupo carboxi esterificado em que o grupo éster é  $C_1-C_4$  alquilo, fenilo, benzilo, benzilo substituído tal como p-metoxibenzilo, metilbenzilo, p-nitrobenzilo, difenilmetilo, ou outros grupos protectores de carboxi convencionais. São exemplos de tais grupos etoxicarbonilmetilo, 2-(metoxicarbonil)etilo, 3-(t-butiloxicarbonil)propilo, 3-(benzilocarbonil)butilo, 5-(4-metoxibenzilocarbonil)hexilo, e grupos alquilo análogos substituídos com grupos carboxi esterificados. O termo  $C_1-C_6$  alquilo substituído com  $C_1-C_4$  alcóxi refere-se a metoximetilo, 2-etoxietilo, 4-t-butiloxibutilo, 3-isopropoxipentilo, 2-etoxietilo, 4-t-butiloxibutilo, 3-isopropoxipentilo, 2-etoxihexilo e outros grupos análogos;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com flúor ou cloro refere-se a grupos tais como 2-fluoroetilo, 2-cloroetilo, 4-clorobutilo, 5-cloropentilo, clorometilo, fluorometilo, 3-cloro-4-metilpentilo e outros grupos análogos;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com ciano refere-se a cianometilo, 2-cianoetilo, 4-cianobutilo, 3-cianobutilo, 5-cianohexilo e outros grupos análogos;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com hidróxi refere-se a hidroximetilo, 2-hidroximetilo, 4-hidroxibutilo, 3-hidroxipropilo, 3-hidroxihexilo, e outros grupos análogos;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com  $C_1-C_4$  alcanóilo refere-se a grupos tais como 2-acetoxietilo, 2-formiloxietilo, 3-acetoxipropilo, 4-propionoxibutilo e outros grupos análogos; e  $C_1-C_6$



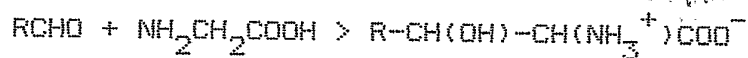
alquilo substituído com arilalcoxi refere-se a benziloximetilo, difenilmetoximetilo, 4-benziloxibutilo, 2-(4-metoxibenziloxi)etilo, 3-difenilmetoxipropilo, e outros grupos análogos.

Os aldeídos especialmente preferidos para utilização no processo são representados por  $RCHO$  em que  $R$  é um alquenoaldeído

$$\begin{array}{c} O \\ || \\ HC-CH_2-CH_2-CH=CH-R \end{array}$$
 tal como atrás foi definido, ou  $C_1-C_4$  alquilo substituído com um grupo carboxi esterificado ou um grupo  $C_1-C_4$  alcanciloxi. São exemplos de tais grupos 2-(metoxicarbonil)etilo, 2-(benziloxicarbonil)etilo, 3-(etoxicarbonil)propilo, 2-(formiloxi)etilo e 2-acetoxietilo.

Os aldeídos,  $RCHO$ , usados no processo são todos compostos conhecidos disponíveis no mercado ou que podem ser preparados por métodos convencionais. Um processo preferido do invento compreende a utilização do aldeído  $RCHO$  em que  $R$  é 2-(carboxi esterificado)etilo, 2-cianoetilo, 2-(carboxi esterificado)etinoilo, 2-(carboxi esterificado)vinilo, 3-(carboxi esterificado)propilo, 2-formiloxietilo, 2-acetoximetilo, 3-formiloxipropilo, ou 3-acetoxipropilo, em que a fracção éster do grupo carboxi esterificado é  $C_1-C_4$  alquilo, por ex. metilo, etilo ou t-butilo; fenilo, benzilo, difenilmetilo, tritilo ou benzilo substituído por ex. 4-metoxibenzilo ou 4-nitrobenzilo. Um aldeído especialmente preferido para utilização no invento é um éster de semialdeído succínico. Um outro aldeído especialmente preferido é um éster de semialdeído glutárico.

O diagrama que se segue ilustra a reacção que tem lugar no processo deste invento.

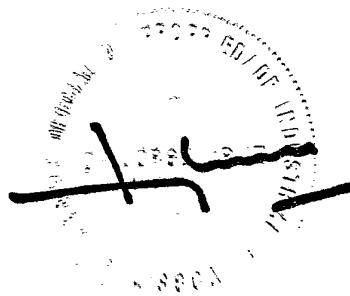


em que R é tal como atrás foi definido.

