



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209633

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 05 06 80
/21/ /PV 3966-80/

(40) Zveřejněno 27 02 81

(45) Vydáno 15 02 83

(51) Int. Cl.³
C 07 B 19/00
C 07 C 101/04

(75)

Autor vynálezu

ŠIMEK PETR, PRAHA, BARTH TOMISLAV RNDr. CSc., ROZTOKY u Prahy,
JOŠT KAREL RNDr. DrSc., BARTA MIROSLAV prom. chem., VOJTÍŠEK
VLADIMÍR RNDr. CSc. a ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob dělení optických izomerů racemického S-benzylpenicilaminu

Předmětem vynálezu je způsob dělení optických izomerů DL-S-benzylpenicilaminu, které se používají v lékařství.

Jedná se o enzymatické dělení, které pozůstává v tom, že DL-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilamin se inhibuje s penicilinamidohydrolasou (E.C. 3.5.1.11) a vzniklá směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu se dělí s výhodou pomocí měničů iontů.

Novost předmětu vynálezu spočívá ve zjištění, že penicilinamidohydrolasa (E.C. 3.5.1.11) specificky odštěpuje fenylactovou kyselinu pouze z L-formy racemického N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu, přičemž vzniklou směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu lze snadno rozdělit.

Předmětem vynálezu je způsob dělení optických izomerů racemického S-benzylpenicilaminu (beta, beta-dimethyl-S-benzylcysteinu).

Penicilamin, součást antibiotika penicilinu, má zajímavé biologické vlastnosti (P. C. Jocelyn: *Biochemistry of the SH-Group*. Academic Press, London 1972). Podstatným způsobem mění farmakologické vlastnosti analogů neurohypofysárních hormonů, pokud je zaveden do jejich molekuly místo cysteinového zbytku (viz např. Schultz H., du Vigneaud V.: *J. Med. Chem.* **9**, 647 /1966/). Kromě toho je používán v lékařství (Lodeman E.: *Naturwissenschaften* **66**, 462 /1979/).

Pro všechny výše vyjmenované účely je nutno používat pouze jednoho z optických antipodů této aminokyseliny. D-Penicilamin se získává, byť i značně neekonomicky, hydrolysou penicilinu. Syntheticky připravený penicilamin je racemický: dělení na optické antipody se většinou provádí krystalisací jeho derivátů s alkaloidy, např. brucinem (Leach B.E., Hunter J.H.: *Biochem. Preparat.* **3**, 111 /1953/); Werner L. H., Wettstein A., Miescher A.: *Helv. Chim. Acta* **30**, 432 (1947); *The Chemistry of Penicillin*. Princeton Univ. Press, Princeton 1949). Silná sterická zábrana, způsobená přítomností dvou methylových skupin na beta-uhlíku penicilaminu, je zřejmě příčinou, proč výhodné a v jiných případech běžně používané enzymatické metody pro štěpení racematů alfa-aminokyselin většinou selhaly.

Byl sice popsán úspěšný pokus o rozdělení optických izomerů amidů S-benzylpenicilaminu amidasou z vepřových ledvin (Marshall R., Winitz M., Birnbaum S. M., Greenstein J. P.: *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4538 /1957/), ovšem tento enzym patří k značně vzácným a těžce získatelným enzymům. Všechny ostatní dosud známé pokusy o enzymatické dělení optických antipodů derivátů penicilaminu byly neúspěšné, ať již bylo použito papainu (Fox S. W., Winitz M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 419 /1952/); Fox S. W., Pettinga C. W., Halverson J. S., Wax H.: *Arch. Biochem. Biophys.* **25**, 21 /1950/), ficinu (Fox S. W., Winitz M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **35**, 419 /1952/), acylasy I, ev. oxidasy L-aminokyselin a oxidasy D-aminokyselin (Marshall R., Winitz M., Birnbaum S. M., Greenstein J. P.: *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4538 /1957/).

Zjistili jsme, že u DL-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu lze selektivně odštěpit fenylacetylovou skupinu pouze z L-formy inkubací s penicilinamidohydrolasou (E. C. 3.5.1.11). Tento enzym, produkováný některými mikroorganismy (např. *E. coli*), odštěpuje fenylacetylovou skupinu z benzylpenicilinu za vzniku 6-aminopenicilanové kyseliny (přehled viz: Vandamme E. J., Voets J. P.: *Adv. Appl. Microbiol.* **17**, 311 /1974/). Bylo též popsáno odštěpení fenylacetylového zbytku z některých aminokyselin (Lucente G., Romeo A., Rossi D.: *Experientia* **21**, 317 /1965/).

Novost předmětu vynálezu spočívá ve zjištění, že penicilinamidohydrolasa (E. C. 3.5.1.11) specificky odštěpuje fenylacetylovou kyselinu pouze z L-formy racemického N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu, přičemž vzniklou směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu lze snadno rozdělit, např. pomocí měniče kationtů nebo na základě rozdílných rozpustností.

Pokud bylo pro inkubaci s penicilinamidohydrolasou použito jako substrátu buď DL-N-benzoyl-S-benzylpenicilaminu nebo DL-N-chloracetyl-S-benzylpenicilaminu, nedošlo k žádnému odštěpení amino-chránicí skupiny.

