

**ENZIMES ELJÁRÁS AMINOSAVAK ENANTIOMER
REZOLVÁLÁSÁRA**

Kivonat

5

A találmány új enzimes eljárásra vonatkozik, amellyel aminosav enantiomer rezolválása lehetséges. Pontosabban az eljárás abból áll, hogy az aminosav racém elegyét glutársav-anhidriddel, majd a glutaril 7-ACA aciláz enzimmal reagáltatjuk, így az aminosav egyik enantiomerjét kinyerjük, míg a másik enantiomer a megfelelő glutaril-
10 -amid-származék formájában marad.

Reuss^{Dr} a/ne Ø
Reuss

ENZIMES ELJÁRÁS AMINOSAVAK ENANTIOMER REZOLVÁLÁSÁRA

A találmány tárgya új enzimes eljárás, amelynek segítségével
5 racém elegy formájában lévő aminosavakat enantiomerjeikre lehet
rezolválni.

Az aminosavakat széleskörűen alkalmazzák különféle iparágak-
ban, például biológiai hatóanyagként vagy szintézis intermedierként
különféle vegyületek, így gyógyszerészeti, kémiai vagy mezőgazda-
10 sági célra használható vegyületek előállításához. Hamar kiderült,
hogy gyakran van szükség ezen aminosavak egyik vagy másik opti-
kailag aktív enantiomerjére. Számos eljárást kidolgoztak tehát a
királis aminosavak enantiomerjeinek elválasztására. Az enantiomerek
elválasztását lehetővé tevő enzimes eljárások jelentik az egyik elő-
15 nyös lehetőséget aszimmetrikus szintézisek számára.

Például Soloshonok és munkatársai [lásd Tetrahedron:
Assymetry, 6(7), 1601-1610 (1995)] kidolgoztak egy enzimes eljárást
 β aminosavak enantiomerjeinek rezolválására. Az eljárást az 1. reak-
cióvázlaton mutatjuk be.

20 Analóg módon Topgi és munkatársai [lásd Bioorg. & Med.
Chem., 7, 2221-2229 (1999)] eljárása szerint etil-3-amino-4-pentinoát
(R) és (S) enantiomerjét lehet elválasztani a 2. vagy 3. reakcióváz-
laton bemutatott eljárással. A 2. reakcióvázlat kiindulási vegyülete-
ként alkalmazott fenilacetamidot a megfelelő amin fenilecetsavval
25 történő acilezésével állítjuk elő.

A WO 98/50575 számon közzétett nemzetközi szabadalmi be-
jelentésben általános eljárást ismertetnek királis β aminosav előállí-
tására, amely abból áll, hogy az adott aminosav racém elegyét egy
acil donorral és a penicillin G aciláz (vagy amidohidroláz) enzimmel
30 reagáltatják olyan megfelelő körülmények között, amelyek között a

β aminosav racém elegyét alkotó egyik enantiomert sztereoszelektív módon acilálják a megfelelő N-acil-származékává, a β aminosav másik enantiomerjét pedig enantiomerben dús formában nyerik ki. Az eljárást a 4. reakcióvázlaton szemléltetjük. Az említett "acil donor" a

5 (VI) általános képlettel ábrázolható, a képletben R_3 jelentése fenil-, fenoxi-, aminocsoport, különböző fenilszármazékok vagy piridilcsoport, R_4 jelentése hidroxil-, alkoxi-, alkil-, alkenil-, alkinil-, halogénalkil-, anil, anilalkil-csoport, cukrok vagy szteroidok.

A WO 98/50575 számon közzétett nemzetközi szabadalmi be-

10 jelentésben egy másik alternatív eljárást is ismertetnek királis β aminosav előállítására, amely abból áll, hogy egy amidot racém formában a penicillin G aciláz enzimmel reagáltatnak olyan körülmények között, amelyek között a racém formában lévő amid egyik enantiomerje szelektíven dezacileződik, a megfelelő β aminosavvá alakul, az

15 amid másik enantiomerjét pedig enantiomer dús formában nyerik ki. Az eljárást az 5. reakcióvázlaton szemléltetjük.

Az eddig ismertetett eljárások nagy hátránya azonban, hogy magával az enzimes lépéssel egyidejűleg vagy azt megelőzően egy intermedier amidon keresztül megy az eljárás. Ezt az intermedier

20 amidot a (VII) általános képlettel ábrázolhatjuk.

Az ilyen amid vizes közegben oldhatatlan az aromás gyűrű miatt, ez pedig különböző hátrányokkal jár. Ismert például, hogy bizonyos enzimek vizes közegben oldhatók, és gyakran érzékenyek szerves oldószerrel szemben. Ahhoz pedig, hogy az enzimes reakció optimális hozamú legyen, fontos, hogy a szubsztrátum az enzimhez képest jól oldódjon, abból a célból, hogy bensőségesen tudjanak egymással érintkezni.

25

Főként ezt a problémát kívánja a találmány megoldani. A találmány tárgya egyrészt új eljárás aminosav enantiomerjeinek elválasztására, amely abból áll, hogy az aminosav racém elegyét glutársav-anhidriddel, majd a glutaril 7-ACA aciláz enzimmel reagáltatjuk, így az aminosav egyik enantiomerjét kinyerjük, a másik enantiomer a megfelelő glutaril-amid-származék formájában marad az elegyben.

30



Ez az eljárás különösen előnyös, mivel a glutársav-anhidrid alkalmazása lehetővé teszi, hogy a kiindulási aminosavnak megfelelő glutaril-amid-származékon keresztül végezzük a reakciót, ahol a glutarilcsoport biztosítja a molekula vízoldhatóságát. Ennek az az eredménye, hogy a találmány szerinti eljárást enyhe reakciókörülmények között vizes közegben, vagyis szerves segédoldószer alkalmazása nélkül tudjuk elvégezni.

A találmány szerinti eljárás további előnye, hogy általánosan alkalmazható valamennyi aminosav forma (α , β , γ stb.) esetében). A találmány értelmében az aminosav általános kifejezésbe beleértjük magát az aminosavat, (vagyis azt a vegyületet, amelynek van egy aminocsoportja és egy -COOH) savcsoportja), valamint a megfelelő észtereket is (vagyis az olyan vegyületeket, amelyekben a savcsoportot egy észtercsoport COOR helyettesít). Előnyösen a találmány szerinti eljárást olyan (I) általános képletű aminosavakra alkalmazzuk, ahol

- n értéke egész szám, 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6,
- R jelentése hidrogénatom vagy alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, aril- vagy kondenzált policiklusos szénhidrogén-csoport vagy heterociklusos csoport, ahol valamennyi említett csoport adott esetben szubsztituálva van és

- R' jelentése alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, aril-, kondenzált policiklusos szénhidrogén- vagy heterociklusos csoport vagy alkil-, aril-, cikloalkil- vagy heterociklusos csoporttal szubsztituált oxi-, tio-, szulfoxid- vagy szulfonil-csoport, ahol valamennyi szubsztituens csoport adott esetben még szubsztituálva is van.