Tal como atrás se descreveu, a hidroximetiltransferase de serina pode ser obtida a partir de uma variedade de fontes. Três dessas fontes são fígado de coelho (LaVerne Schirch e Merle Mason, J. Biol. Chem., Vol. 237, Nº 8, Agosto 1962), rebentos de milho (Masuda, T., et al., Agric. Biol. Chem. 1986, 50, 2763) e rebentos de feijão "mung" (Rao, D.N. e Rao, N.A., Plant Physiol. 1982, 69, 11).

No Quadro 1 a seguir é apresentada uma lista de substratos aldeído representativos que foram convertidos no processo em  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos com HMTS de duas origens. A conversão dos substratos do Quadro 1 foi levada a cabo incubando o substrato e glicina com HMTS sob as condições do processo. Uma série de condições do processo usadas eram comum a todos os substratos e são especificadas nos parágrafos que se seguem. As exceções, quando existiram, estão indicadas em cada caso.

As incubações foram realizadas em tampão fosfato 10 mM, pH 7,3 contendo 5'-fosfato de piridoxal a uma concentração de cerca de 80  $\mu$ M. Todas as soluções foram preparadas a partir de água destilada e desionizada para obtenção dos melhores resultados. As conversões foram realizadas a 37°C em frascos selados de polipropileno próprios para microcentrifugadora de 500  $\mu$ l num banho de água de temperatura constante. Os frascos foram protegidos da luz excepto quando foram removidos do banho de água para remoção das partes alíquotas para análise. Com todas as conversões foi realizada uma incubação "em branco" paralelamente à incubação de HMTS. O volume total da mistura de incubação era tipicamente de 200  $\mu$ l. As condições na incubação "em branco"



eram idênticas às da mistura de incubação, à excepção da ausência da enzima.

QUADRO 1  
Substratos aldeído (RCHO) para HMTS

| Aldeído (RCHO)<br>R =                                                            | Enzima <sup>1</sup><br>Fígado de Coelho | Rebentos de<br>Milho |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------|
| -CH <sub>3</sub>                                                                 | +                                       | +                    |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                 | +                                       | ND                   |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                                                 | ND                                      | +                    |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>                 | +                                       | +                    |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | +                                       | ND                   |
| -CO <sub>2</sub> H                                                               | -                                       | -                    |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> | +                                       | +                    |
| -C(O)CH <sub>3</sub> <sup>2</sup>                                                | +                                       | +                    |
| -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OCHO                            | +                                       | ND                   |
| C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                                    | +                                       | -                    |
| -CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                  | ND                                      | +                    |
| 2-furilo                                                                         | +                                       | +                    |
| 2-(2-furilo)etilo                                                                | +                                       | -                    |

1/ + = conversão; - = conversão não detectável; ND = não determinada.

2/ Com fígado de coelho estava presente HMTS VO<sub>3</sub><sup>-</sup> e com milho estava presente tetrahydrofolato de HMTS.



O processo pode ser seguido relativamente à produção de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácido mediante remoção de partes alíquotas da mistura de incubação de tempos a tempos e análise das amostras por meio de separação por CLEP e detecção de fluorescência de isóndoles derivados de o-ftalaldeído de todos os compostos de aminas primárias presentes na mistura. O procedimento experimental é descrito por Jones, B.N.; Gilligan, J.P., J. Chrom. 1983, 266, 471; Jones, B.N. et al., J. Liq. Chrom. 1981, 4, 565, e Simons, Jr., S. S. et al., J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 7098. A análise por CLEP tanto da mistura de incubação como da incubação "em branco" permitiu a determinação de qual ou quais pico(s) no cromatograma podiam ser atribuídos a produtos enzimáticos.

O processo do invento é levado a cabo adicionando o aldeído a uma solução tamponada de glicina contendo FLP e outro cofactor e depois misturando uma solução tamponada da enzima. Alternativamente, a solução tamponada de glicina contendo FLP e a solução de enzima são misturadas e o aldeído é depois adicionado. É também possível adicionar a solução de enzima a uma solução do aldeído e glicina na presença da solução tampão contendo FLP.

Não é necessário que o aldeído, RCHO, esteja completamente dissolvido para se dar a sua conversão no processo. Os aldeídos que são apenas parcialmente solúveis no meio de reacção aquoso também servem de substrato para a enzima.

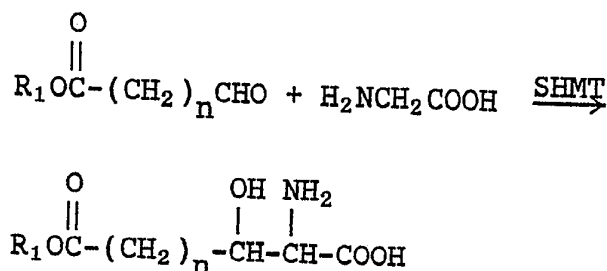
O processo do invento em que o aldeído, RCHO, é um aldeído alifático (i.e. o carbono ligado ao grupo carbonilo da função aldeído está saturado,  $\text{CH}_2$ ) proporciona preferencialmente o diastereómero L-eritro do  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácido ou éster. Todavia, quando o substrato aldeído é aromático (i.e. o carbono ligado ao carbonilo da função aldeído faz parte de um sistema aromático) o produto é obtido em ambas as formas treo e eritro em

quantidades aproximadamente iguais. Por exemplo, o benzaldeído forma tanto o isômero treó como o eritro de β-fenilserina.

