

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 883151 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **883151**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12P 7/40

C12P 41/00

C12N 1/20

C12N 9/18

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **01.07.1988**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **01.07.1988**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.01.1989**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

02.07.1987 GB 8715574

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Gist-Brocades N.V., Wateringseweg 1, 2600 MA Delft, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Shell Internationale Research Maatschappij B.V., Carel Van Bylandtlaan 30, 2596 HR Den Haag, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Bertola, Mauro Attilio, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •De Smet, Marie Jose, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Marx, Arthur Friedrich, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

4 •Phillips, Gareth Thomas, United Kingdom, ISO-BRITANNIA, (GB)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Oy Jalo Ant-Wuorinen Ab, Iso Roobertinkatu 4 - 6 A, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä 2-aryylioksiipropionihappojen valmistamiseksi.

Förfarande för framställning av 2-aryloxipropionsyror.

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

11945 ATCC
679.85 CBS

340.87 CBS
805.85 CBS

341.87 CBS

342.87 CBS

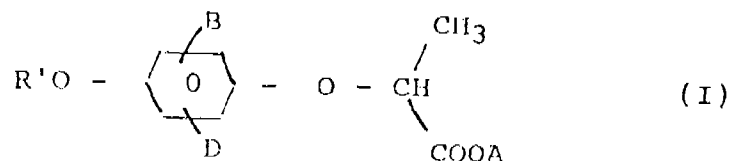
Menetelmä 2-aryylioksiopropionihappojen valmistamiseksi -
Förfarande för framställning av 2-aryloxipropionsyror

Tämä keksintö koskee menetelmää 2-aryyliopropionihappoestereiden stereoesifiseksi muuttamiseksi vastaaviksi karboksyylihapoiksi, jolloin saadaan aikaan muuttumattoman esterin isomeerin rikastuminen.

On tunnettua, että useat biologisesti aktiiviset yhdisteet esiintyvät stereoisomeerien seoksena. Tähän saakka näitä seoksia on yleensä käytetty sellaisinaan maanviljelyksen ja farmasian sovellutuksissa. Tavallisesti toivottu biologinen aktiivisuus on pääasiassa vain yhdellä stereoisomeerilla, niin että kahden stereoisomeerin seoksen ollessa kyseessä seoksen teho on alentunut jopa puoleen. Kuitenkin suurin syy, miksi stereoisomeerien seoksia edelleen käytetään, on se, että stereoisomeerien erotuskustannukset ylittävät sen potentiaalisen edun, joka mahdollisesti saavutetaan aktiivisuuden lisäyksenä.

Sen tähden tarvitaan menetelmää, jolla teollisessa mittakavassa voidaan saada taloudellisesti huomattavia saantoja valmistettaessa 2-aryylioksiopropionihappojen puhtaita enantiomeereja, ja tämän keksinnön kohteena on tällainen menetelmä.

Tämän keksinnön kohteena on menetelmä aryylioksiopropionihappoesterin rikastamiseksi R-isomeerin ja aryylioksiopropionihappoesterin stereoselektiiviseksi hydrolysoimiseksi vastaavan aryylioksiopropionihapon valmistamiseksi pääasiallisesti S-konfiguraatiossa, jossa menetelmässä kaavan I mukainen aryylioksiopropionihappoesteri



jossa A on esteritähde ja mieluiten alkyyli-ryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu tai haaroittunut, R' on mahdollisesti substituoitu aryyli tai mahdollisesti substituoitu heterosyklinen rengasjärjestelmä, joka hiiliatomien lisäksi sisältää yhden tai useamman typpi-, rikki- tai happiatomin, jolloin tämä rengasjärjestelmä on mahdollisesti substituoitu, ja B ja D ovat mahdollisia substituentteja, esimerkiksi vety tai halogeeniatomi, saatetaan sellaisen mikro-organismien tai siitä peräisin olevan aineen vaikutuksen alaiseksi, joilla on kyky stereoselektiivisesti hydrolysoida COOA-ryhmä vastaavan karboksyylihapon muodostamiseksi, joka on pääasiassa S-konfiguraatiossa. Tämän jälkeen pääasiassa R-konfiguraatiossa oleva esteri edullisesti erotetaan pääasiassa S-konfiguraatiossa olevasta haposta ja mahdollisesti R-esteri muutetaan toiseksi R-konfiguraatiossa olevaksi esteriksi tai vastaavaksi R-konfiguraatiossa olevaksi karboksyylihapoksi, jolloin muuttaminen suoritetaan sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Mieluiten A on lineaarinen 1-6 hiiliatomia sisältävä alkyyli-ryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu tai haaroittunut mieluiten fenyyli-, metyyli- tai etyyli-ryhmällä ja kaikkein mieluiten metyyli- tai etyyli-ryhmällä.

R¹ on mahdollisesti substituoitu aryyli tai heterosyklinen rengassysteemi, joka on mahdollisesti substituoitu esimerkiksi trifluorimetyyli-, fluori-, kloori-, bromi-, C₁-C₄-alkyyli-, metoksi- tai nitro-ryhmällä.

