



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 291 579 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 P 13/04
C 07 B 59/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 P / 337 125 1	(22)	16.01.90	(44)	04.07.91
(71)	siehe (73)				
(72)	Willhardt, Ingo, Dr. Dipl.-Chem., DE; Tolosa, Emma A., Dr. Dipl.-Chem., SU; Hermann, Peter, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DE; Hahn, Gisela, DE				
(73)	Martin-Luther-Universität Halle – Wittenberg, Universitätsplatz 10, O - 4010 Halle, DE				
(74)	siehe (73)				
(54)	Verfahren zur Herstellung von markiertem β -Cyano-L-alanin				

(55) β -Cyano-L-alanin; Markierung, radioaktiv, stabilisotop; Enzym; Cyanoalaninsynthase; β -Substitutionsreaktion; enzymkatalysiert; Biochemikalie

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von markiertem β -Cyano-L-alanin. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß die Verbindung durch eine enzymkatalysierte β -Substitutionsreaktion mittels Cyanoalaninsynthase vorzugsweise in immobilisierter Form aus Cvstein und Cyanidion hergestellt wird, wobei diese Substrate wahlweise die Nuclide ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C und/oder ^{14}N , ^{15}N enthalten können. Markiertes β -Cyano-L-alanin wird als Biochemikalie in der Biochemie zur Aufklärung des Aminosäure- und Cyanidstoffwechsels, im Zusammenhang mit Problemen des Umweltschutzes, sowie als Vorstufe für markiertes L-Asparagin bzw. markierte L-Asparaginsäure eingesetzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von markierten β -Cyano-L-alanin, **gekennzeichnet dadurch**, daß diese Verbindung durch eine enzymkatalysierte β -Substitutionsreaktion mittels Cyanoalaninsynthase aus Cystein und Cyanidion, wobei Cystein und/oder Cyanidion radioaktiv und/oder stabilisotop markiert sind, im pH-Bereich 7–10, im Temperaturbereich 293–318 K, und im Substratkonzentrationsbereich 0,1–0,001 mol/l hergestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß der enzymatische Reaktionsschritt vorzugsweise mit einer immobilisierten Cyanoalaninsynthase erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß den Substraten Cystein und Cyanidion die Nuclide ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{14}N und/oder ^{15}N eingebaut sind.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von markiertem β -Cyano-L-alanin als markierte Biochemikalie. Diese Biochemikalie wird angewendet zur Aufklärung des Cyanidstoffwechsels, des Aminosäurestoffwechsels und im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Umweltschutz. Markiertes β -Cyano-L-alanin ist chemische Vorstufe zu markierter L-Asparaginsäure und markierten L-Asparagin.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Es sind zwei Methoden zur Herstellung von markiertem β -Cyano-L-alanin bekannt. Die gemischt chemisch-enzymatische Synthese von β -Cyano-L-alanin-4- ^{14}C geht von α -Acetamido- α -dimethylaminomethylmalonsäurediethylester-methiodid aus. Durch Kondensation mit $\text{KCN-}^{14}\text{C}$ wird der Ethylester von N-Acetyl- β -cyano-DL-alanin-4- ^{14}C erhalten, dessen Hydrolyse N-Acetyl- β -cyano-DL-alanin-4- ^{14}C ergibt. Aus dieser Verbindung wird durch enzymatische Racematspaltung mittels Acylase β -Cyano-L-alanin-4- ^{14}C erhalten. Die Ausbeute dieser 3stufigen Synthese, bei der das radioaktive ^{14}C -Cyanid in der 1. Stufe eingesetzt wird, ist gering (Y.-H. Giza and C. Ressler; J. Labelled Compounds 5, 142 [1969]).