São exemplos de β-hidroxi-α-aminoácidos obtidos no processo do invento β-fenilserina, β-(2-furil)serina, ácido β-hidroxi-α-aminoadípico, ácido β-hidroxi-α-aminoheptanóico, ácido β-hidroxi-α-amino-Ω-formiloxihexanóico, ácido β-hidroxi-α-amino-Γ-oxoaléxico, ácido β-hidroxi-α-amino-Γ-fenilbutírico, ácido β-hidroxi-α-aminoheptanóico, ácido β-hidroxi-α-amino-Γ(2-furil)-pentanóico, e aminoácidos análogos.

Numa forma de realização preferida do processo, um éster de semialdeído succínico tal como um éster C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquílico por ex. o éster metílico ou o éster isopropílico é incubado com glicina e HMTS em tampão fosfato na presença de FLP a fim de dar origem ao semiéster de ácido β-hidroxi-α-aminoadípico sob a forma do isômero L-eritro. Numa outra forma de realização preferida do processo, um éster de semialdeído glutárico, por ex. o éster metílico, é incubado com HMTS a fim de proporcionar o semiéster de ácido β-hidroxi-α-aminopimélico.

As duas formas de realização do invento atrás referidas são ilustradas pelo esquema de reacção seguinte.



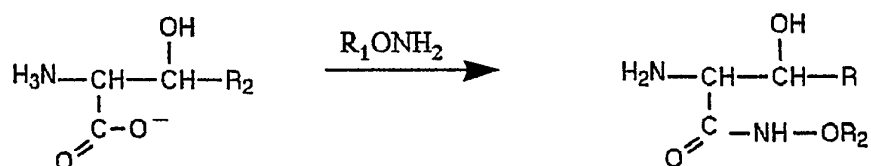
em que R<sub>1</sub> é C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquílo, fenilo, benzilo, difenilmetilo, 4-metoxibenzilo ou 4-nitrobenzilo e n é 2 ou 3.

Este invento proporciona ainda o aminoácido, ácido  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoadípico, os seus sais e ésteres mono- e di- $R_1$  representados pela fórmula  $R_1OOC-CH_2-CH_2-CH(OH)CH(NH_2)COOR_1'$ , em que  $R_1$  é tal como foi atrás definido e  $R_1'$  é hidrogénio ou  $R_1$ . Este aminoácido é obtido no processo na forma L-eritro. Os sais do seu diácido ou monoéster podem formar-se por métodos convencionais. Esses sais incluem os sais de metais alcalinos tais como sais de sódio e potássio, os sais de metais alcalino-terrosos tal como o sal de cálcio, e os sais de amónio e sais de amina tais como aqueles que se formam com benzilamina, dibenzilamina, ciclohexilamina, diciclohexilamina,  $C_1$ - $C_4$  alquilaminas primárias e secundárias tais como metilamina, etilamina, dietilamina, di-(n-butil)amina, etanolamina, dietanolamina, dipropanolamina, e sais análogos. Esses sais são úteis no isolamento e purificação do diácido ou de um seu monoéster e proporcionam formas do aminoácido estáveis para armazenamento. Também são proporcionados os sais de adição de ácido formados com o aminoácido e os seus ésteres. Tais sais são formados com ácidos que são mais fortes do que os grupos ácido carboxílico acidicos do aminoácido. São exemplos de tais ácidos os ácidos clorídrico, bromídrico, fosfórico e sulfúrico, e os ácidos sulfónicos tais como ácido toluenossulfónico, ácido naftalenossulfónico, ácido metanossulfónico e ácido n-butanossulfónico.

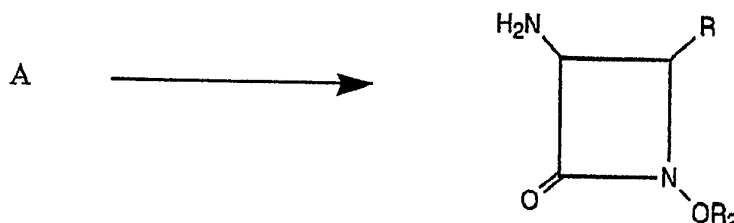
Os seus ésteres  $R_1$  dizem respeito aos mono- e diésteres em que  $R_1$  tem os mesmos significados que foram atrás referidos para os esquemas de reacção. São exemplos desses ésteres os seus ésteres monometílico, monoetilico, dimetílico, dietílico, t-butílico, e di-t-butílico, benzílico, 4-metoxibenzílico e dibenzílico.