Sopiva kaavan I mukainen yhdiste on fluatsifop-butyyliesteri (butyyli-2-[4-(5-trifluorimetyyli-2-pyridyylioksi)-fenoksi]-propionaatti) tai diklofop-etyyliesteri (etyyli-2-[4-(2,4-dikloorifenoksi)fenoksi]propionaatti).

Edullisesti tämän keksinnön mukaisella menetelmällä voidaan kaavan I mukaisia 2-aryylioksi-*propionihappo*estereitä tai tätä *karboksyylihappo* itseään saada pääasiallisesti R-konfiguraatiossa, so. enemmän kuin 50 paino-% R-isomeeria.

Edullisen suoritusmuodon mukaisesti menetelmä suoritetaan valitsemalla mikro-organismi tai siitä peräisin oleva aine siten, että muodostuvasta vapaasta haposta ainakin 70 paino-%, mieluummin 80 % ja mieluiten 85 % on S-konfiguraatiossa.

Keksinnön toisena kohteena on tuottaa entsyymi, jota voidaan edullisesti käyttää keksinnön mukaisessa menetelmässä.

Nyt on löydetty mikro-organismeja, jotka kykenevät stereoselektiivisesti hydrolysoimaan kaavan I mukaisten yhdisteiden S-esterin. Lisäksi voidaan käyttää mikro-organismeja, jotka on kuvattu EP-patenttihakemuksessa n:o 0233656. Tämä hakemus kohdistuu 2-aryylipropionihappojen valmistukseen. Kokeet osoittavat, että käytettäessä raseemisia seoksia (esim. naprokseeniesteri tai ibuprofeeniesteri) spesifisesti S-esterit hydrolysoituvat, kun käytetään tiettyjä mikro-organismeja. Kuitenkin fenoksi-*propionihappojen* ollessa kyseessä, johtuen kiraalisen C-atomin ympärillä olevien ryhmien erityisestä järjestyksestä, voisi odottaa että, kuten naprokseeniesterissä, R-esteri hydrolysoituisi. On odottamatonta, että mikro-organismit, jotka hydrolysoivat R-naprokseenin estereitä, hydrolysoivat kaavan I mukaisten yhdisteiden S-esteriä.

Termillä "mikro-organismi, joka kykenee stereoselektiiviseen hydrolyysiin" tarkoitamme tässä hakemuksessa sellaisia mikro-organismeja kuin bakteereita, hiivoja tai sieniä (fungi). Sopivia bakteereita ovat esim. Bacillus- ja Staphylococcus-suvun bakteerit, sopivia hiivoja ovat esim. Pichia-suvun hiivat ja sopivia sieniä esimerkiksi Debaromyces-suvun sienet.

Näistä mikro-organismeista peräisin olevia mutantteja voidaan myös käyttää.

Samoin voidaan käyttää mikro-organismeja, jotka ovat saaneet kykynsä stereoselektiivisesti hydrolysoida kaavan I mukaista esterä siten, että niihin on siirretty uutta geneettistä materiaalia.

Tämä voidaan tehdä siirtämällä kloonattu geeni, joka koodittaa stereoselektiivisen hydrolyysin aikaansaavaa ainetta, esteraasientsyymiä, mistä tahansa seulotusta mikro-organismista toiseen mikro-organismiin, erityisesti Escherichia coliin. Muita mikro-organismeja, jotka voidaan transformoida, on suvuissa Saccharomyces, Kluyveromyces, Bacillus, Aspergillus, Escherichia, Pseudomonas ja Streptomyces. Kloonatut geenit voidaan selektoida sen mukaan, koodittavatko ne entsyymiä, joka kykenee hydrolysoimaan sellaisia estereitä kuin β -naftyyliasetaattia, naprokseeniesteriä tai kaavan I mukaista yhdistettä. Vaihtoehtoisesti ne voidaan selektoida myös ristiinhybridisaatiolla jo selektoidun esteraasia koodittavan geenin kanssa. Jälkimmäinen vaihtoehto perustuu siihen havaintoon, että toisilleen sukua olevilla mikro-organismeilla esiintyy toisiaan vastaavien entsyymien DNA-sekvenssien homologiaa (Ihara et al., 1985, J. Biochem. 98, s. 95) ja omaan havaintoomme, että plasmidi pNAPT-7 (ks. EP-patenttihakemuksen 0233656 esimerkki 11) ristiinhybridisoituu muista Bacillus-lajeista peräisin olevan kromosomaa-

lisen DNA:n kanssa. Tämän keksinnön kohteena on lisäksi menetelmä useiden ja/tai modifioitujen, esteraasia koodittavien geenikopioiden viemiseksi mikro-organismiin, jolloin saavutetaan se etu, että mikro-organismin tai siitä peräisin olevan aineen aktiivisuus lisääntyy kaavan I mukaisen esterin hydrolyysissä. Tämä mikro-organismi voi olla esimerkiksi Bacillus subtilis.

Mikro-organismit voivat edullisesti olla immobilisoituja, esimerkiksi polymeerigeeliin. Tämä voidaan suorittaa elävillä, lepotilassa olevilla ja/tai tapetuilla soluilla, mutta vaihtoehtoisesti esteraasientsyymillä, joka voidaan puhdistaa tietyssä määrin, mikäli halutaan suurempaa spesifistä aktiivisuutta.

