

Даний винахід відноситься до удосконалень ферментативного синтезу хіральних сполук, що містять аміногрупу, наприклад, хіральних амінів.

У патентах США №№4950606, 5169780, 5300437 і 5360724, розкриття інформації про яких включене в даний текст для зведення, описане енантіомерне збагачення хіральних амінів за допомогою використання трансамінази амінокислоти. Трансамінази амінокислот є відомими залежними від піридоксальфосфату ферментами, знайденими в різних мікроорганізмах, включаючи *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Candida*, *Streptomyces*, *Aspergillus* і *Neurospora*. Дві трансамінази амінокислот EC 2.6.1.18 і EC 2.6.1.19 кристалізовані і охарактеризовані авторами Yonaha et al., *Agric. Biol. Chem.*, 47(10), 2257-2265 (1983).

У патентах США №№ 4950606, 5169780 і 5300437 описується, що індивідуальні штами організмів, що містять трансаміназу, можуть бути виділені за допомогою культивування в хемостаті, тобто культивування в постійному, але обмеженому хімічному оточенні, з акцептором аміногрупи і аміном як єдиним джерелом азоту. Типовий штам, виділений таким чином у вищезгаданих патентах, охарактеризований (в Американській колекції типів культур) як *Bacillus megaterium*. Звичайно трансамінази омега-амінокислот метаболізують амінокислоти, в яких аміногрупа знаходиться на кінцевому, ахіральному (нехіральному) вуглецевому атомі, і амін, що використовується як джерело азоту в подібній хемостатній культурі, може бути того ж самого типу, а саме ахіральним аміном, таким як *n*-октиламін, циклогексиламін, 1,4-бутандіамін, 1,6-гександіамін, 6-аміногексанова кислота, 4-аміномасляна кислота, тирамін і бензиламін. У тих патентах також повідомляється, однак, що амін, який використовується як джерело азоту в таких хемостатних культурах, може бути хіральним аміном, таким як 2-амінобутан, α -фенетиламін і 2-аміно-4-фенілбутан. Можуть використовуватися хіральні амінокислоти, такі як L-лізин, L-орнітин, β -аланін і таурин.

Крім енантіомерного збагачення в патентах США №№ 4950606, 5169780 і 5300437 описаний стереоселективний синтез однієї хіральної форми аміну за допомогою дії трансамінази амінокислоти на кетон формули R^1COR^2 , в якій R^1 і R^2 є різними алкільними або арильними групами, в присутності донора аміногрупи. Описані донори аміногрупи подібні амінам, що використовуються як джерело азоту в хемостатних культурах; наприклад, ахіральним амінам, в яких аміногрупа знаходиться на кінцевому вуглецевому атомі, таким як пропіламін і бензиламін, хіральним амінам, в яких аміногрупа знаходиться на кінцевому вуглецевому атомі, таким як (S)-2-амінобутан, і хіральним амінокислотам, таким як L-аланін і L-аспарагінова кислота.

Даний винахід заснований на виявленні того, що ахіральний амін 2-амінопропан несподівано є кращим як донор аміну в такому трансаміназному синтезі амінів в порівнянні з ахіральними амінами, в яких аміногрупа знаходиться на кінцевому вуглецевому атомі, або хіральними амінами, в яких аміногрупа знаходиться на некінцевому вуглецевому атомі. Таким чином, винахід являє собою удосконалення відомого стереоселективного синтезу хірального аміну, в процесі якого кетон приводиться в контакт з трансаміназою в присутності донора аміногрупи, з використанням як донора аміногрупи 2-амінопропану.

Термін "хіральний амін" застосовується тут в самому широкому значенні. Як описано у перелічених вище патентах, відомий стереоспецифічний синтез може застосовуватися для отримання широкої різноманітності аліфатичних і аlicиклічних сполук різних і змішаних функціональних типів, що характеризуються тільки присутністю первинної аміногрупи, пов'язаних з повторним вуглецевим атомом, який крім атома водню, несе або (i) двовалентну групу, що утворює хіральну циклічну структуру, або (ii) два заступники (відмінних від водню), відмінних один від одного по структурі або хіральності.