Os  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos proporcionados pelo processo deste invento são compostos intermédios úteis para importantes compostos  $\beta$ -lactam. Os produtos são convertidos por métodos

conhecidos em compostos  $\beta$ -lactam que são úteis na preparação de antibióticos conhecidos. Por exemplo, os  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos são convertidos em derivados hidroxamato e estes são ciclizados para formar compostos  $\beta$ -lactam 3-amino-4-substituídos, como se mostra no esquema de reacção seguinte



A



B

em que R tem os mesmos significados que foram atrás definidos para a fórmula 1 e  $\text{R}_2$  é um grupo alquilo, alcenoilo ou aralquilo. A formação do hidroxamato e a ciclização do hidroxamato para dar origem ao composto  $\beta$ -lactam são levadas a cabo pelo método descrito por Miller, M.J. *Accts. Chem. Res.* **1986**, *19*, 49; Rajendra, G. e Miller, M. J. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 6257; e Kolasa, T. e Miller, M. J. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 1861.

Alternativamente, os  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos podem ser convertidos em N-(metil substituído) azetidinonas como é descrito por Miller, M. J., Patente dos E.U.A. Nº 4,595,532. Além disso, e adicionalmente, os aminoácidos do processo podem ser



convertidos nas N-(fosfonometil) azetidinonas descritas por Miller, M.J., Patente dos E.U.A. Nº 4,820,815.

As preparações e exemplos que se seguem descrevem adicionalmente o processo do invento, não devendo de modo algum ser entendidos como constituindo uma limitação.

Preparação de Hidroximetiltransferase de Serina a partir de Rebentos de Milho

Todos os procedimentos a seguir descritos foram realizados a 4°C. Rebentos de milho com 5-7 dias lavados foram homogeneizados num misturador Waring em monohidrogenofosfato de potássio 100 mM contendo etilenodiaminatetraacetato dissódico (EDTA) 1 mM, ditiotreitol 1 mM e 5'-fosfato de piridoxal 125 µM. A mistura continha aproximadamente 960 g de rebentos por litro. O homogenado foi filtrado através de pano queijeiro e o filtrado foi submetido a um processo de precipitação com sulfato de amónio. A proteína que precipitou com 35-50% de saturação em sulfato de amónio após centrifugação a 13,800 x g durante 40 minutos foi dissolvida em tampão fosfato 10 mM, pH 7,8, contendo 5'-fosfato de piridoxal 125 µM e EDTA 1 mM. A solução foi submetida a diálise e concentrada para 5-15 mg de proteína/ml na mesma solução tampão sem a presença de EDTA. O teste de presença de actividade de aldolase da proteína consistiu num sistema acoplado entre o retroaldol catalisado por aldolase de L-alg-treonina com a redução NADH (forma reduzida de dinucleótido de nicotinamida e adenina)-dependente do acetaldeído resultante por desidrogenase de álcool de levedura (ADH). A actividade específica tinha o valor médio de 78 miliunidades/mg de proteína. Uma unidade de actividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para provocar a variação do valor da densidade óptica em uma unidade (a 340 nm) por minutos à temperatura

ambiente na presença de ADH, L-alg-treonina 120 mM, FLP 125  $\mu$ M, e NADH 120  $\mu$ M em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5.

AHMTS quando não usada uma vez preparada foi guardada quer sob forma liofilizada ou congelada com glicerol a 10%.

Nos exemplos que se seguem, e salvo indicação em contrário, o sistema tampão era constituído por fosfato de potássio 10 mM, pH 7,3, e continha 5'-fosfato de piridoxal (FLP) a uma concentração de cerca de 80  $\mu$ M. Todas as soluções foram preparadas em água destilada e desionizada.

As incubações com a enzima foram levadas a cabo a 37°C em frascos selados de polipropileno próprios para microcentrifugadoras de 500  $\mu$ l, num banho de água de temperatura constante.

Os tempos de retenção indicados nos exemplos podem variar ligeiramente de tempos a tempos nas análises por CLEP devido a ligeiras variações em factores como a coluna, o equilíbrio, as soluções tampão, etc.

A AHMTS utilizada nos exemplos que se seguem foi obtida a partir de fígado de coelho, por L. Schirch (atrás referido).