Amikor tehát az aminosav az (I) általános képletnek felel meg, a találmány szerinti eljárást a 6. reakcióvázlaton szemléltetjük. A reakcióvázlaton az első lépésben a glutársav-anhidriddel végzett reakciót, a második lépésben pedig a glutaril 7-ACA acilázzal végzett reakciót mutatjuk be. A kapott terméket konfigurációja, vagyis egyrészt az aminosav, másrészt a glutaril-amid-származék konfigurációja az R' csoport jelentésétől függ.

A találmány értelmében az alkil-, alkenil- és alkinil-csoportok általában 1-30 szénatomosak, lehetnek egyenes vagy elágazó láncúak, bár ez nem korlátozó jellegű. Ugyanez érvényes abban az esetben, amikor ezek a csoportok más csoportok szubsztituensei. Előnyösen ezek a csoportok 1-20 szénatomosak, egyenes vagy elágazó láncúak, különösen előnyösen 1-10 szénatomosak, egyenes vagy elágazó szénláncúak. Az alkilcsoportok közül példaként a következőket említhetjük: metil-, etil-, n-propil-, n-butil-, n-pentil-, n-hexil-, n-heptil-, n-oktil-, n-nonil-, n-decil-, n-undecil-, n-dodecil-, n-tridecil-, n-pentadecil-, n-hexadecil-, n-heptadecil-, n-oktadecil-, izopropil-, izobutil-, izopentil-, izohexil-, 3-metilpentil-, neopentil-, neohexil-, 2,3,5-trimetilhexil-, szek-butil-, terc-butil-, terc-pentil-csoport. Az előnyös alkilcsoportok közül példaként a metil-, etil-, n-propil-, izopropil-, n-butil-, izobutil-, szek-butil-, terc-butil-, n-pentil-, izopentil-, n-hexil- és izohexil-csoportot említjük. Az alkenilcsoportok közül példaként a következőket említjük: vinil-, 1-propenil-, allil-, butenil-, 2-metil-1-propenil-, 2-metil-2-propenil- és 3-metil-2-butenil-csoport. Az alkinilcsoportok közül megemlítjük az etinil-, az 1-propinil- és a propargil-csoportot.

A találmány értelmében a cikloalkil-csoportok általában 3-12 szénatomosak. Előnyösek az alábbiak: ciklopropil-, ciklobutil-, ciklopentil-, ciklohexil-, cikloheptil-, ciklooktil-, ciklononil-, ciklododecil-, cikloundecil- és ciklododecil-csoport. A találmány egy másik változata szerint a cikloalkilcsoportok lehetnek policiklusosak is. Ezek közül előnyösek a bicikloalkil és a tricikloalkil-csoportok.

A találmány értelmében "arilcsoport"-on egyértékű aromás szénhidrogén-csoportokat értünk. Az arilcsoportok közül előnyös az adott esetben szubsztituált fenilcsoport.

A találmány értelmében kondenzált policiklusos szénhidrogén-csoportok közül előnyösen az alábbiakat értjük: pentalin, indén, naptalén, azulén, heptalén, bifenilén, asindacén, sindacén, acenaftilén, fluorén, fenalén, fenantrén, antracén, fluorantén, acefenantrilén, aceantrilén, letrifenilén, pirén, krizén, naftacén, pleiadén, picén,



perilén, pentafén, pentacén, tetrafenilén, hexafén, hexacén, rubicén, koronén, trinaftilén, heptafén, heptacén, pirantrén és ovalén.

A találmány értelmében a "heterociklusos vegyület kifejezés monociklusos vagy kondenzált policiklusos vegyületet jelent, amely egy vagy több heteroatomot tartalmaz, ahol az egyes gyűrű 3-10-
5 tagú. A találmány szerint a heterociklusos vegyületek az oxigén-, kén- és nitrogénatom közül 1-3 heteroatomot tartalmaznak egy 3-10-
10 tagú gyűrűben. A találmány szerinti heterociklusos vegyületeket előnyösen az alábbiak közül választjuk: tiofén, benzo[b]tiofén, nafto[2,3-b]tiofén, tiantrén, furán, 2H-pirán, izobenzofurán, 2H-kromén, xantén, fenoxatiin, 2H-pirrol, pirrol, imidazol, pirazol, piridin, pirazin, pirimidin, piridazin, indolizin, izoindol, 3H-indol, indol, 1H-indazol, purin, 4H-kinolizin, izokinolein, kinolein, ftalazin, naftiridin-1,8, kinoxalin, kinazolin, cinnolin, pteridin, 4aH-karbazol, karbazol, β -
15 -karbolin, fanantridin, akridin, perimidin, fenantrolin-1,7, fenazin, fenarzazin, izotiazol, fenotiazin, izoxazol, furazán, fenoxazin, izokromán, pirrolidin, Δ 2-pirrolin, imidazolidin, Δ 2-imidazolin, pirazolidin, Δ 3-pirazolin, piperidin, piperazin, indolin, izoindolin, kinuklidin és morfolin.

20 A találmány szerint, amikor a fentebb említett különböző csoportok szubsztituálva vannak, akkor az egy vagy több szubsztituenszt általában az alábbiak közül választjuk: halogénatom, aril-, heterociklusos, hidroxil-, alkoxi-, ariloxi-, tio-, alkiltio-, ariltio-, alkilszulfoxid-, arilszulfoxid-, alkilszulfonil-, arilszulfonil-, ciano-, nitro-, szulfonamid-, alkilszulfonamid- és arilszulfonamid-, a csoport jelentésétől
25 függően. Előnyösen a fent definiált különböző csoportok egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan vannak szubsztituálva. A halogénatomot a klór-, fluor-, bróm- és jódatom közül választjuk. Abban az esetben, amikor az alkilcsoportok halogénatommal vannak
30 szubsztituálva, akkor a halogénatom előnyösen a fluoratom. A fluor szubsztituensek száma előnyösen 1, 2, 3, 4, 5, 6 vagy 7. Előnyös például a trifluormetil-csoport.

A találmány szerint az aminosavat előnyösen az olyan (I) álta-



lános képletű vegyületek közül választjuk, ahol n értéke egész szám, 0, 1, 2 vagy 3, R jelentése hidrogénatom, alkil- vagy arilcsoport és R' jelentése a fenti.