Sen vuoksi ilmaisulla "mikro-organismit tai niistä peräisin olevat aineet" tarkoitetaan mikro-organismeja, tapettuja, eläviä tai lepotilassa olevia soluja tai niiden uutteita, mahdollisesti konsentroituja tai puhdistettuja. On havaittu, että soluhydrolysaatit tai entsyymit (valmisteet), jotka ovat peräisin tai eristetty elävistä tai tapetuista soluista voivat muuttaa kaavan I mukaisen yhdisteen S-isomeerin sopivissa olosuhteissa. Tällaisista mikro-organismeista voidaan saada esimerkiksi intrasellulaarisia tai ekstrasellulaarisia entsyymejä. Muuttuminen vapaan karboksyylihapon S-isomeeriksi voi tapahtua sopivissa puskureissa tai fysiologisissa suoloissa. Varastoinnin jälkeen indusoitujen solujen havaitaan kykenevän suoraan muuttamaan kaavan I mukaisen esterin vapaan karboksyylihapon S-isomeeriksi.

Bacillus-lajeja, joiden viljelmiä voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat Bacillus licheniformis (näyte tästä lajista on talletettu ATCC:hen talletusnumerolla 11945), Bacillus subtilis, mieluiten Bacillus subtilis Thai I-8 (näyte tästä lajista on talletettu CBS:ään talletusnumerolla 679.85) ja

Bacillus-laji Nap 4M (näyte tästä lajista on talletettu CBS:ään talletusnumerolla 342.87).

Staphylococcus-lajeja, joiden viljelmiä voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat Staphylococcus aureus (näyte tästä lajista on talletettu CBS:ään talletusnumerolla 341.87), Staphylococcus aureus Nap 2-5 (näyte tästä lajista on talletettu CBS:ään talletusnumerolla 340.87).

Pichia-lajeja, joiden viljelmiä voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat Pichia farinosa (näyte tästä lajista on talletettu IFO:oon talletusnumerolla 0534).

Debaromyces-lajeja, joiden viljelmiä voidaan käyttää tässä keksinnössä, ovat Debaromyces hansenii (näyte tästä lajista on talletettu IFO:oon talletusnumerolla 0034). Kantaa Nap 10M voidaan käyttää tässä keksinnössä, (näyte on talletettu CBS:ään talletusnumerolla 805.85).

Tämän keksinnön edullisen suoritusmuodon mukaan mikro-organismia, joka kykenee muuttamaan kaavan I mukaisen yhdisteen vastaavaksi vapaaksi karboksyylihapoksi, josta vähintään 70 % on S-konfiguraatiossa, viljellään noin 0,5 - 10 päivää. Solut suspendoidaan sitten nestemäiseen ravintoalustaan ja kaavan I mukainen yhdiste saatetaan sitten solujen vaikutuksen alaiseksi. Vaihtoehtoisesti solut voidaan tappaa esimerkiksi suspendoimalla lyysointialustaan, ja kaavan I mukainen yhdiste saatetaan sitten soluista peräisin olevien aineiden vaikutuksen alaiseksi.

Yllämainitun, 0,5 - 10 päivän viljelyn jälkeen solut voidaan eristää viljelyalustasta ennen solujen suspendoimista nestemäiseen ravintoalustaan tai lyysoivaan alustaan.

Kaavan (I) mukaisen yhdisteen selektiiviseen hydrolyysiin käytettävien mikro-organismien kasvattamiseen voidaan

käyttää tavallisia viljelyalustoja, jotka sisältävät assimiloituvan hiililähteen (esimerkiksi glukoosia, laktaattia, sakkaroosia, jne.), typpilähteen (esimerkiksi ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia, ammoniumkloridia, jne.) yhdessä orgaanisen ravintolähteen (esimerkiksi hiivauutteen, mallasuutteen, peptonin, lihauutteen, jne.) kanssa ja epäorgaanisen ravintolähteen (esimerkiksi fosfaatin, magnesiumin, kaliumin, sinkin, raudan ja muiden metallien, joita on läsnä hivenainemääriä) kanssa.

Sopivana viljelyalustana voidaan käyttää Jap-kasvualustaa, mahdollisesti rikastettuna yhdellä tai useammalla aineella. Seuraavan koostumuksen omaavaa Jap-alustaa voidaan käyttää: soijajauhoja (30 g/l), natriumsitraattia (7,5 g/l), ferrosulfaattia.7H₂O (0,28 g/l), natriumnitraattia (6 g/l) ja fruktoosia (12,5 g/l), pH säädetään arvoon 7,2. Ennen käyttöä alusta on steriloitava esim. 20 minuuttia 120 °C:ssa.