Двовалентні групи, що утворюють хіральну циклічну структуру, включають, наприклад, 2-метилбутан-1,4-дііл, пентан-1,4-дііл, гексан-1,4-дііл, гексан-1,5-дііл, 2-метилпентан-1,5-дііл. Таким чином, дане удосконалення, що полягає у використанні 2-амінопропану як донора аміну, може використовуватися в стереоспецифічному синтезі 1-аміно-2-метилциклопентану з 2-метилциклопентанону, 1-аміно-3-метилциклопентану з 3-метилциклопентанону, 1-аміно-2-метилциклогексану з 2-метилциклогексанону і т.д.

Два різних заступники у повторного вуглецевого атома (R^1 і R^2 , приведені вище) також можуть варіювати в широких межах і включають алкіл, аралкіл, арил, галоген, гідрокси, нижчий алкіл, нижчий алкокси, нижчий алкілтію, циклоалкіл, карбокси, карбалкокси, карбамоїл, моно- і ди-(нижчий алкіл)заміщений карбамоїл, трифторметил, феніл, нітро, аміно, моно- і ди-(нижчий алкіл)заміщений аміно, алкілсульфоніл, арилсульфоніл, алкілкарбоксамідо, арилкарбоксамідо і т.д., а також алкіл, аралкіл або арил, заміщений вищенаведеними заступниками.

Таким чином, дане удосконалення, що полягає у використанні 2-амінопропану як донора аміну, може застосовуватися в стереоспецифічному синтезі 2-амінобутану з бутанону, 2-аміно-1-бутанолу з 1-гідроксибутан-2-ону, аланіну з піровиноградної кислоти, 1-аміно-1-фенілетану з ацетофенону, 1-аміно-1-(2-метокси-5-фторфеніл)етану з 2-метокси-5-фторацетофенону, γ -аміновалеріанової кислоти з левулінової кислоти, 1-аміно-1-фенілпропану з 1-фенілпропан-1-ону, 1-аміно-1-(4-бромфеніл)пропану з 1-(4-бромфеніл)пропан-1-ону, 1-аміно-1-(4-нітрофеніл)пропану з 1-(4-нітрофеніл)пропан-1-ону, 1-феніл-2-амінопропану з 1-фенілпропан-2-ону, валіну з 2-оксо-3-метилмасляної кислоти 1-(3-трифторметилфеніл)-2-амінопропану з 1-(3-трифторметилфеніл)пропан-1-ону, 2-амінопропанолу з гідроксипропанону, 1-метокси-2-амінопропану з 2-метоксиоксипропанону, 1-аміно-1-фенілбутану з 1-фенілбутан-1-ону, 1-феніл-2-амінобутану з 1-фенілбутан-2-ону, 1-(2,5-диметокси-4-метил-феніл)-2-амінобутану з 1-(2,5-диметокси-4-метилфеніл)бутан-2-ону, 1-(4-гідроксифеніл)-3-амінобутану з 1-(4-гідроксифеніл)бутан-3-ону, 1-аміно-1-(2-нафтил)етану з 2-ацетилнафталіну, фенілаланіну з фенілпіровиноградної кислоти, глутамінової кислоти з 2-кетоглутарової кислоти, аспарагінової кислоти з 2-кетобурштинової кислоти і т.д.