5 Különösen előnyösen a találmány szerint az aminosavat olyan (I) általános képletű vegyületek közül választjuk, ahol n értéke egész szám, 0, 1 vagy 2, R jelentése hidrogénatom vagy alkilcsoport és R' jelentése adott esetben szubsztituált aril- vagy heterociklusos csoport. Ez utóbbi esetben az aril- és/vagy heterociklusos csoport előnyösen egyszeresen, kétszeresen vagy háromszorosan van szubsztituálva.

10 A glutaril 7-ACA aciláz enzimet katalizátorként már alkalmazták számos ipari eljárásban, például β -laktámok, például N-glutaril-7-aminoacetoxicefalosporin-sav hidrolízisére. Az enzim számos mikroorganizmusból származhat, ilyenek például a következők:
15 Acinetobacter, Arthrobacter, Bacillus, Pseudomonas, Stenotrophonas vagy Xanthomonas nemhez tartozók, az előállításukra vonatkozó eljárások az enzimek területén jártas szakemberek számára jól ismertek. A glutaril 7-ACA aciláz enzim kereskedelmi forgalomban is kapható, például az alábbi gyártók termékeként: Roche Diagnostic GmbH
20 (Roche Molecular Biochemicals, Standhofer Stasse 116, D-68305 Mannheim) vagy Recordati S.p.A. (Stabilimento di opera, Via Lambro 38, I-20090 Opera (MI)).

25 A glutaril 7-ACA aciláz enzimet különböző formákban alkalmazhatjuk anélkül, hogy ez befolyásolná az enzim sztereospecifikus és sztereoszelektív tulajdonságait. Például a glutaril 7-ACA aciláz alkalmazhatjuk oldható alakban vagy immobilizált formában. Ez utóbbi esetben az enzim általában a szakember számára ismert eljárásokkal van immobilizálva. Például tartalmazhatják az enzimet polimer gélek vagy kapcsolódhat az enzim kovalens kötéssel, térhálósítással, adszorpcióval vagy kapszulázással különböző szilárd hordozókhoz. A
30 megfelelő és általánosan alkalmazott hordozók közül példaként a következőket említjük: porózus üveg, porózus kerámia, szintetikus polimer (például polisztorol, polivinilalkoholok, polietilén, poliamidok

vagy poliakrilamidok) vagy természetes eredetű polimer (például cellulóz).

A glutaril 7-ACA aciláz enzim alkalmazásával minden enantiomerre magas enantiomer felesleget ("ee") érhetünk el, például 90 %-ot vagy ennél magasabb értéket, sőt 95 %-ot vagy ennél magasabb értéket, előnyösen 99 %-ot vagy ennél magasabb értéket. A találmány értelmében "enantiomer felesleg"-en az egyik enantiomer százalékban kifejezett feleslegét értjük a racém elegyhez viszonyítva. Pontosabban az enantiomer felesleget az alábbiak szerint számítjuk:

10

$$ee (\%) = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]} \cdot 100 = \% (R) - \% (S)$$

[R] és [S] jelentése az (R) és (S) enantiomer koncentrációja.

Általában a kiindulási aminosav (szubsztrátum) teljes mennyiségéhez viszonyítva 1-100 egység (U) per mmól szubsztrátum enzimet, előnyösen 10-40 egység per mmól szubsztrátum enzimet alkalmazunk. 1 enzim egység annak az enzim mennyiségnek felel meg, amely percenként a szakember által ismert standard pH és hőmérséklet körülmények között 1 μmmól N-glutaril-7-aminoacetoxicefalosporin-sav hidrolíziséhez szükséges.

A találmány szerint a reakciót adott esetben pufferolt vizes közegben végezzük. Amennyiben puffert alkalmazunk, a 10 mmól és 200 mmól közötti koncentrációjú vizes puffert az 5 és 6,5 közötti pH-nál alkalmazható acetát pufferok, a 6,5 és 8 közötti pH-nál alkalmazható foszfát pufferok és a 8 és 9 közötti pH-nál alkalmazható pirofoszfát pufferok közül választhatjuk.

A találmány szerinti eljárást tehát olyan közegben végezzük, ahol a pH szabályozott és 6 és 9 közötti értékre van beállítva. Előnyösen a reakcióközeg pH-ja szabályozott és pontosan 7,5 és 8,5 közötti értékre van beállítva, még előnyösebben 8 és 8,5 közötti pH-értékre van beállítva. A pH-t "pH-stat"tal szabályozhatjuk sav, például sósav, kénsav vagy fosforsav hozzáadásával, és bázis, például nátrium-hidroxid, kálium-hidroxid vagy ammónia hozzáadásával.

A találmány szerint az aminosav és a glutársav-anhidrid reakcióját 20 és 40 °C közötti, előnyösen 25 és 35 °C közötti hőmérsékleten végezzük. A második lépést, ahol a glutaril 7-ACA acilázt alkalmazunk, 10 és 50 °C, előnyösen 25 és 35 °C közötti hőmérsékleten végezzük.

Végül a reakció időtartama összesen 1 óra és 100 óra között változik, függ az adott aminosavtól és az enzim koncentrációjától. Általában a reakciót annyi ideig hagyjuk végbemenni, amennyi idő ahhoz szükséges, hogy kielégítő enantiomer feleslegben kapjunk meg a kívánt enantiomert. A kapott királis aminosav mennyiségét és az enantiomer felesleget a szakember által ismert hagyományos eljárások alkalmazásával ellenőrizzük. Előnyösen ezt az ellenőrzést HPLC (nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás eljárás) eljárással végezzük.

A találmány szerint a fentiekben ismertetett eljárással kapott (R) és (S) enantiomert könnyen el lehet választani, mivel az egyik a vizes közegben oldható amin formában, a másik szilárd amid formában van. A találmány további tárgya tehát a fentiekben ismertetett eljárás, amely tartalmazza az (R) és (S) enantiomerek elválasztási lépését is.

Az (R) és (S) enantiomerek elválasztását könnyen elvégezhetjük a szakember által ismert hagyományos eljárásokkal. Az elválasztást végezhetjük például szűréssel, extrahálással, kromatográfiás eljárással vagy kristályosítással.

Abban az esetben, ha a másik enantiomert aminosav formában, nem pedig glutaril-amid-származék formájában kívánjuk izolálni, akkor a találmány szerinti eljárással izolált glutaril-amid enantiomert hidrolizáljuk, így enantiomer formában nyerjük ki a megfelelő aminosavat. Meg kell jegyezni, hogy ez az eljárás előnyös, mivel a hidrolízissel megőrizzük a szóbanforgó vegyület sztereokémiáját, a hidrolízis során a királis glutaril-amid-származék nem racemizálódik. Abban az esetben, ha az aminosavak az (I) általános képletű vegyületek közé tartoznak, ezt a további lépést a 7. reakcióvázlaton mutatjuk be.