#### Exemplo 1

##### Preparação de Treonina

Uma solução de glicina (34 mM) foi preparada no tampão fosfato contendo FLP, e adicionou-se acetaldeído recentemente destilado em quantidade suficiente para que a sua concentração fosse também 34 mM. Quando adicionados à solução de enzima, a concentração de cada substrato era de 17 mM.



Uma solução de HMTS (0,1 mg) em 200  $\mu$ l do tampão fosfato padrão foi colocada num frasco de vidro de 2 ml. Adicionou-se igual volume da solução de substrato e o frasco foi selado com um septo de borracha e fio de cobre para minimizar a perda de acetaldeído. Este frasco e uma solução de enzima "em branco" foram incubadas a 37°C.

Partes alíquotas (10  $\mu$ l) foram removidas através de uma seringa microlitro de 50 $\mu$ l ao fim dos seguintes tempos de incubação: 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 20,5 horas e analisadas por meio de CLEP.

O cromatograma revelou o maior pico para o isômero L-eritro ao valor de tempo de retenção de 21,9 minutos e um pico menor para o isômero treo. A identidade dos aminoácidos produzidos foi confirmada por co-injeção com isômeros de treonina autênticos disponíveis no mercado.

#### Exemplo 2

##### Ácido $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxicapróico

Uma solução de substrato foi preparada dissolvendo glicina (25,5 mg, 0,340 mmol) e n-butanal (25,3 mg, 0,351 mmol) em 10 ml do tampão fosfato padrão, proporcionando concentrações de 34 mM e 35 mM dos dois substratos, respectivamente.

Uma solução de HMTS (0,1 mg) em 100  $\mu$ l de solução tampão foi colocada num frasco de polipropileno de 0,5 ml. Outros 100  $\mu$ l de solução tampão sem enzima foram colocados noutro frasco, e adicionaram-se a cada frasco 100  $\mu$ l da solução de substrato.

Foram retiradas partes alíquotas das soluções de enzima e "em branco" ao fim dos seguintes tempos de incubação: 1,0, 3,0, 7,25 e 21 horas, que foram analisadas por meio de CLEP.

Observaram-se dois picos de produto no cromatograma, um grande aos 25,7 minutos e um pequeno aos 24,3 minutos. Os picos correspondiam aos de produto racêmico autêntico. O material autêntico foi preparado racemicamente mediante uma reação de aldol sobre um complexo de cobre de glicina, S. Akabari et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 83, 1, e J. P. Greenstein e M. Winitz, "Chemistry of Amino Acids" (Química dos Aminoácidos), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1961, Vol. 3, pp 2249-2250.

### Exemplo 3

Éster monometílico de ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxidípico

Glicina (13,3 mg, 0,177 mmol) e éster metílico de semialdeído succínico (20 mg, 0,172 mmol) foram dissolvidos em 5,0 ml de solução tampão para proporcionar concentrações de cada de 35 mM e 34 mM, respectivamente. O aldeído usado nesta experiência estava isento de DMSO, embora incubações prévias com este aldeído contivessem ainda a impureza (resíduo resultante da sua síntese por ozonólise de  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_3$  seguida por processamento com dimetilsulfóxido).

A uma solução de HMTS (0,1 mg) em 100  $\mu\text{l}$  de solução tampão adicionaram-se 100  $\mu\text{l}$  da mistura de substrato. Foram retiradas partes alíquotas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 e 24 horas.



O pico de produto maior (L-eritro) foi observado a um valor de  $t_R$  de 22,5 minutos atingindo o seu máximo às duas horas.

Durante as duas horas iniciais, surgiu na análise por CLEP um pequeno pico novo com um tempo de retenção de aproximadamente 8 minutos. Durante um período de 24 horas este pico aumentou de intensidade enquanto os picos correspondentes à glicina de partida e ao produto intermédio éster metílico de ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiadípico diminuíam. Passadas 24 horas, a proporção entre o novo pico e os da glicina e do éster era de 38:47:15. A estrutura do composto que correspondia ao novo pico foi determinada como sendo ácido L-eritro- $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiadípico ( $R = CH_2-CH_2-CO_2H$ ) por uma síntese independente e co-injecção do produto autêntico com aquele que foi produzido enzimaticamente. A síntese química do material autêntico foi realizada por meio de condensação de aldol do éster metílico de semialdeído succínico com um enolato de boro de uma oxazina quiral (Reno, D. S.; Lotz, B. T.; Miller, M. J. Tetrahedron Lett., 1970, 31, 827), seguida de desprotecção e hidrólise para dar origem ao composto descrito.