Způsob dělení racemického S-benzylpenicilinu se dále objasňuje v příkladech provedení:

P ř í k l a d 1

200 mg DL-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu (The Chemistry of Penicilin. Princeton Univ. Press, Princeton 1949, str. 472) bylo suspendováno ve vodě (3 ml), pH bylo upraveno na hodnotu 7,5 $\pm$ 0,5 M-NaHCO₃ a k roztoku byl přidán enzym penicilinamidohydrolasa (15 mg bylo rozpuštěno v 1,5 ml 0,2M natriumfosfátového pufru o pH 7,5 roztok byl odcentrifugován a bylo použito čistého supernatantu). Enzym byl ponechán působit celkem 24 hod. při teplotě 25 °C, přičemž pH roztoku bylo udržováno na hodnotě 7,5. Reakce byla zastavena okyselením směsi 1M-HCl na hodnotu 1,9, vzniklá sraženina byla odcentrifugována a supernatant byl adsorbován na sloupci sulfonátového měniče kationtů. Sloupec byl vymyt vodou a produkt byl izolován vymytím 10% vodným roztokem pyridinu a odpařením. Bylo získáno 30,5 mg (45,6%) L-S-benzylpenicilaminu o b. t. 190 až 192 °C. $[\alpha]_D^{+93}$ (c 0,2, 1M-HCl).

P ř í k l a d 2

20 g DL-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu bylo rozpuštěno v 0,2M natriumfosfátového pufru o pH 7,6 (700 ml) roztok byl zředěn vodou (800 ml) a byl k němu přidán enzym (500 mg penicilin-amidohydrolasy bylo rozpuštěno v 20 ml 0,05M natriumfosfátovém pufru o pH 7,2, roztok byl odcentrifugován a byl použit čistý supernatant). Směs byla inkubována 23 hod při 40 °C, přičemž její pH bylo udržováno na hodnotě 6,85. Potom byla reakční směs odcentrifugována, supernatant byl okyselen 1M-HCl na pH 1,9 a ochlazen na 0 °C. Vyloučené krystaly byly odfiltrovány a promyty vodou; bylo získáno 10,5 g látky.

Část (2 g) byla suspendována v 6M-HCl (100 ml), byl přidán 1-butanol (20 ml) a směs byla refluxována 2 hod. Roztok byl odpařen, odparek byl rozpuštěn ve vodě (50 ml, pH roztoku 2) a vodný roztok byl vytřepán octanem ethylnatým. Vodný podíl byl nanesen na sloupec sulfonátového měniče kationtů, sloupec byl promyt vodou a produkt byl vymyt 10% vodným roztokem pyridinu. Odpařením pyridinového roztoku bylo získáno 0,35 g (26,1%) D-S-benzylpenicilaminu o b.t. 185 až 189 °C. $[\alpha]_D^{-81,8}$ (c 0,2, 1M-HCl). Krystalizací z vody byl odstraněn zbytek DL-formy a odpařením vodných matečných louhů byla získána látka o $[\alpha]_D^{-85,1}$ (c 0,2, 1M-HCl). Při chromatografii na tenké vrstvě silikagelu (detekce ninhydrinem) byl produkt čistý ve všech rozpouštědlových systémech: R_F 0,55 (2-butanol - 98% kyselina mravenčí - voda; 75:13,5:11,5), 0,18 (2-butanol-25% amoniak-voda; 85:7,5:7,5), 0,49 (1-butanol-kyselina octová-voda; 4:1:1) a 0,63 (1-butanol - kyselina octová - pyridin - voda; 15:3:10:6).

Produkt byl čistý i při vysokotlaké kapalinové chromatografii (kolona 15x0,6 cm s náplní Separon Si C-18, mobilní fáze: fosfátový pufr 4,4 - metanol (7:3), tlak 20 kPa, detekce UV absorpce při 230 nm) a při papírové elektroforese ve dvou různých pufrech (1M kyselina octová a pyridin-acetátový pufr pH 5,7).

Matečné louhy (po dofiltrování 10,5 g krystalického podílu) byly naneseny na sloupec sulfonátového měniče kationtů, sloupec byl vymyt vodou a produkt byl izolován vymytím sloupce 10% vodným pyridinem a odpařením eluátů. Bylo získáno 4,8 g (72%) L-S-benzylpenicilaminu o b.t. 192 až 194 °C. $[\alpha]_D^{+93,3}$ (c 0,2, 1M-HCl). Pro C₁₂H₁₇NO₂S (239,3) vypočteno: 60,22 % C, 7,16 % H, 5,85 % N; nalezeno 60,65 % C, 7,28 % H, 5,86 % N. Chromatograficky (tenkovrstvá i vysokotlaká chromatografie) i elektroforeticky byl produkt čistý a měl stejné parametry, jako bylo popsáno výše u D-formy.

Literatura udává následující údaje: $[\alpha]_D^{+90}$ (1N-NaOH) a b.t. 197 až 198 °C (The Chemistry of Penicillin, str. 472): $[\alpha]_D^{+91,3}$ (1N-HCl) (Marshall R., Winitz M., Birnbaum S. M., Greenstein J. P.: J. Amer. Chem. Soc. 79, 4538 /1957/); b. t. 184 až 185 °C a $[\alpha]_D^{+97}$ (c 1, 1N-HCl) (Werner L. H., Wettstein A., Miescher K.: Helv. Chim. Acta 30, 432 /1947/).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob dělení optických isomerů racemického S-benzylpenicilaminu vyznačený tím, že se DL-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilamin inkubuje s penicilinamidohydrolasou (E. C. 3.5.1.11) a vzniklá směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu se dělí, s výhodou pomocí měniče iontů.

2. Způsob dělení podle bodu 1 vyznačený tím, že se inkubace provádí ve vodném roztoku při pH 6,0 až 8,0.