A hidrolízist a szakember által ismert hagyományos eljárásokkal végezzük. A hidrolízis lehet savas vagy lúgos hidrolízis. Ez utóbbi esetben például bázis, így nátrium-hidroxid jelenlétében végezzük a reakciót 50 és 90 °C közötti hőmérsékleten, atmoszférikus nyomáson.
 5 Ettől eltérő, a szakember által ismert műveleti körülmények is alkalmazhatók azonban.

A találmány hasznos, mivel segítségével a racém elegy formájában levő aminosavak elválaszthatók, ami lehetővé teszi, hogy az említett aminosav egyik vagy másik enantiomerjét előállítsuk, amely
 10 enantiomerek például szintézis intermedierek.

Például a találmány szerinti eljárással megkaphatjuk az (S) 3-amino-3-fenil-propánsavat, amely hasznos intermedier a (VIII) képletű vegyület előállításánál. A (VIII) képletű vegyület a VLA4 receptor antagonistája, és mint ilyen asztma kezelésénél használható.

15 A találmányt a következőkben példákkal illusztráljuk, ezek azonban nem használhatók a találmány oltalmi körének korlátozására. A példák közül a találmány további jellemzői és előnyei is kitűnnek.

A találmány szerinti eljárást bemutató reakcióvázlatok rövid ismertetése

20 6. reakcióvázlat: Egy (I) általános képletű aminosav találmány szerinti eljárással történő kezelésének ábrázolása. Az 1. lépésben a vegyületet glutársav-anhidriddel reagáltatjuk, a 2. lépésben a glutaril 7-ACA aciláz enzimmal reagáltatjuk. Az előállított termékek konfigurációja, vagyis egyrészt az aminosav, másrészt a glutaril-amid-származék konfigurációja az R' csoport jelentésétől függ.
 25

A 7. reakcióvázlaton a királis glutaril-amid-származéknak a megfelelő királis aminosavvá hidrolízis útján történő átalakítását szemléltetjük.

1. példa

30 Racém elegy formájában lévő 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsav rezolválása

a) Racém 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsav acilezése

40,6 g racém 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat feloldunk

200 ml desztillált víz és 55 ml trietil-amin elegyében. Kis részletekben hozzáadunk 29,4 g glutársav-anhidridet, és a reakcióelegyet 1 órán keresztül keverjük. A reakcióelegyet ezután 8,2 ml 95 tömeg/térf.%-os kénsavval savanyítjuk. A kapott csapadékot leszűrjük, 3 x 15 ml desztillált vízzel mossuk és 55 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 52,84 g racém 3-(glutarilamid)-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk.

A kapott termék minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

10 b) Enzimes dezacilezés kristályos glutaril 7-ACA acilázzal szuszpenzióban (100 ml-es reaktorban)

20 g előző lépés szerint előállított savat feloldunk 75 ml desztillált vízben. A szuszpenzió pH-ját 8,2-re állítjuk be 11,2 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid hozzáadásával. A kapott oldathoz hozzáadunk 826 mg (626 egység) kristályos glutaril 7-ACA aciláz szuszpenziót. A reakcióelegyet 51 órán keresztül 35 °C-on 7,9 és 8,1 közé beállított mért pH-nál végezzük. A reakció végén a reakcióelegyet 20 °C-ra hűtjük, és a pH-t 5 N sósav hozzáadásával 7,0 értékre állítjuk be. Ezután 20 ml etanolt adagolunk. A kapott (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsav csapadékot leszűrjük, 3 x 30 ml etanollal mossuk és vákuumban 45 °C-on állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 5,65 g (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk, enantiomer feleslege nagyobb, mint 99 %.

25 Az anyalúgot 17,5 ml 5 N sósavval savanyítjuk. A képződött csapadékot leszűrjük, 2 x 10 ml desztillált vízzel mossuk. A szűrőlepenyt 45 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 8,25 g (S) 3-(glutarilamid)-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat és (R) 3-(glutarilamid)-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk 91:9 arányban.

A kapott termékek minőségét HPLC eljárással határoztuk meg.

30 c) Enzimes dezacilezés immobilizált glutaril 7-ACA acilázzal, amelyet a Roche Diagnostic GmbH cégtől szerzünk be (100 ml-es reaktorban végezzük a reakciót)

20,5 g a) lépés szerint előállított savat feloldunk 75 ml desztillált vízben. A szuszpenzió pH-ját 11,9 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-

hidroxid hozzáadásával 8,2-re állítjuk be. Az oldathoz hozzáadunk 6,2 g (632,4 egység) nedves immobilizált glutaril 7-ACA acilázt (Roche Diagnostic GmbH). A reakcióelegyet 18 órán keresztül 35 °C-on keverjük, pH-ját ellenőrizzük és 7,9 és 8,1 közötti értéken tartjuk.

5 A reakció végén a reakcióelegy pH-ját 30 tömeg/térf.%-os nátriumhidroxid hozzáadásával 9,5-re állítjuk be, és a reakcióelegy térfogatát 200 ml-re egészítjük ki, így feloldjuk az előállított (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat. Az immobilizált enzimet szűréssel eltávolítjuk, az anyalúg pH-ját 5 N sósav hozzáadásával 7,0 értékre állítjuk
10 be. Ezután a reakcióelegyhez 50 ml etanolt adunk. A csapadék formájában kiváló (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat leszűrjük, 10 ml etanollal mossuk és 45 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 5,375 g (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk, amelynek enantiomer feleslege 98 %.

15 Az anyalúgot 20 ml 5 N sósavval savanyítjuk. A képződő csapadékot leszűrjük, 2 x 15 ml desztillált vízzel mossuk. A szűrőlepenyt 45 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 6 g (S) 3-glutarilamid)-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk 94:6 arányban.

A kapott termékek minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

20 d) Enzimes dezacilezés kristályos glutaril 7-ACA acilázzal szuszpenzióban (500 ml-es reaktorban)

100 g a) lépés szerint előállított racém 3-(glutarilamid)-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat feloldunk 400 ml desztillált vízben. A szuszpenzió pH-ját 8,2-re állítjuk be 60 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid hozzáadásával. A kapott oldathoz hozzáadunk 6,4 g (4653 egység)
25 kristályos glutaril 7-ACA aciláz szuszpenziót. A reakcióelegyet 30 órán keresztül 35 °C-on keverjük, pH-ját ellenőrizzük és 7,9 és 8,1 közötti értéken tartjuk. A reakció végén a reakcióelegyet 20 °C-ra hűtjük, pH-ját 25 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid hozzáadásával 13-ra állítjuk be, így a képződött (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-
30 -propánsav feloldódik. Az oldhatatlan részeket leszűrjük, az anyalúg pH-ját 27 ml 36 %-os sósav hozzáadásával 7,0-ra állítjuk be. Ezután a reakcióelegyhez 100 ml etanolt adunk, a kapott (R) 3-amino-3-(4'-

-nitrofenil)-propánsav csapadékot leszűrjük, 2 x 100 ml etanollal mossuk, majd 45 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 28,87 g (R) 3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsavat kapunk, enantiomer feleslege 97 %.