Toinen edullinen viljelyalusta on TSB-alusta 2X, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella. Voidaan käyttää alustaa, jossa on 60 g/l tryptikaasi-soijaliientä (Oxoid®). Ennen käyttöä alusta tulisi steriloida esim. 20 minuuttia 120 °C:ssa. Toinen edullinen alusta on 2xTY, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella. Voidaan käyttää alustaa, jossa on tryptonia (Difco®) 30 g/l, hiivauutetta (Difco®) 20 g/l, NaCl:a 3 g/l, (NH₄)₂HPO₄:a 1 g/l ja (NH₄)₂SO₄:a 1 g/l pH:ssa 6,8. Ennen käyttöä alusta tulisi steriloida esim. 30 minuuttia 110 °C:ssa. Vielä edullisempi viljelyalusta on kuorittu maitoalusta, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella. Seuraavan koostumuksen omaavaa kuorittu maitoalustaa voidaan käyttää: 10 % kuorittua maitoa rasvatomasta maitojauheesta, joka tulisi steriloida esim. 30 minuuttia 110 °C:ssa ennen käyttöä.

Kuorittu maito-alustaa rikastavina aineina voidaan käyttää esim. 0,5%:ista laktaattia tai PSIII-suoloja tai niiden yhdistelmiä. Voidaan käyttää PS III-suolakasvualustaa, joka sisältää: kaliumdivetyfosfaattia (2,1 g/l), ammoniummonofosfaattia (1,0 g/l), ammoniumsulfaattia (0,9 g/l), kaliumkloridia (0,2 g/l), natriumsitraattia (0,29 g/l), kalsiumsulfaatti. $2\text{H}_2\text{O}$:ta (0,005 g/l), magnesiumsulfaatti. $7\text{H}_2\text{O}$:ta (0,2 g/l), ammoniumferrosulfaatti. $6\text{H}_2\text{O}$:ta (2,5 mg/l), sinkkisulfaatti. $7\text{H}_2\text{O}$:ta (0,5 mg/l), mangaanidikloridi. $4\text{H}_2\text{O}$:ta (0,3 mg/l), kuparisulfaatti. $5\text{H}_2\text{O}$:ta (0,15 mg/l), kobolttikloridi. $6\text{H}_2\text{O}$:ta (0,15 mg/l), ortoboorighappoa (0,05 mg/l), natriummolybdaatti. $2\text{H}_2\text{O}$:ta (0,055 mg/l) ja kaliumjodidia (0,1 mg/l), pH säädettiin arvoon 6,8. Ennen käyttöä PSIII-suola-alusta tulisi steriloida esim. 20 minuuttia $120\text{ }^\circ\text{C}$:ssa.

Lämpötila pidetään mikro-organismien kasvatuksen aikana normaalisti välillä $0\text{--}45\text{ }^\circ\text{C}$ ja pH välillä 3,5–9. Mieluimmin mikro-organismit kasvatetaan lämpötilassa, joka on $20\text{--}37\text{ }^\circ\text{C}$ ja pH on mieluimmin 5–9.

Mikro-organismien kasvun aikana tarvittavat aerobiset olosuhteet voidaan aikaansaada minkä tahansa hyvin tunnetun menetelmän mukaisesti edellyttäen, että lisättävän hapen määrä on riittävä tyydyttämään mikro-organismien metaboliset vaatimukset. Tämä tapahtuu kaikkein käytännöllisimmin syöttämällä happea, sopivasti ilman muodossa ja mahdollisesti samanaikaisesti ravistelemalla tai sekoittamalla reaktioliuosta. Kaavan (I) mukaisen esterin muuttuessa vapaaksi karboksyylihapoksi mikro-organismit voivat olla kasvuvaiheessa käytettäessä edellä mainittua, tavanomaista kasvatusalustaa, tai ne voidaan säilöä mihin tahansa systeemiin (alustaan tai puskuriin), joka estää entsyymien hajoamisen.

Muutettaessa kaavan (I) mukainen esteri vapaaksi karboksyylihapoksi voidaan käyttää tavallista kasvualustaa, joka

sisältää tarvittaessa assimiloituvan hiililähteen (esim. glukoosia, laktaattia, sakkaroosia, jne.) tarvittaessa typpilähteen (esimerkiksi ammoniumsulfaattia, ammoniumnitraattia, ammoniumkloridia, jne.) tarvittaessa yhdessä orgaanisen ravintolähteen muodostavan aineen (esimerkiksi hiivauutteen, mallasuutteen, peptonin, lihauutteen jne.) ja tarvittaessa epäorgaanisen ravintolähteen muodostavan aineen (esimerkiksi fosfaatin, magnesiumin, kaliumin, sinkin, raudan ja muiden metallien, joita on läsnä hivenainemääriä) kanssa.

Muutettaessa kaavan (I) mukainen esteri vapaaksi karboksyylihapoksi voidaan edullisesti käyttää (yllä kuvattua) Jap-alustaa, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella. Vielä edullisemmin käytetään (yllä kuvattua) kuorittu maito-alustaa, joka on mahdollisesti rikastettu yhdellä tai useammalla aineella.

Mikro-organismit voidaan pitää ei-kasvavassa tilassa esimerkiksi poistamalla assimiloituva hiililähde tai typpilähde. Tässä hydrolyysitilassa lämpötila pidetään mieluiten välillä 0-45 °C ja pH välillä 3,5-9.