Die gemischt chemisch-enzymatische Synthese von L- β -Cyano-alanin-4- ^{13}C geht von der Kondensation von Acetamidomalonsäurediethylester mit Bromacetonitril-1- ^{13}C , welches selbst in einer 3stufigen Reaktionsfolge aus den Startprodukten Piperidin, Formaldehyd, Natriumhydrogensulfid und Natriumcyanid- ^{13}C erhalten wurde, aus. Der gebildete α -Acetamido- α - ^{13}C -cyanomethyl-malonsäurediethylester wird hydrolysiert und decarboxyliert und dann das Acetylderivat von β -Cyano-DL-alanin-4- ^{13}C mit Acylase der enzymatischen Racematspaltung unterworfen (K. H. Rohm, R. L. van Etten; J. Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals 22, 909 [1985]). Nachteil dieser beschriebenen Herstellungsmethoden ist, daß auf den Einsatz des markierten Cyanids bezogen sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Dies ist insbesondere eine Folge der arbeits- und zeitaufwendigen Vielstufensynthesen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einer einfachen Reaktion aus leicht zugänglichen Verbindungen markiertes β -Cyano-L-alanin in hoher Reinheit und guter Ausbeute herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von markiertem β -Cyano-L-alanin zu entwickeln, das die Einführung verschiedener Nuclide in verschiedene Positionen des Moleküls erlaubt.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß die Herstellung durch eine enzymkatalysierte, stereospezifische β -Substitutionsreaktion gemäß nachstehender Gleichung

$$\text{L-HS-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH} + \text{CN}^- \longrightarrow \text{L-CN-CH}_2\text{-CH(NH}_2\text{)COOH} + \text{SH}^-$$
erfolgt.

Nach dieser erfindungsgemäßen Vorgehensweise wird eine Präparation von Cyanolaninsynthase (EC 4.4.1.9), (S. M. Galoyan, E. A. Tolosa, I. Willhardt, E. V. Goryachenkova; Biokhimiya 46, 1855 [1981]) zweckmäßigerweise in immobilisierter Form mit L-Cystein und Cyanidionen als Substrate im Temperaturbereich von 293–318 K, im pH-Bereich von 7–9 und in einem Substratkonzentrationsbereich 0,1–0,001 mol/l zur Reaktion gebracht und β -Cyano-L-alanin aus dem Reaktionsgemisch in bekannter Weise isoliert. Als Substrate können entsprechend der gewünschten Markierung ^{12}C -, ^{13}C -, ^{14}C -, ^{14}N - und/oder ^{15}N -markiertes Cystein und/oder ^{12}C -, ^{13}C - oder ^{14}C - bzw. ^{14}N - oder ^{15}N -Cyanid eingesetzt werden. Die Immobilisierung des Enzyms begünstigt die Trennoperation, stabilisiert die Enzymaktivität und erlaubt eine Wiederverwendung der Enzympräparation.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung wird nachfolgend an zwei Beispielen erläutert.

Beispiel 1: β -Cyano-L-alanin-4- ^{14}C (radioaktiv markiert)

Cyanoalaninsynthase wird aus Lupinenkeimlingen nach S. M. Galoyan, E. A. Tolosa, I. Willhardt, E. V. Goryachenkova; Biokhimiya 46, 1855 (1981) angereichert bis keine unerwünschte Fremdaktivität enthalten ist und an ein mit Epoxidgruppen modifiziertes Copolymerisat von Hydroxyethylmethacrylat und Ethylenbismethacrylat (EP 186347) immobilisiert.

Die Suspension des Immobilisates wird in 0,1 M Pyrophosphatpuffer, pH 8,6, bei der Temperatur von 310 K mit einer Lösung von jeweils 0,01 M L-Cystein und $\text{KCN-}^{14}\text{C}$ zur Reaktion gebracht und durch analytische Kontrolle, z. B. mittels HPLC oder Dünnschichtchromatographie, der Umsatzverlauf verfolgt. Nach Beendigung der Umsetzung wird filtriert, restliches Cystein durch Luftoxidation in schwerlösliches Cystin umgewandelt und abgetrennt, danach die Cyanoalanin- und Cyanidionen-haltige Pufferlösung über einem stark sauren Ionenaustauscher filtriert. Nach dem Waschen mit Wasser kann von diesem das markierte Cyanoalanin mittels wässrigen Ammoniaks eluiert werden. Aus dem Eluat wird durch Konzentrieren Cyanoalanin gewonnen, dessen radiochemische Reinheit durch chromatographische Methoden gesichert wird.

Beispiel 2: β -Cyano-L-alanin-4- ^{15}C (stabilisotop markiert)

Es wird wie im Beispiel 1 verfahren, jedoch $\text{NaCN-}^{15}\text{N}$ eingesetzt. Die Detektion bei der Umsatzkontrolle, Isolierung und Reinigung erfolgt in diesem Falle mittels der Ninhydrinreaktion.