5 A kapott termék minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

2. példa

Racém elegy formájában lévő 3-amino-3-fenil-propánsav rezolválása

a) Racém 3-amino-3-fenil-propánsav acilezése

10 488 g racém 3-amino-3-fenil-propánsavat feloldunk 2 l desztillált vízben, amely 236 g nátrium-hidroxid pasztillát tartalmaz. Kis részletekben 1 óra alatt a reakcióelegyhez keverés közben 20 °C-on hozzáadunk 437,5 g glutársav-anhidridet. 1 óra elteltével a reakcióelegyet 236 ml 95 tömeg/térf.%-os kénsavval savanyítjuk és 10 °C-ra
15 hűtjük. A képződött csapadékot leszűrjük, 3 x 600 ml desztillált vízzel mossuk. A kapott 1610 g nedves szűrőlepeny 602 g racém 3-glutarilamid-3-fenil-propánsavat tartalmaz. A kapott termékek minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

20 b) Enzimes dezacilezés kristályos glutaril 7-ACA acilázzal szuszpenzióban (5 l-es reaktorban)

1575 g előzőek szerint előállított nedves szűrőlepenyt, amely 589 g racém 3-glutarilamid-3-fenil-propánsavat tartalmaz, feloldunk 1610 ml desztillált vízben. A szuszpenzió pH-ját 8,0-ra állítjuk be 440 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid hozzáadásával. A kapott oldathoz hozzáadunk 52,6 g (32 000 egység) kristályos glutaril 7-ACA aciláz szuszpenziót. A reakcióelegyet 41 órán keresztül 35 °C-on keverjük, pH-ját ellenőrizzük és 7,9 és 8,1 közötti értéken tartjuk. A reakció végén a reakcióelegyet 20 °C-ra hűtjük, a pH-ját 25 ml 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid hozzáadásával 13-ra állítjuk be, így
30 feloldódik a képződött (R)-3-amino-3-(4'-nitrofenil)-propánsav. Az oldhatatlan részeket leszűrjük, az anyalúg pH-ját 27 ml 36 %-os sósav hozzáadásával 7,0 értékre állítjuk be.

Az így kapott (R) 3-amino-3-fenil-propánsav csapadékot le-

szűrjük, 150 ml desztillált vízzel mossuk és 45 °C-on vákuumban állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 96,9 g (R) 3-amino-3-fenil-propánsavat kapunk 98 %-os enantiomer felesleggel.

Az anyalúgot 180 ml 95 tömeg/térf.%-os kénsavval savanyítjuk.

- 5 Az így kapott csapadékot leszűrjük, 2 x 400 ml hideg desztillált vízzel mossuk. A szűrőlepenyt vákuumban 45 °C-on állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 314,6 g (S) 3-(glutarilamid)-3-fenil-propánsavat és (R) 3-(glutarilamid)-3-fenil-propánsavat kapunk 90:10 arányban.

A kapott termékek minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

- 10 c) (S) 3-glutarilamid-3-fenil-propánsav dezacilezése lúgos hidrolízissel

- 557,2 g (S) 3-glutarilamid-3-fenil-propánsav és (R) 3-glutarilamid-3-fenil-propánsav b) lépés szerint előállított 90:10 arányú elegyét feloldjuk 3,91 l desztillált víz és 1,65 l 30 tömeg/térf.%-os nátrium-hidroxid elegyében. A reakcióelegyet 4 napig 70 °C-on keverjük, majd 15 °C-ra hűtjük.
- 15

- A kapott termék csapadék formában kiválik, amikor a pH-t 3,21 l 37 tömeg/térf.%-os sósav hozzáadásával 6,9-re állítjuk be. A csapadékot leszűrjük és vákuumban 45 °C-on állandó tömeg eléréséig szárítjuk. 202,4 g (S) 3-amino-3-fenil-propánsavat és (R) 3-amino-3-fenil-propánsavat kapunk, enantiomer felesleg 98 %.
- 20

A kapott termékek minőségét HPLC eljárással határozzuk meg.

25

30

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás aminosav enantiomerjeinek elválasztására, **azzal jellemezve, hogy** az aminosav racém elegyét glutársav-
 5 anhidriddel, majd a glutaril 7-ACA aciláz enzimmel reagáltatjuk, így az aminosav egyik enantiomerjét kinyerjük, míg a másik enantiomer a megfelelő glutaril-amid-származék formájában marad.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** az aminosav az (I) általános képlettel ábrázolható, ahol

10 - n értéke egész szám, 0, 1, 2, 3, 4, 5 vagy 6,

- R jelentése hidrogénatom vagy alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, aril- vagy kondenzált policiklusos szénhidrogén-csoport vagy heterociklusos csoport, ahol valamennyi említett csoport adott esetben szubsztituálva van és

15 - R' jelentése alkil-, alkenil-, alkinil-, cikloalkil-, aril-, kondenzált policiklusos szénhidrogén- vagy heterociklusos csoport vagy alkil-, aril-, cikloalkil- vagy heterociklusos csoporttal szubsztituált oxi-, tio-, szulfoxid- vagy szulfonil-csoport, ahol valamennyi szubsztituens csoport adott esetben még szubsztituálva is van.

20 3. A 2. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** az aminosavat olyan (I) általános képletű vegyületek közül választjuk, ahol n értéke egész szám, 0, 1, 2 vagy 3, R jelentése hidrogénatom, alkil- vagy arilcsoport és R' jelentése a 2. igénypont szerinti.

25 4. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** az aminosavat olyan (I) általános képletű vegyületek közül választjuk, ahol n értéke egész szám, 0, 1 vagy 2, R jelentése hidrogénatom vagy alkilcsoport és R' jelentése adott esetben szubsztituált aril- vagy heterociklusos csoport.

30 5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve, hogy** a glutaril 7-ACA aciláz enzimet oldható formában vagy immobilizált formában alkalmazzuk.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jelle-**

I e m e z v e, hogy a kiindulási aminosav (szubsztrátum) teljes mennyiségére vonatkoztatott felhasznált enzim mennyiség 1 mmól szubsztrátumra vonatkoztatva 1 és 100 egység közötti.

5 **7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a reakciót pufferolt vizes közegben végezzük.**

10 **8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a vizes puffer koncentrációja 10 mmól és 200 mmól közötti, és azt az 5 és 6,5 közötti pH-nál alkalmazható acetát pufferok, a 6,5 és 8 közötti pH-nál alkalmazható foszfát pufferok és a 8 és 9 közötti pH-nál alkalmazható pirofoszfát pufferok közül választjuk.**

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a pH-t ellenőrizzük és 6 és 9 közötti értékre állítjuk be.