Hydrolyysitilassa mikro-organismit pidetään mieluummin lämpötilassa, joka on 20-37 °C ja pH välillä 5-8. Aerobiset olosuhteet, jotka tarvitaan tämän tilan aikana, voidaan aikaansaada minkä tahansa hyvin tunnetun menetelmän mukaisesti edellyttäen, että lisättävän hapen määrä on riittävä tyydyttämään mikro-organismien metabolisen tarpeen. Tämä tapahtuu kaikkein käytännöllisimmin syöttämällä happea, sopivasti ilman muodossa ja mahdollisesti samanaikaisesti ravistelemalla tai sekoittamalla reaktioliuosta. Muodostunut vapaa karboksyylihapo voidaan erottaa ja R-konfiguraatiossa rikastunut kaavan (I) mukainen esteri voidaan ottaa talteen ja puhdistaa, ja muuttaa haluttaessa toiseksi esteriksi tai vapaaksi hapoksi, jolla on R-konfiguraatio, minkä tahansa tällaisille yhdisteille tunnettujen menetelmien mukaisesti.

Mikro-organismit voidaan pitää agarmaljoilla, pakastettuna 50%:isessa glyserolissa tai lyofilisoituna. Tarvittaessa näistä mikro-organismeista voidaan tehdä esiviljelmiä tunnettujen menetelmien mukaisesti, esimerkiksi mikro-organismeja voidaan inkuboida lihaliemessä tai BHI:ssä 24 tuntia 30 °C:ssa kiertoravistelijassa. Voidaan käyttää lihaliemialustaa, jolla on seuraava koostumus: Lab Lemco L 29 (lihauute, Oxoid®) (9 g/l), Bactopeptoni (10 g/l) ja natriumkloridi (5 g/l), pH säädetään arvoon 7,6. Ennen käyttöä tämä alusta tulisi steriloida esim. 20 minuuttia 120 °C:ssa.

Voidaan käyttää BHI-alustaa (brain-heart infusion), joka sisältää 0,037 g/l BHI:tä (Oxoid®), pH säädetään arvoon 7,0. Ennen käyttöä tämä alusta tulisi steriloida esim. 20 min. 120 °C:ssa.

Voidaan käyttää YEPD-alustaa, jolla on seuraava koostumus: 20 g/l bactopeptonia, 10 g/l hiivauutetta, 20 g/l glukkoosia. Ennen käyttöä tämä alusta tulisi steriloida esim. 30 min. 110 °C:ssa.

Bacillus Thai I-8:sta peräisin oleva entsyymi, joka kykenee hydrolysoimaan kaavan (I) mukaisen esterin, on karakterisoitu Eurooppalaisessa patenttihakemuksessa EP-A-0233656. On havaittu, että esteraasiaktiivisuus ei liity mikro-organismeissa läsnäolevaan lipaasiaktiivisuuteen. Itse asiassa se, että esterin "väärää" isomeeria hydrolysoitui vähän näytti pääasiassa johtuvan Bacillus-kannan kontaminoivasta lipaasiaktiivisuudesta. Thai I-8:n puhdistetulla esteraasilla on huomattavasti suurempi enantiomeerinen selektiviteetti kuin Bacillus-kannan kokonaisten solujen lymaattilla.

E. coli/pNAPT-7 ja Bacillus/pNAPT-7, joissa kummassakin kannassa on Thai I-8-esteraasia sisältävä plasmidi, tuottavat huomattavan määrän esteraasia. Yllättäen proteiini, jolla on

esteraasiaktiivisuutta, varmistettuna SDS-PAGE:lla, HPLC-SEC:llä ja isoelektrisellä fokusoinnilla, on proteiini, jonka konsentraatio on verrattomasti suurin mikro-organismien solulysaatissa.

Vaikka on tunnettua, että geenikloonaus voi parantaa entsyymien ilmentymistasoa, lisääntymisen määrä esteraasin tapauksessa on hyvin yllättävä. Entsyymiä koodaavaa geeniä kloonattaessa esiintyy hyvin usein ongelmia, kuten väärää las-kostumista, proteiinien hajoamista ja solunsisäistä saostumista (Harris, T.J.R., 1983, Genetic Engineering 4, Academic Press). Odottamattomasti mitään näistä ongelmista ei näytä esiintyvän kloonattaessa esteraasigeenejä.

Tämän keksinnön kohteena on edelleen herbisidikoostumus, jossa on herbisidisesti aktiivinen suola, happo tai esteri pääasiallisesti R- tai pääasiallisesti S-muodossa, valmistettuna keksinnön mukaisella menetelmällä, yhdessä inertin laimennusaineen tai kantoaineen kanssa.

Tätä keksintöä kuvataan edelleen seuraavilla esimerkeillä, rajoittamatta keksinnön suojaopiiriä näihin esimerkkeihin.