A formação deste aminoácido de origem durante a síntese enzimática dá-se por hidrólise do éster monometílico do aminoácido inicialmente produzido. Uma vez que o produto possui um grupo ácido carboxílico ionizado adicional não constitui um substrato para a condensação de aldol enzimaticamente reversível. Assim, o novo produto aminoácido (ácido L-eritro- $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiadípico) acumula-se. Enquanto produto aminoácido ácido dicarboxílico, pode ser purificado a partir da mistura de reacção por meio de cromatografia de permuta iónica (Greenstein, J. P., Winitz, M., "Chemistry of the Amino Acids" (Química dos Aminoácidos) Vol. 2, pp 1452-1460, Wiley, Nova Iorque, N.Y. 1961).



#### Exemplo 4

éster mono-isopropílico de ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiadípico

Glicina (26,1 mg, 0,348 mmol) foi dissolvido em 10,0 ml de solução tampão e adicionaram-se 34 mg de éster isopropílico de semialdeído succínico (contendo DMSO como contaminante proveniente da sua preparação). A presença de DMSO na incubação não tem quaisquer efeitos nocivos sobre a enzima ou a reacção. A concentração de aldeído na solução tampão, depois de levada em linha de conta a presença de DMSO, era de 18 mmolar. As concentrações iniciais de glicina e aldeído na mistura de incubação eram de 17,4 mM e 9 mM respectivamente.

A mistura de substrato (100  $\mu$ l) foi adicionada a uma solução de HMTS (0,1 mg) em 100  $\mu$ l de solução tampão e à preparação "em branco".

Partes alíquotas foram recolhidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 17,25, 25, e 52 horas e examinadas por meio de CLEP. O pico de produto principal (L-eritro) apareceu a um valor de  $T_R$  de 25 minutos, ao fim de 0,5 horas e cresceu até um máximo no espaço de 2-4 horas.

#### Exemplo 5

éster monometílico de ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxipimélico

O éster metílico de semialdeído glutárico usado nesta incubação continha DMSO numa proporção de cerca de 1:1 em peso. O DMSO é um produto secundário da preparação do aldeído por ozonólise de 1-metoxiciclopenteno que inclui DMSO no



processamento, (Cline, D. L. J.; Russel, C. G., Tetrahedron Lett., 1980, 36, 1399). A solução de substrato foi preparada mediante dissolução de glicina (25,6 mg, 0,341 mmol) e da mistura aldeído/DMSO (66,7 mg) em 10,0 ml de solução tampão para proporcionar concentrações de glicina e aldeído de 34,1 e aproximadamente 25 mM.

A solução de enzima consistia em 0,1 mg de HMTS dissolvida em 40  $\mu$ l de solução tampão em vez de 100  $\mu$ l. A solução de substrato (40  $\mu$ l) foi adicionada às soluções de enzima e "em branco" e incubada do modo usual. Foram recolhidas partes alíquotas (10  $\mu$ l) ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0 e 17,0 horas. Passadas 0,5 horas surgiu na CLEP um pico produzido pela enzima a 23,7 minutos correspondente ao produto desejado e intergrando um rendimento de cerca de 20%. Um segundo pico mais pequeno induzido pela enzima apareceu com um tempo de retenção de 22,3 minutos, podendo corresponder a uma quantidade ínfima do isómero treo.

#### Exemplo 6

##### Acido $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-Toxovalérico

Glicina (25,5 mg, 0,0340 mmol) e piruvaldeído (61,1 mg de uma solução a 40% em peso, 0,327 mmol de piruvaldeído) foram dissolvidos em 10 ml de solução tampão, pH 7,2, para proporcionar concentrações de 34 mM (glicina) e 32,7 mM (piruvaldeído) na solução "stock". Adicionou-se metavanadato de sódio (1,5 mg de composto puro a 90% de Aldrich). Passados 30 minutos tinha-se dissolvido, proporcionando uma concentração de 1,11 mM.

A solução de enzima (0,1 mg de HMTS em 80  $\mu$ l) adicionaram-se 80  $\mu$ l da solução de substrato. Parte alíquotas (10  $\mu$ l)

foram removidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 29 e 53 horas.

A análise de aminoácidos por meio de CLEP indicou um tempo de retenção de 8,5 minutos para o novo aminoácido. Para confirmar que se tratava do aminoácido desejado, preparou-se material racêmico autêntico pelo procedimento de glicianato de cobre. Assim, 4,23 g de glicianato de cobre (II) (20 mmol) foram dissolvidos em 10 ml de solução aquosa de KOH 9M. Adicionou-se piruvaldeído (16,2 ml de uma solução a 40% em peso em água, correspondendo a 7,0 g, 9,71 mmol de aldeído). Passadas 5,25 horas, adicionou-se  $\text{NH}_4\text{OH}$  3M (40 ml) à solução castanha resultante e os solventes foram evaporados para proporcionar um óleo castanho. O óleo foi passado através de uma coluna de Dowex-50 (forma  $^+\text{NH}_4$ ), com eluição com água para proporcionar o aminoácido semipurificado.

