



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216 583

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 02 81
(21) PV 863-81

(51) Int. Cl.³

C 12 P 37/00

(40) Zveřejněno 31 12 81
(45) Vydáno 01 10 84

(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.,
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54)

Způsob dělení optických isomerů D,L-S-benzylpenicilaminu

Pro dělení enantiomerů S-benzylpenicilaminu lze s výhodou použít nerozpustné formy enzymu penicilin-amidohydrolasy, např. enzym zakotvený na buňkách *B.megaterium* nebo pomocí navzájem vázaných buněk *E.coli* majících zachovanou penicilin-amidohydrolasovou aktivitu.

Podstata tohoto způsobu dělení je v tom, že se D,L-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilemin nechá reagovat s nerozpustnou formou penicilin-amidohydrolasy ve vodné suspenzi při pH 6 až 8 a vzniklá směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicylaminu se rozdělí známým způsobem.

Předmětem vynálezu je způsob dělení isomerů D,L-S-benzylpenicilaminu, tj. β , δ -dimethyl-S-benzylcysteinu pomocí nerozpustných forem penicilin-amidohydrolasy.

Bylo prokázáno, že u D,L-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu lze selektivně odštěpit fenylacetylovou skupinu pouze z L-formy inkubací s penicilin-aminohydrolasou (čsl. a.o. 209 633).

Dále bylo zjištěno, že pro dělení enantiomerů S-benzyl-penicilaminu lze s výhodou použít nerozpustných forem tohoto enzymu, např. enzymem zakotveným na buňkách *B. megaterium* (čsl. a.o. 208931) nebo pomocí navzájem vázaných buněk *E. coli*, majících zachovanou penicilin-amidohydrolasovou aktivitu (čsl. a.o. 203607). Obě tyto modifikace umožňovaly rychlou regeneraci a opětné použití enzymu.

Podstatou tohoto způsobu dělení tedy je, že se D,L-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilamin nechá reagovat s nerozpustnou formou penicilin-aminohydrolasy ve vodné suspenzi při pH 6 až 8 a vzniklá směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu se rozdělí známým způsobem.

Způsob dělení racemického S-benzylpenicilaminu je dále objasněn v příkladech provedení.

Příklad 1

K roztoku N-fenylacetyl-S-benzyl-D,L-penicilaminu (21,5 g; příprava viz *The Chemistry of Penicillin*, Princeton Univ. Press, Princeton 1949, str. 472) ve směsi voda (176 ml), 1 mol/l NaOH (63 ml) a 0,2 mol/l Na-fosfátového pufru o pH 7,5 (50 ml) byly přidány modifikované buňky *E. coli* s penicilin-amidohydrolasovou aktivitou (15 g; aktivita enzymatického preparátu: 1 g vlhké hmoty uvolnil z penicilinu G 77 μ mol/l 6-aminopenicilánové kyseliny za 1 min). Výsledné pH suspenze bylo 7,3. Směs byla míchána magnetickým míchadlem při 37 °C a průběh reakce byl sledován pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie. Po 120 hod inkubace byly buňky odděleny filtrací přes plachetku, promyty vodou a použity k další reakci. Dále byl roztok zpracován stejným způsobem, jako je uvedeno v čsl. a.o. 209633. Bylo získáno 3,1 g (43 %) S-benzyl-L-penicilaminu o b.t. 190-192 °C, $[\alpha]_D + 96,4^\circ$ (c 0,2 l mol/l-HCl). Pro $C_{12}H_{17}NO_2S$ (239,3) vypočteno: 60,22 % C, 7,16 % H, 5,85 % N; nalezeno 60,35 % C, 7,22 % H, 5,78 % N.

Postup byl opakován se stejnou frakcí buněk. Bylo získáno 3,4 g (47 %) produktu o b.t. 191-193 °C, $[\alpha]_D + 97,6^\circ$ (c 0,2, 1M-HCl); nalezeno 60,27 % C, 7,17 % H, 5,85 % N.

Příklad 2

K roztoku N-fenylacetyl-S-benzyl-D,L-penicilaminu (0,5 g) ve směsi voda (2,5 ml) a 1 mol/l NaOH (1,5 ml), jehož pH bylo upraveno na hodnotu 7 přidáním 0,2M- NaH_2PO_4 (0,5 ml), byla přidána suspenze enzymu zakotveného na buňkách *B. megaterium* (obsahující 3,7 ml vlastní hmoty). Reakce probíhala při 37 °C 24 hod, zakotvený enzym byl odfiltrován a roztok byl zpracován jako v příkladu 1. Bylo získáno 122 mg (73 %) S-benzyl-L-penicilaminu o b.t. 187-190 °C a $[\alpha]_D + 93,2^\circ$ (c 0,2 l mol/l HCl; nalezeno: 59,82 % C, 7,19 % H, 5,89 % N).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob dělení optických isomerů D,L-S-benzylpenicilaminu, vyznačený tím, že se D,L-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilamin nechá reagovat s nerozpustnou formou penicilin-amidohydrolasy ve vodné suspenzi při pH 6 až 8 a vzniklá směs L-S-benzylpenicilaminu a D-N-fenylacetyl-S-benzylpenicilaminu se rozdělí známým způsobem.