У протилежність донорам аміну, що повідомляються в попередньому рівні техніки, і дійсно більшості аміноалканових донорів аміногруп, які є теоретично доступними, 2-амінопропан володіє відносно унікальним поєднанням, а саме (i) є ахіральним і (ii) має аміногрупу на некінцевому аліфатичному вуглецевому атомі. Таким чином, незважаючи на використання трансамінази омега-амінокислоти, яка за природою діє на аміногрупу в кінцевому або ω -положенні амінокислоти, було знайдено, що використання як донора аміногрупи сполуки, що має аміногрупу на некінцевому аліфатичному вуглецевому атомі, дає термодинамічну перевагу. Не бажаючи прив'язуватися до якої-небудь теорії, вважаємо, що це

удосконалення є наслідком побічного продукту ферментативної реакції, який є в цьому випадку кетоном, в протилежність використанню донора аміну, що має аміногрупу на кінцевому вуглецевому атомі, такого як етил-амін, н-пропіламін, н-октиламін, 1,4-бутандіамін, 1,6-гександіамін, 6-аміногексанова кислота, 4-аміномасляна кислота, тирамін або бензиламін, який утворить альдегід при реакції в присутності трансамінази амінокислоти. У реакціях, в яких утворюються амінокислоти з кетокислот, термодинамічна перевага використання ізопропіламіну як донора аміногрупи приводить в результаті до константи рівноваги, рівної приблизно 1000. Оскільки дана термодинамічна перевага є слідством хімічного навколишнього середовища реагуючої карбонільної групи, це в рівній мірі застосовно і до синтезу всіх хіральних α -амінокислот з їх кетокислот, природних або неприродних.

Незважаючи на дану термодинамічну перевагу, присутність аміногрупи на кінцевому аліфатичному вуглецевому атомі приводить, в основному, до хіральності, в порівнянні із заміщенням на кінцевому вуглецевому атомі, який, обов'язково маючи два водневих атоми, запобігає хіральності. Оскільки трансаміназа є стереоселективною, використання хіального донора аміну означає, що тільки половина такого аміну є доступною як донор. З промислової точки зору, це є неприйнятним для донора аміногрупи.

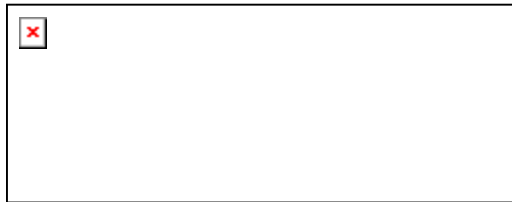
На жаль, величезна більшість аміно(нижчих)алканів, що задовольняють першій вимозі наявності аміногрупи на некінцевому вуглецевому атомі, є самі по собі хіральними. Таким чином, обмежуючи увагу аміноалканами, що мають не більше за 8 вуглецевих атомів, визначили, що теоретично існує, принаймні, 130 можливих гомологічних і ізомерних амінів, в яких аміногрупа не знаходиться на три заміщеному вуглецевому атомі (щоб бути донором аміногрупи, сполука повинна також нести, принаймні, один доступний атом водню на вуглецевому атомі, до якого приєднується аміногрупа). З цих 130 можливих донорів аміногрупи менше за половину (54) мають аміногрупу на некінцевому вуглецевому атомі і з них 93% (50) є хіральними. Тільки 4 з алкіламінів, що мають аміногрупу на некінцевому вуглецевому атомі, є ахіральними і з них 3 є непридатними з точки зору вартості і доступності і, крім того, невідповідними як донори аміногрупи: 3-амінопентан, 2,2-диметил-3-амінопентан і 4-аміногептан. Таким чином, з всіх аміно(нижчих)алканів, теоретично відповідних як донори аміногрупи, тільки 2-амінопропан (i) має аміногрупу на кінцевому вуглецевому атомі і таким чином є термодинамічно більш сприятливим серед аміноалканів, в яких аміногрупа знаходиться на кінцевому вуглецевому атомі, (ii) є ахіральним так, щоб бути повністю доступним для реакції і (iii) є прийнятним з точки зору вартості і доступності. Як подальша перевага, 2-амінопропан також дає побічний продукт, ацетон, який може легко виділятися і сам по собі є статтею торгівлі.