Esimerkki 1

Kolmea bakteeria ja yhtä sientä esiviljeltiin BHI:ssä (bakteerit) tai YEPD:ssä (sieni) 24 tuntia 30 °C:ssa ja ympätettiin sitten 10%:iseen kuorittuun maitoon. Kutakin kantaa ympätettiin 5 x 100 ml:aan, joita pidettiin 500 ml:n väliseinä-kolveissa (baffle flasks) ja inkuboitiin 48 tai 72 tuntia 30 °C:ssa. Sen jälkeen viljelmiin lisättiin 1,25 M Tris/HCl-puskuria, pH 8,0, lopulliseen konsentraatioon 50 mM, ja lisäksi 40 mg raseemista fluatsifop-butyyliesteriä, joka oli liuotettu soijaöljyyn (200 mg esteriä/ml soijaöljyä) ja viljelmiä inkuboitiin edelleen 24 tuntia. Tämän inkubointijak-

son jälkeen viljelmät uutettiin etyyliasetaatilla ja jäännösesteri ja muodostunut happo eristettiin ja puhdistettiin käyttäen piihappogeelipylvästä.

Eristetyn esterin ja hapon optinen kierto määritettiin.

Esterin ja hapon enantiomeerinen puhtaus varmistettiin edelleen HPLC:llä Bakerbond DNBPG (dinitrobentsoyyli-fenyyli-glysiini) kovalenttipylväässä, sen jälkeen kun esteri ja happo oli vaihtoesteröity tai vastaavasti esteröity käyttäen BF_3/MeOH :ta.

Tulokset on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1: Fluatsifop-butyyliesterin resoluutio

Kannat	Erist. esteri*	$(\alpha)_D^{rt}$ CHCl ₃ mg	Enantio- meerinen puhtaus	Erist. happo	$(\alpha)_D^{rt}$ CHCl ₃ mg	Enantio- meerinen puhtaus
<u>Staphylococcus aureus</u> Nap 2-5 (CBS 340.87)						
	52	+10,7	<u>R</u> : 70%	50	- 5,2	<u>S</u> : 79%
<u>Bacillus spec.</u> Nap 4M (CBS 342.87)						
	72	+ 3,6	<u>R</u> : 59%	34	- 7,0	<u>S</u> : 65%
<u>Bacillus licheniformis</u> (ATCC 11945)						
	72	+19	<u>R</u> : 93%	56	-15,5	<u>S</u> : 85%
<u>Debaromyces hansenii</u> (IFO 0034)						
	88	+ 8,1	<u>R</u> : 70%	33	-14,9	<u>S</u> : 85%

* Lisätyn esterin kokonaismäärä noin 200 mg.

Esimerkki 2

Viittä organismia esikasvatettiin kuten esimerkissä 1 on kuvattu ja ympättiin 25 ml:aan 10%:ista kuorittua maitoa 100 ml:n väliseinäkolveissa. Kun oli kasvatettu 48 tuntia 30 °C:ssa, viljelmiin lisättiin noin 16 mg raseemista soi- jaöljyyn liuotettua diklofop-etyyliesteriä, ja viljelmiä inkuboitiin edelleen 24 tuntia (tässä kokeessa ei lisätty Tris/HCl-puskuria).

Inkubointijakson jälkeen viljelmät hapotettiin H_3PO_4 :llä pH-arvoon 4,0 ja uutettiin 2 ml:lla metyleenidikloridia. Jäljelle jäävä esteri ja muodostuva happo eristettiin ja analysoitiin HPLC:llä. Esteri analysoitiin joskus ilman vaihtoes-teröintiä. Happo esteröitiin aina ensin BF_3/MeOH :lla.

Tulokset on esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2: Diklofop-etyyliesterin resoluutio

Kannat	Havaittu esteri* g/l	Enantio- meerinen puhtaus	Havaittu happo g/l	Enantio- meerinen puhtaus
<u>Staphylococcus</u>				
<u>aureus</u> Nap 2-5 (CBS 340.87)	0,23	<u>R</u> : 99%	0,29	<u>S</u> : 82%
<u>Bacillus</u>				
<u>spec.</u> Nap 4M (CBS 342.87)	0,22	<u>R</u> : 79%	0,26	<u>S</u> : 74%
<u>Bacillus</u>				
<u>licheniformis</u> (ATCC 11945)	0,23	<u>R</u> : 94%	0,24	<u>S</u> : 90%
<u>Debaromyces</u>				
<u>hansenii</u> (IFO 0034)	0,34	<u>R</u> : 58%	0,08	<u>S</u> : 84%
<u>Bacillus</u>				
<u>subtilis</u> Thai I-8 (CBS 679.87)	0,16	<u>R</u> : 100%	0,36	<u>S</u> : 68%
<u>Pichia farinosa</u>				
(IFO 0534)	0,30	<u>R</u> : 75%	0,10	<u>S</u> : 89%

* Lisätyn esterin kokonaismäärä noin 0,8 g/l.

Mainitut arvot ovat kahden rinnakkaistuloksen keskiarvoja.

Esimerkki 3

Viittä organismia esikasvatettiin kuten on esitetty esimerkissä 1, ja ympättiin 25 ml:aan 10%:ista kuorittua maitoa 100 ml:n väliseinäkolveissa. Kun oli kasvatettu 48 tuntia 30 °C:ssa, viljelmiin lisättiin 10 mg raseemista sojaöljyyn liuotettua diklofop-metyyliesteriä, ja viljelmiä inkuboitiin edelleen 24 tuntia (tässä kokeessa ei lisätty Tris/HCl-puskuria).

Inkubointijakson jälkeen viljelmät hapotettiin H_3PO_4 :llä pH-arvoon 4,0 ja uutettiin kerran 25 ml:lla metyleenidikloridia. Jäljelle jäävä esteri ja muodostunut happo eristettiin ja analysoitiin HPLC:llä. Esteri voitaisiin analysoida ilman vaihtoesteröintiä. Happo esteröitiin ensin BF_3/MeOH :lla.

Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3: Diklofop-metyyliesterin resoluutio

Kannat	Havaittu esteri* g/l	Enantio- meerinen puhtaus	Havaittu happo g/l	Enantio- meerinen puhtaus
<u>Bacillus</u>				
<u>licheniformis</u>				
(ATCC 11945)	0,07	<u>R</u> : 94%	0,18	<u>S</u> : 85%
<u>Pichia farinosa</u>				
(IFO 0534)	0,08	<u>R</u> : 85%	0,13	<u>S</u> : 79%
<u>Staphylococcus</u>				
<u>aureus</u> Nap 2-5				
(CBS 340.87)	0,04	<u>R</u> : 78%	0,03	<u>S</u> : 88%
<u>Staphylococcus</u>				
<u>aureus</u>				
(CBS 341.87)	0,12	<u>R</u> : 69%	0,13	<u>S</u> : 67%
Kanta Nap 10M				
(CBS 805.85)	0,11	<u>R</u> : 62%	0,08	<u>S</u> : 69%

* Lisätyn esterin kokonaismäärä noin 0,4 g/l.

Esimerkki 4

Kolmea organismia esikasvatettiin kuten on esitetty esimerkissä 1, ja ympättiin 25 ml:aan 10%:ista kuorittua maitoa 100 ml:n väliseinäkolveissa. Kun oli kasvatettu 48 tuntia 30 °C:ssa, viljelmiin lisättiin 10 mg raseemista sojaöljyyn liuotettua fenoksapropmetyyliesteriä, ja viljelmiä inkuboitettiin edelleen 24 tuntia (tässä kokeessa ei lisätty Tris/HCl-puskuria).

Inkubointijakson jälkeen viljelmät hapotettiin H_3PO_4 :llä pH-arvoon 4,0 ja uutettiin kerran 25 ml:lla metyleenidikloridia. Jäljelle jäävä esteri ja muodostunut happo eristettiin ja analysoitiin HPLC:llä.

Tulokset on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4: Fenoksaprop-etyyliesterin resoluutio

Kannat	Havaittu esteri* g/l	Enantio- meerinen puhtaus
<u>Debaromyces hansenii</u> (IFO 0034)	0,09	<u>R</u> : 84%
<u>Pichia farinosa</u> (IFO 0534)	0,10	<u>R</u> : 81%
<u>Staphylococcus aureus</u> (CBS 340.87)	0,20	<u>R</u> : 80%

*Lisätyn esterin kokonaismäärä noin 0,4 g/l.

Esimerkki 5

Diklofop-etyyliesterin ja diklofop-metyyliesterin hydrolyysi suoritettiin Thai I-8-esteraasilla (kloonattu Bacillus-kantaan 1-85/pNap T7, CBS 673.86 ja eristetty siitä) 10 ml:ssa reaktioliuosta 100 ml:n kolveissa. Reaktioliuos sisälsi entsyymiuutetta (10^{-3} yksikköä/ml), 0,1 M MOPS-puskuria, pH 7,5, BSA (2 mg/ml), raseemista diklofop-etyyli-esteriä (0,2 mg/ml) ja Tween-80:a [2% (v/v)]. Seosta inku-

boitiin 2 tuntia 30 °C:ssa kiertoravistelijassa. Inkubointijakson jälkeen seos uutettiin metyleenidikloridilla ja jäännösesteri ja muodostunut happo analysoitiin HPLC:llä. Esteri ja happo esteröitiin ensin BF_3/MeOH :lla. Tulokset on esitetty taulukoissa 5 ja 6.

Taulukko 5: Diklofop-etyyliesterin resoluutio
Thai I-8-esterasilla

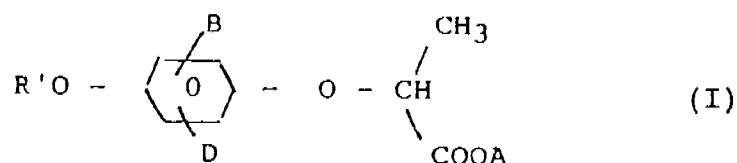
enantiomeerinen puhtaus			
esterin		hapon	
<u>R</u> :	66%	<u>R</u> :	0%
<u>S</u> :	34%	<u>S</u> :	100%

Taulukko 6: Diklofop-metyyliesterin resoluutio
Thai I-8-esteraasilla

enantiomeerinen puhtaus			
esterin		hapon	
<u>R</u> :	60%	<u>R</u> :	0%
<u>S</u> :	40%	<u>S</u> :	100%