#### Exemplo 7

##### Ácido $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-6-formiloxihexanóico

O aldeído nesta incubação retinha ainda uma quantidade significativa de DMSO da sua preparação por meio de ozonólise de di-hidropirano seguida por processamento com DMSO. A 10,0 ml de solução tampão adicionaram-se 4-hidroxibutanal de O-formilo (39,5 mg, cerca de 0,20 mmol, tendo em conta o DMSO) e glicina (25,5 mg, 0,340 mol).

A solução de substrato (40  $\mu\text{l}$ ) foi adicionada à solução de enzima (0,1 mg de HMTS em 40  $\mu\text{l}$ ) e à solução "em branco". As concentrações dos dois substratos na mistura de incubação eram de 17 mM (glicina) e 10 mM (aldeído). Partes alíquotas (10  $\mu\text{l}$ )



foram recolhidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 7,0 e 24 horas.

A análise de aminoácidos da primeira parte aliquotea revelou dois novos aminoácidos. Um pequeno pico surgiu aos 15,6 minutos, logo após o pico da glicina. O outro era um pico grande e acentuado, aos 22,5 minutos. As três horas, o pico aos 22,5 minutos correspondente ao aminoácido esperado atingiu um máximo a cerca de 10% do pico de glicina e depois decresceu lentamente, enquanto o pico aos 15,6 minutos aumentou ligeiramente de intensidade. O aminoácido que se elui aos 15,6 minutos é o produto da hidrólise lenta do éster formato no meio de reacção. A estrutura corresponde ao ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-6-hidroxihexanóico.

#### Exemplo 8

##### $\beta$ -Fenilserina

A solução tampão utilizada continha FLP numa concentração de 160  $\mu$ M em vez de 80  $\mu$ M. Destilou-se benzaldeído imediatamente antes da sua utilização. A solução tampão foi desoxigenada fazendo borbulhar nela azoto antes de adicionar os substratos. Isto foi feito para minimizar a possibilidade do benzaldeído ser oxidado enquanto em solução.

Em 10,0 ml de solução tampão dissolveram-se glicina (25,4 mg, 0,338 mmol) e benzaldeído (35  $\mu$ l, 0,344 mmol). Esta solução (100  $\mu$ l) foi adicionada a 100  $\mu$ l da solução de HMTS (0,1 mg de enzima). Partes aliquoteas foram recolhidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 1,0, 5,25 e 7,0 horas.

Eram visíveis nos cromatogramas dois picos de produto, o maior aos 24,8 minutos e o mais pequeno aos 23,7 minutos. A



mistura de produtos desta experiência foi comparada com a  $\beta$ -fenilserina autêntica, racêmica, disponível no mercado. Os picos das duas misturas coincidiam exactamente. Além disso, quando comparado por meio de co-injecção com treó  $\beta$ -fenilserina autêntica, o primeiro pico (mais pequeno) era intensificado relativamente ao mais tardio. Estes resultados indicam que a enzima produz ambos os pares de enantiómeros dos aminoácidos aromáticos, embora favoreça os isómeros eritro.

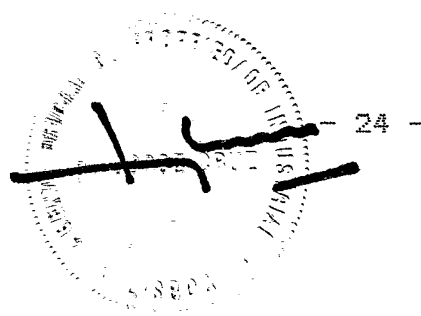
#### Exemplo 7

##### Acido $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi- $\beta$ -(2-furil)propiónico

O 2-furfural usado neste exemplo foi preparado por meio de duas destilações sobre carbonato de sódio com a segunda destilação sob uma atmosfera de azoto. O aldeído destilado foi guardado, antes da sua utilização, exsiccado, sob uma atmosfera de azoto e protegido da luz.

A solução de substrato foi preparada por dissolução de glicina (14,0 mg, 0,186 mmol) e furaldeído (15,5  $\mu$ l, 0,187 mmol) em solução tampão (10,0 ml). Quando 360  $\mu$ l desta solução foram adicionados à solução de enzima (0,2 mg de HMTS em 40  $\mu$ l), a concentração de cada substrato passou a ser de 17 mM.