Ферментативне перетворення може проводитися за допомогою звичайних прийомів культивування з ізолюваними, але незростаючими клітинами, або з препаратом розчинної трансамінази амінокислоти. Трансаміназа амінокислоти може бути у вільній формі або у вигляді вільного від клітин екстракту або препарату цілих клітин або може бути імібілізованою на відповідній підкладці або відповідній матриці, такий як поперечно-зшитий декстран або агароза, кремнезем, поліамід або целюлоза. Вона також може бути інкапсульованою в поліакриламіді, альгінатах, волокнах або аналогічних. Способи такої імібілізації описані в літературі (див., наприклад, *Methods of Enzymology*, 44, 1976).

Хоч це і не є необхідним, звичайно доцільно додавати джерело піридоксаміну, таке як піридоксальфосфат.

ПРИКЛАД 1.

Винахід може бути проілюстрований прикладом отримання (S)-1-метокси-2-амінопропану, проміжної сполуки для синтезу сільськогосподарських хімічних речовин, в якому метоксиацетон вводиться в контакт з трансаміназою в присутності 2-амінопропану як донора аміну, дають можливість реакції продовжуватися доти, поки істотна кількість метоксиацетону не перетвориться в (S)-1-метокси-2-амінопропан (і 2-амінопропан одночасно перетворюється в ацетон), і що утворився таким чином (S)-1-метокси-2-амінопропан виділяють. Загальне перетворення за допомогою ферменту може бути представлене таким чином



П'ять мілімолей первинного кислого фосфату натрію і 250мл концентрованої соляної кислоти додавалося до 1000мл води. Суміш охолоджувалася до 5-10°C в бані з льодом і додавалося 258мл 2-амінопропану з подальшим доданням 206мл метоксиацетону (98%). Дану суміш перемішували і рН доводили до 7,5 або за допомогою гідроокису натрію, або соляної кислоти, з потреби. Суміш переносили в 3-літровий круглодонний реактор з регульованою температурою і апаратом для перемішування. Після того, як температура суміші ставала стабільною 30±1°C, додавали 0,2М піридоксаль-5'-фосфату. При необхідності рН доводили знов до 7,5 і додавали невелику кількість води, щоб довести об'єм суміші до 1800мл.

Окремо готували розчин ферменту. До 200мл 5М розчину фосфату натрію (рН 7,5), 0,2М піридоксаль-5'-фосфату і додавали 2г (суха вага) клітин *Bacillus*, що містять (S)-трансаміназу. Коли клітини повністю суспендувалися, ферментний розчин додавали до реакційної суміші, описаної вище.

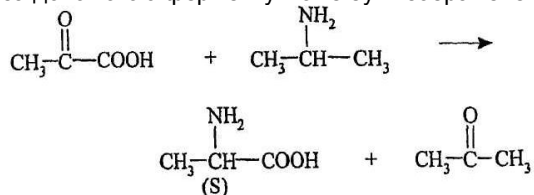
Кінцева реакційна середа містила 1,5М 2-амінопропану і 1,0М метоксиацетону. Реакція протікала протягом 8 годин при 30±1°C і рН 7,5, після чого (S)-2-метокси-2-амінопропан був присутнім в реакційній суміші, мав концентрацію 0,6М і чистоту вище за 99%.

Реакцію припиняли доданням 5мл концентрованої соляної кислоти з подальшою флеш-перегонкою для видалення метоксиацетону, який не прореагував, і побічного продукту, ацетону, в єдиній фракції. Згодом може бути проведена розділова колонкова перегонка цього дистилату для розділення метоксиацетону і ацетону. До реакційної суміші додавали 270мл 50%-ого водного розчину гідроокису натрію для

депротонування амінів. Потім аміни видаляли з суміші шляхом перегонки у вигляді єдиної фракції і (S)-1-метокси-2-амінопропан відділяли від залишкового 2-амінопропану шляхом розділової перегонки, отримуючи 125г (S)-1-метокси-2-амінопропану, що містить 50% води. Аналіз за допомогою газової хроматографії показав, що продукт був більш ніж на 99% хімічно і енантімерно чистим.

ПРИКЛАД 2.

Далі винахід можна проілюструвати прикладом синтезу L-аланіну, корисної амінокислоти, в якому пірвіноградну кислоту вводять в контакт з трансаміназою в присутності 2-амінопропану як донора аміногрупи, даючи реакції продовжуватися доти, поки істотна кількість пірвіноградної кислоти не перетвориться в L-аланін, і одночасно 2-амінопропан не перетвориться в ацетон. Загальне перетворення за допомогою ферменту може бути зображене таким чином



Пируват натрію (50мМ, 165г) і хлорідрат ізопропіламіну (50мМ, 0,23мл 6,5 молярного розчину) розчиняли в 29,0мл 50мМ первинного кислого фосфату натрію і рН доводили до 7,5. Додавали піридоксальфосфат (1,0мМ, 8,0мг) з подальшим доданням 8мг клітин E.coli, що містять (S)-трансаміназу, і таким чином кінцевий об'єм досягав 30мл і кінцевий показник рН був 7,5. Після інкубації при 30°C протягом 24 годин вимірювали концентрації ізопропіламіну, ацетону і L-аланіну за допомогою ВЕРХ і газової хроматографії, і за даними визначення концентрація L-аланіну була 45,6мМ, що еквівалентне K_{eq} для вищевведеної реакції понад 100.

Коли аналогічну реакцію виконували, використовуючи клітини E.coli (0,3г), що містять (R)-трансаміназу, перетворення відбувалося до D-аланіну з концентрацією 46мМ.

ПРИКЛАД 3. Синтез L-аланіну

В окремому прикладі синтезу L-аланіну, пируват натрію (1М, 110,0г) і хлорідрат ізопропіламіну (1М, 153мл 6,5 молярного розчину) розчиняли в 800мл 50мМ буферу на основі первинного кислого фосфату натрію, і рН доводили до 7,5. Потім додавали піридоксальфосфат (1мМ, 265мг) з подальшим доданням 5г клітин E.coli, що містять (S)-трансаміназу, так, щоб кінцевий об'єм був 1л і кінцеве значення рН було 7,5. Після інкубації при 30°C протягом 24 годин визначали концентрації ізопропіламіну і L-аланіну за допомогою ВЕРХ і концентрацію ацетону визначали за допомогою газової хроматографії. Концентрація отриманого L-аланіну становила 970мМ, що еквівалентно константі рівноваги для реакції приблизне 1000.

ПРИКЛАД 4. Синтез L-2-аміномасляної кислоти

Натрієву сіль кетомасляної кислоти (50мМ, 186мг) і ізопропіламін (50мМ, 0,23мл 6,5 молярного розчину) розчиняли в 29мл 50мМ буферу на основі первинного кислого фосфату натрію, і рН доводили до 7,5. Додавали піридоксальфосфат (1мМ, 8,0мг) з подальшим доданням 100мг клітин E.coli, що містять (S)-трансаміназу, так, щоб кінцевий об'єм досягав 30мл і кінцеве значення рН було 7,5. Після інкубації при 30°C протягом 24 годин визначали концентрації ізопропіламіну і L-2-аміномасляної кислоти за допомогою ВЕРХ і концентрацію ацетону - за допомогою газової хроматографії. Було визначено, що концентрація отриманої L-аміномасляної кислоти була 48мМ, що еквівалентно константі рівноваги для реакції понад 500.

ПРИКЛАД 5. Синтез додаткових амінокислот

Слідуючи, в основному, описаним в прикладі 4 процедурам, здійснювали синтез L-глутамату, L-метіоніну і L-норваліну з натрієвих солей відповідних кетокислот: 2-кетоглутарової кислоти (50мМ, 252мг), 4-метилтіо-2-оксомасляної кислоти (50мМ, 255мг) і 2-кетовалеріанової кислоти (50мМ, 207мг), відповідно. У всіх випадках (S)-трансаміназа давала виключно L-ізомер амінокислоти при концентраціях 45, 47 і 46мМ, відповідно.