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä aryylioksisipronihappoesterin rikastamiseksi R-isomeerin suhteen ja aryylioksisipronihappoesterin stereoselektiiviseksi hydrolysoimiseksi vastaavan aryylioksisipronihapon valmistamiseksi pääasiallisesti S-konfiguraatiossa, t u n n e t t u siitä, että kaavan I mukainen aryylioksisipronihappoesteri



jossa A on esteritähde, R' on mahdollisesti substituoitu aryyli tai mahdollisesti substituoitu heterosyklinen rengasjärjestelmä, joka hiiliatomien lisäksi sisältää yhden tai useamman typpi-, rikki- tai happiatomin, jolloin tämä rengasjärjestelmä on mahdollisesti substituoitu, ja B ja D ovat mahdollisia substituentteja, saatetaan sellaisen mikro-organismin tai siitä peräisin olevan esteraasin vaikutuksen alaiseksi, joilla on kyky stereoselektiivisesti hydrolysoida COOA-ryhmä vastaavan karboksyylihapon muodostamiseksi, joka on pääasiallisesti S-konfiguraatiossa.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pääasiallisesti R-konfiguraatiossa oleva esteri erotetaan pääasiallisesti S-konfiguraatiossa olevasta haposta ja R-esteri mahdollisesti muutetaan toiseksi esteriksi, jolla on R-konfiguraatio tai vastaavaksi karboksyylihapoksi, jolla on R-konfiguraatio, jolloin konversio suoritetaan sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ainakin 70 paino-% karboksyylihaposta muodostuu S-konfiguraatiossa.

4. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että A on alkyyliryhmä, joka on mahdollisesti substituoitu tai haarautunut, edullisesti A on lineaarinen 1-6 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä.

5. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että eristetään pääasiallisesti fluatsifopbutyyliesterin tai diklofop-etyyliesterin R-muoto.

6. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mikro-organismeja käytetään immobilisoidussa muodossa joko elävänä soluna, tapettuna soluna tai lepotilassa olevana soluna.

7. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että aine, joka kykenee stereoselektiivisesti muuttamaan kaavan I mukaisen yhdisteen vastaavaksi S-konfiguraatiossa olevaksi karboksyylihapoksi, vapautetaan mikro-organismeista ja käytetään sellaisenaan.

8. Jonkin edellisistä patenttivaatimuksista mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi on bakteeri, hiiva tai sieni.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi on Bacillus- tai Staphylococcus-sukuun kuuluva bakteeri, Pichia-sukuun kuuluva hiiva tai Debaromyces-sukuun kuuluva sieni.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi on Bacillus licheniformis, mieluiten Bacillus licheniformis (ATCC 11945); Bacillus subtilis, mieluiten Bacillus subtilis Thai I-8 (CBS 679.85); Bacillus species Nap 4-M (CBS 342.87); Staphylo-

coccus aureus, mieluiten Staphylococcus aureus (CBS 341.87); Staphylococcus aureus Nap 2-5 (CBS 340.87); Pichia farinosa, mieluiten Pichia farinosa (IFO 0534); Debaromyces hansenii, mieluiten Debaromyces hansenii (IFO 0034); tai kanta Nap 10M (CBS 805.85), tai jokin niiden mutantti tai variantti.

11. Jonkin patenttivaatimuksista 1-7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu mikro-organismi on esteraasia koodaavalla DNA-fragmentillä transformoitu mikro-organismi.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-fragmentti on peräisin Bacillus-lajista.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-fragmentti on peräisin Bacillus subtilis-bakteerista.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että DNA-fragmentti liitetään plasmidiin.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että plasmidi on pNAPT-7 tai pNAPT-8.

16. Jonkin patenttivaatimuksista 11-15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty mikro-organismi on Escherichia coli, mieluiten Escherichia coli JM101 hsds tai E. coli DH1.

17. Jonkin patenttivaatimuksista 11-15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty mikro-organismi on Bacillus subtilis, mieluiten Bacillus subtilis 1-85 tai Bacillus subtilis 1A40.

18. Sellaisen esteraasientsyymin käyttö, joka kykenee patenttivaatimuksessa 1 määritellyllä tavalla stereoselektiivisesti hydrolysoimaan kaavan (I) mukaisen esterin vastaavaksi, pääasiallisesti S-konfiguraatiossa olevaksi karboksyylihapoksi, minkä jälkeen saatu S-isomeerin suhteen rikastunut happo erotetaan olennaisesti R-isomeerin suhteen rikastuneesta kaavan (I) mukaisesta esteristä.

19. Mikro-organismi, joka on Bacillus species Nap 4M (CBS 342.87) tai Staphylococcus aureus Nap 2-5 (CBS 340.87) tai jokin niiden mutantti tai variantti.

PATENTTI-JA REKISTERIHALLITUS
PATENTTIOSASTO

TUTKIMUSRAPORTTI

[illegible]

PATENTTIVIRASTOJEN JULKAISUT	LUOKKA	HUOM!
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		

MUITA JULKAISUJA / ON-LINE TUTKIMUS, JOS TEHTY (TIETOKANTA,
HAKUSANAT YM.)

Agric. Biol. Chem. 45(6) (1981) 1389-92
(Triuchijima)

HELSINKI

19.8.92

PÄIVÄYS

Mina Lindholm
ALLEKIRJOITUS