15 **10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az aminosav és a glutársav-anhidrid reakcióját 20 °C és 40 °C közötti hőmérsékleten végezzük.**

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a glutaril 7-ACA aciláz enzimmel történő kezelést 10 °C és 50 °C közötti hőmérsékleten végezzük.

20 **12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy a reakció időtartama 1 óra és 100 óra között változik.**

25 **13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy tartalmazza az (R) és (S) enantiomer elválasztására szolgáló lépést is.**

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az (R) és (S) enantiomer elválasztását szűréssel, extrahálással, kromatográfias eljárással vagy kristályosítással végezzük.

30 **15. A 13. vagy 14. igénypont szerinti eljárás, azzal j e l l e m e z v e, hogy az elválasztott glutaril-amid-származék enantiomert hidrolizáljuk is, így a megfelelő aminosavat enantiomer formában nyerjük ki.**

16. Eljárás egy aminosav enantiomerjei elválasztására, azzal

j e l l e m e z v e, h o g y

a) az aminosav racém elegyét glutársavval, majd a glutaril 7-ACA aciláz enzimmal reagáltatjuk, így az aminosav egyik enantiomerjét kinyerjük, míg a másik enantiomer a megfelelő glutaril-amid-származék formában marad vissza,

b) majd a kapott két enantiomert elválasztjuk.

17. Eljárás egy aminosav enantiomerjei elválasztására, **azzal j e l l e m e z v e, h o g y**

a) az aminosav racém elegyét glutársavval, majd a glutaril 7-ACA aciláz enzimmal reagáltatjuk, így az aminosav egyik enantiomerjét kinyerjük, míg a másik enantiomer a megfelelő glutaril-amid-származék formában marad vissza,

b) majd a kapott két enantiomert elválasztjuk,

c) és a glutaril-amid-származék enantiomert hidrolizáljuk, így a megfelelő aminosavat enantiomer formában nyerjük ki.

Tisztelettel:

a meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

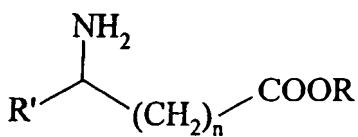

Baranyi Éva

szabadalmi ügyvivő

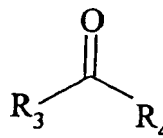
16 oldal
5 a lap oldal

21 oldal

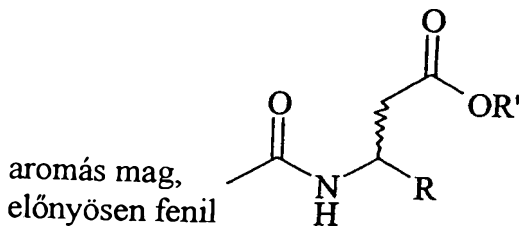
Peru



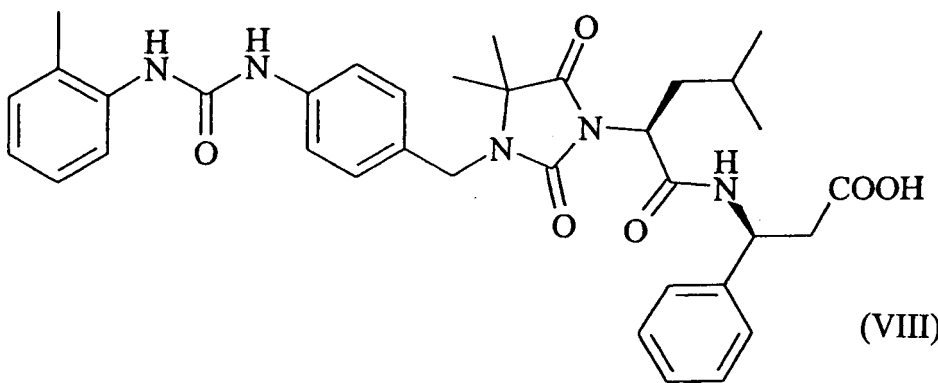
(I)



(VI)

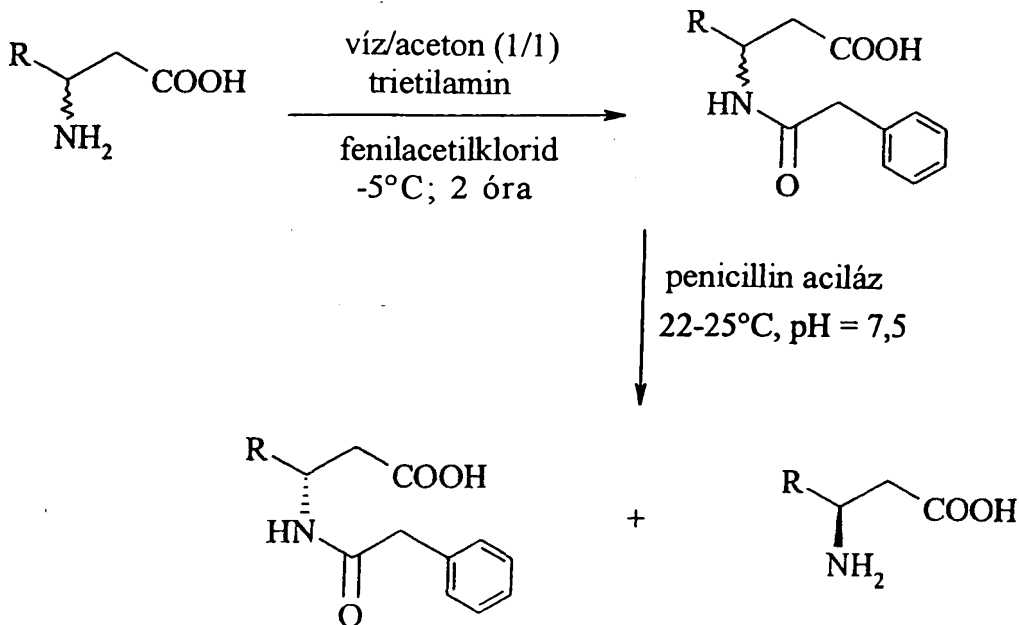


(VII)