Partes alíquotas (10  $\mu$ l) foram recolhidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 1,0, 2,0, 4,0, 5,0, 18, 24, 72 e 114 horas. Ao fim de 1 hora, a análise por meio de CLEP revelou a produção de dois novos aminoácidos. O pico maior que corresponde a um isómero tinha um período de retenção de 21-22 minutos, enquanto o pico mais pequeno (< 50% do pico maior) correspondia ao outro isómero (treó) e tinha um tempo de retenção de 19-20 minutos.



#### Exemplo 10

Ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi- $\delta$ -(2-furil)valérico

A solução de substrato foi preparada dissolvendo glicina (25,5 mg, 0,340 mmol) e o aldeído (46,3 mg, 0,373 mmol) em 10,0 ml de solução tampão. O aldeído (um líquido) levou cerca de quinze minutos a dissolver.

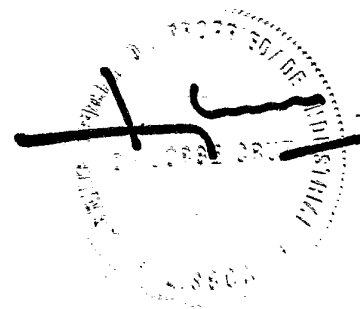
A solução de substrato (100  $\mu$ l) foi adicionada à solução de enzima (0,1 mg de HMTS em 100  $\mu$ l de solução tampão) e incubada a 37°C. partes alíquotas foram recolhidas ao fim dos seguintes períodos de incubação: 0,55, 1,0, 2,0, 4,25, 8,0 e 21 horas. Ao fim de 0,5 horas a análise por CLEP revelava um pico com um tempo de retenção de 21,3 minutos, indicando uma conversão em cerca de 3% de glicina no produto aldol.

#### Exemplo 11

Obtém-se ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-hex-5-enóico seguindo os procedimentos de incubação descritos nos exemplos anteriores com aldeído propargílico.

#### Exemplo 12

Obtém-se ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-hex-5-enóico com aldeído alílico sob as condições de incubação descritas nos exemplos anteriores.



Exemplo 13

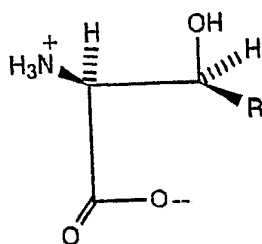
Obtém-se ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi-pent-4-enóico com acroleína seguindo os procedimentos e sob as condições descritas nos exemplos anteriores.

Exemplo 14

Produz-se ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxi- $\delta$ -cianovalérico sob as condições dos exemplos anteriores com  $\beta$ -cianopropionaldeído.

# REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a preparação de um  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácido de fórmula:



1

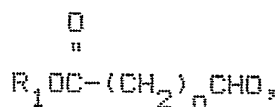
em que R é  $C_2-C_6$  alquenilo;  $C_2-C_6$  alquinilo;  $C_1-C_6$  alquilo substituído com carboxi esterificado,  $C_1-C_4$ -alcoxi, fluoro, cloro, bromo, ciano, hidroxila,  $C_1-C_4$ -alcanciloxi, fenilo, furilo, ou benziloxi; fenilo; ou furilo;

caracterizado por compreender a mistura, a uma temperatura entre cerca de  $30^{\circ}\text{C}$  e cerca de  $55^{\circ}\text{C}$ , numa solução aquosa com um pH entre cerca de 5,5 e cerca de 9, de um aldeído de fórmula  $\text{RCHO}$ , em que R tem os significados atrás definidos, e glicina com hidroximetiltransferase de serina na presença de 5'-fosfato de piridoxal.

2a. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por R ser  $C_2-C_6$  alquenilo,  $C_2-C_6$  alquinilo, ou  $C_1-C_6$  alquilo substituído com carboxi esterificado,  $C_1-C_4$  alcanciloxi, ou alquilo substituído com arilalcoxi.

32. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por R ser ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo substituído com carboxi esterificado, ou C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alcanoiloxi.

42. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o aldeído RCHO ser:



em que R<sub>1</sub> é C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alquilo, benzilo, difenilmetilo, 4-metoxibenzilo ou 4-nitrobenzilo; e n é 2 ou 3.

52. - Processo de acordo com a Reivindicação 4, caracterizado por o aldeído RCHO ser éster metílico de semialdeído succínico.

62. - Processo de acordo com a Reivindicação 4, caracterizado por o aldeído RCHO ser éster metílico de semialdeído glutárico.

72. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por R ser C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo substituído com carboxi esterificado, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alcanoiloxi, fenilo, furilo ou benziloxi.

82. - Processo de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por o α-amino-β-hidroxiácido ser o diastereómero L-eritro.

Lisboa, 3 de Junho de 1991

  
**J. PEREIRA DA CRUZ**  
Agente Oficial da Propriedade Industrial  
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º  
1200 LISBOA