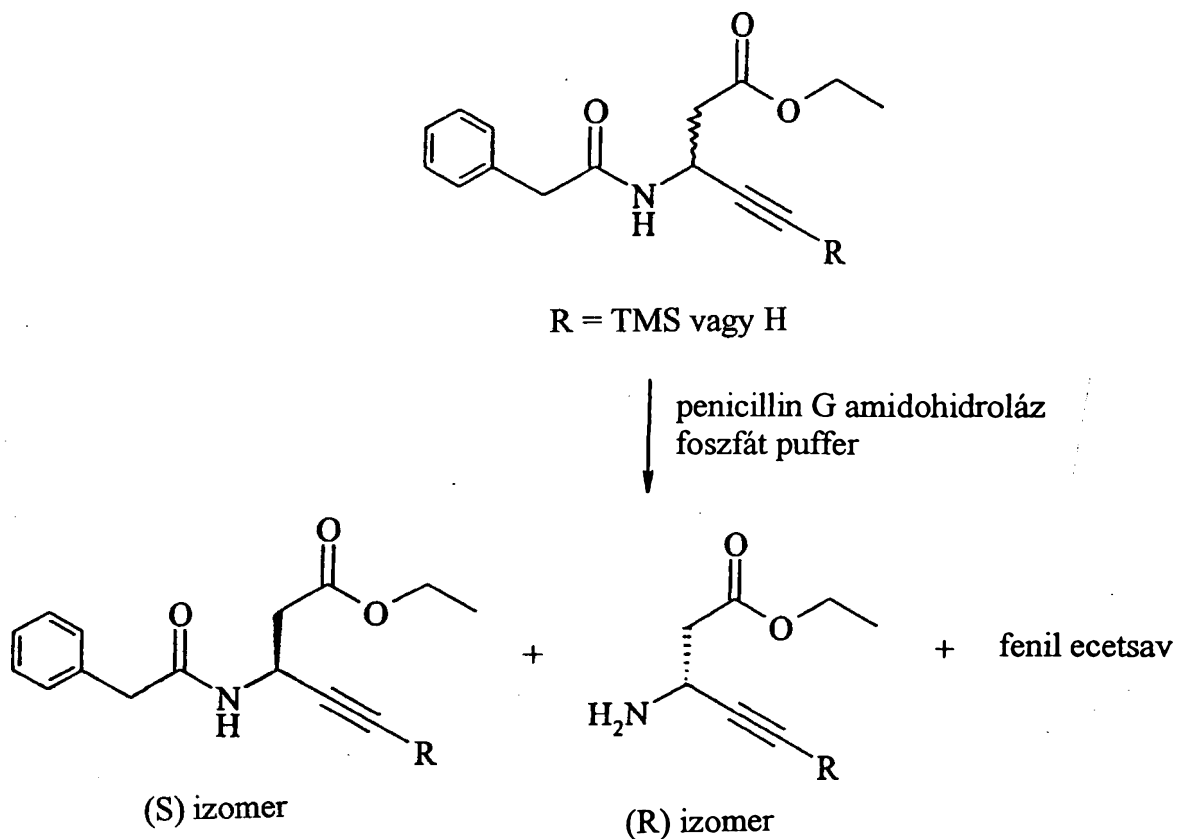
(VIII)

1. reakcióvázlat

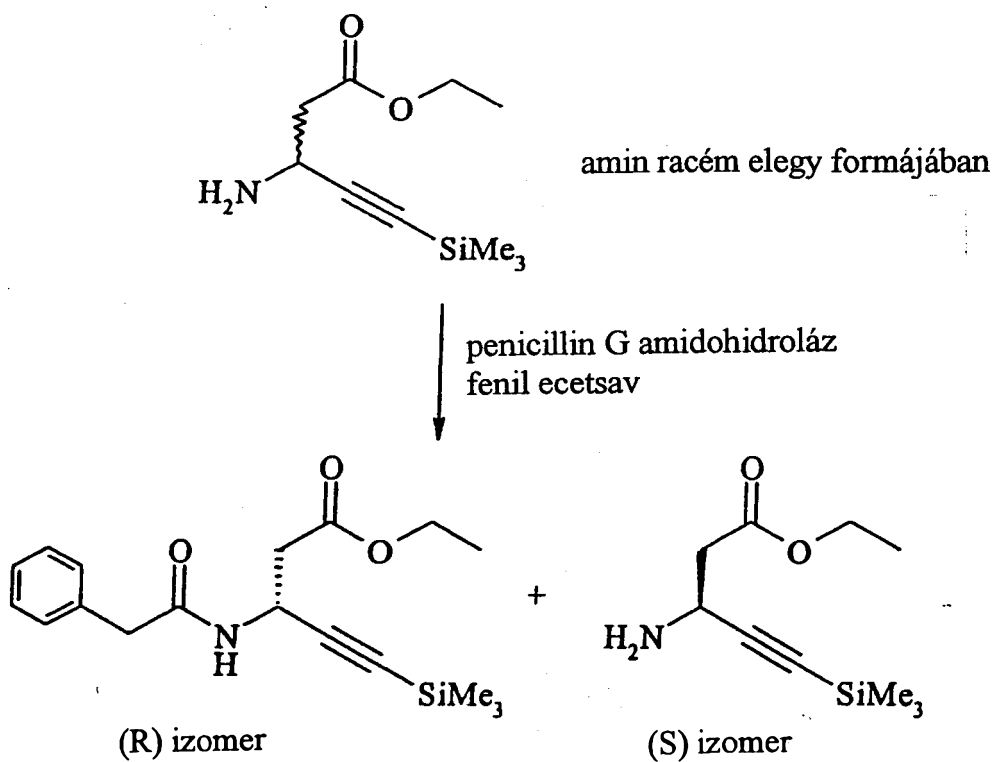


2. reakcióvázlat

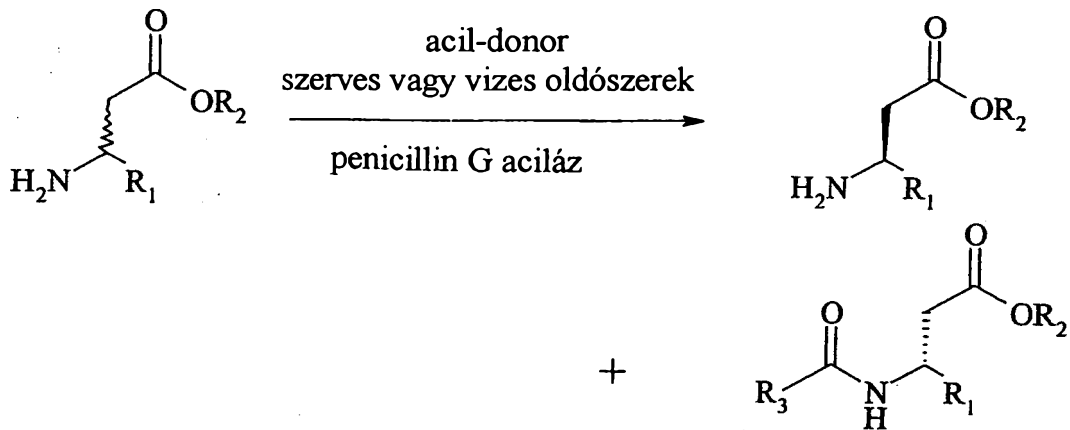
2/5



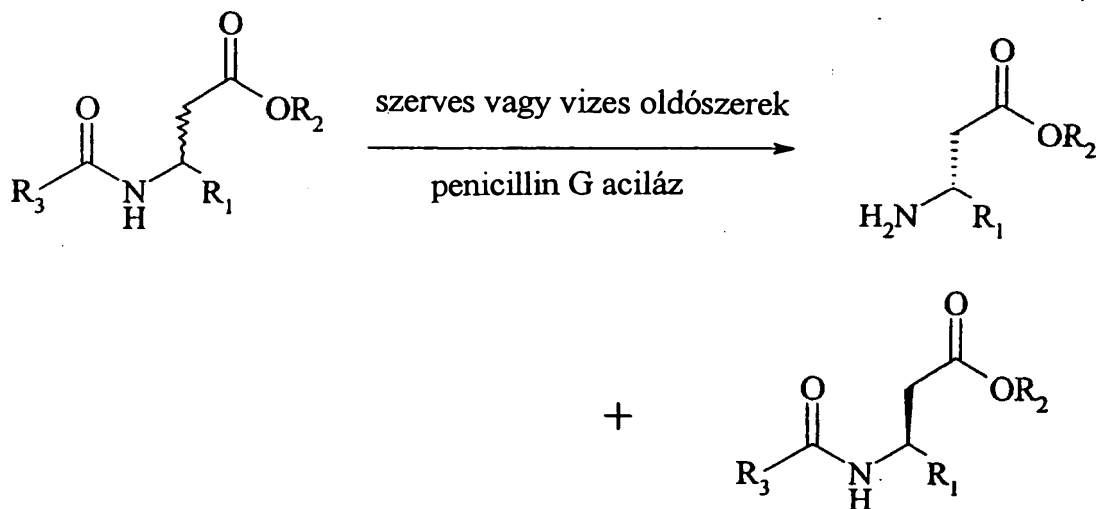
3. reakcióvázlat



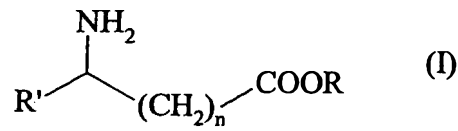
4. reakcióvázlat



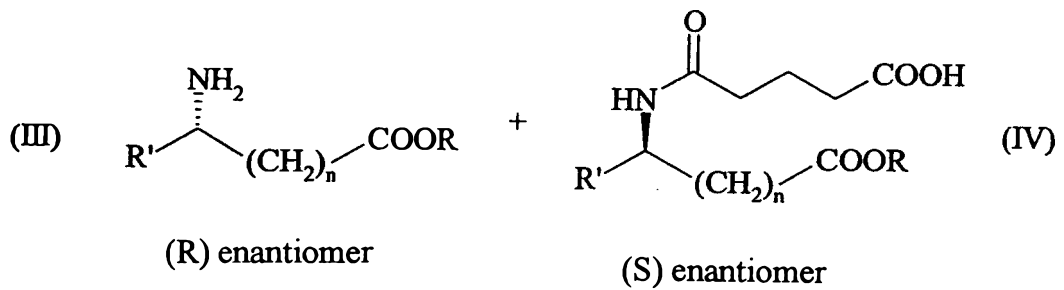
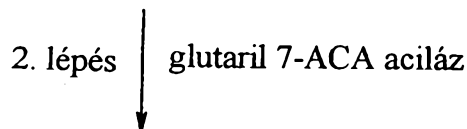
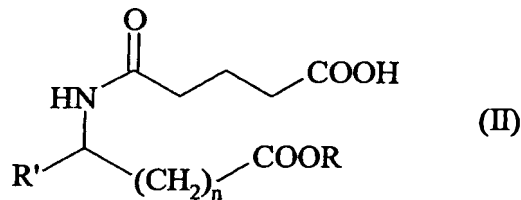
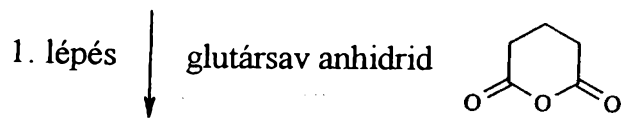
5. reakcióvázlat



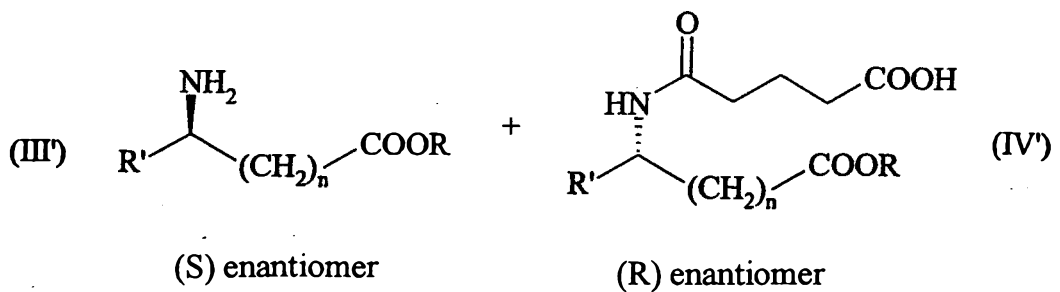
6. reakcióvázlat



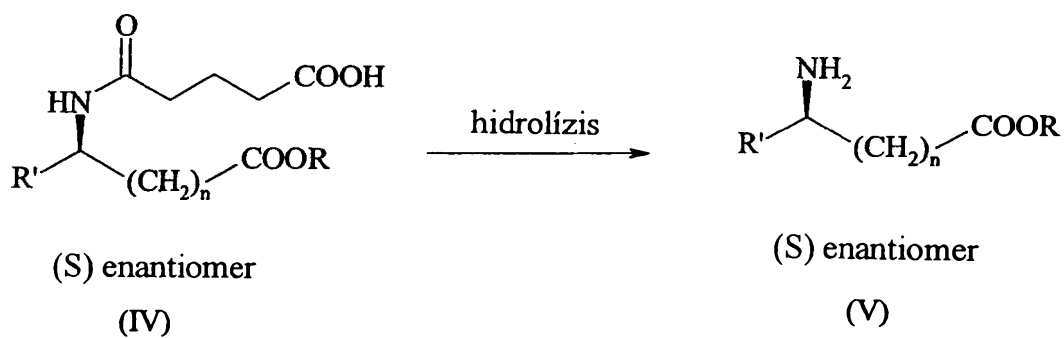
(racém elegy)



vagy R' jelentésétől függően:



7. reakcióvázlat



vagy:

