



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3945/80

(51) Int.Cl.⁵

C 12 P 13/00

(22) Indleveringsdag: 17 sep 1980

C 12 P 41/00

(41) Alm. tilgængelig: 18 apr 1981

(44) Fremlagt: 05 aug 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 17 okt 1979 IT 26547/79

(71) Ansøger: *E.N.I ENTE NAZIONALE IDROCARBURI; Piazzale E. Mattei 1; Rom, IT

(72) Opfinder: Roberto *Olivieri; IT, Giancarlo Eletti *Bianchi; IT, Eugenio *Fascetti; IT, Felice *Centini; IT, Ludwig *Degen; IT, Walter *Marconi; IT

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til stereospecifik fremstilling af D-carbamylderivater af alfa-hydroxysyrer

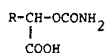
(56) Fremdragne publikationer

fra det optisk aktive carbamylderivat ved simpel hydrolyse. De anvendelige enzymer kan opnås ud fra homogeniseret kalvelever og fra kulturer af en række mikroorganismer såsom Agrobacterium radiobacter, Bacillus brevis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas sp., Pseudomonas desmolytica, Pseudomonas fluorescens og Pseudomonas putida.

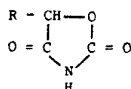
(57) Sammen drag:

3945-80

Fremstilling af carbamylderivater af α -hydroxysyrer med formelen



hvor R er en aromatisk eller alifatisk gruppe ved hydrolyse af 5-substituerede 2,4-oxazolidindioner med formelen

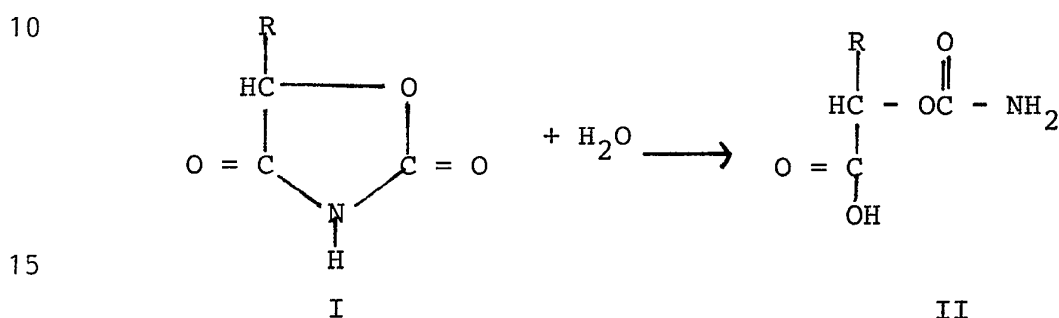


og af de tilsvarende frie α -hydroxysyrer ved yderligere hydrolyse af carbamylderivaterne.

Ved enzymatisk hydrolyse af racemiske 5-substituerede 2,4-oxazolidindioner opnås kun én af de to mulige optiske isomere, nemlig D-carbamylderivatet af α -hydroxysyren. Den fri D- α -hydroxysyre f.eks. D(-)-mandelsyre kan fås ud

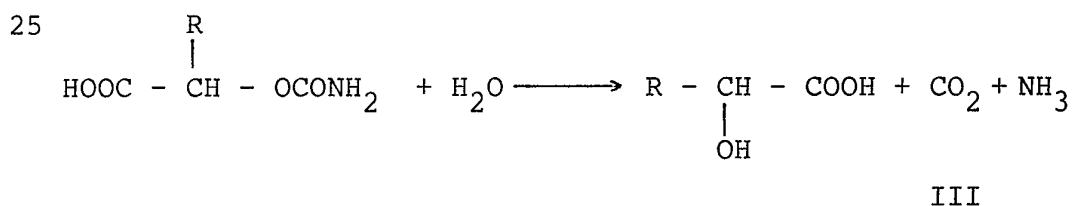
Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til stereospecifik fremstilling af D-carbamylderivater af α -hydroxysyrer, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

5 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen underkastes forbindelserne med den almene formel I (se kravet), dvs. 5-substituerede 2,4-oxazolidindioner, en enzymatisk hydrolysereaktion, som åbner ringen efter følgende reaktionsskema:



hvor R i formel I og II er en substitueret eller usubstitueret aromatisk eller alifatisk gruppe.

Forbindelsen med den almene formel II, som fås ved
 20 hydrolysen, er D-carbamylderivatet af en α -hydroxysyre, hvorfra α -D-hydroxysyren kan fås ved at underkaste forbindelsen med formlen II en yderligere hydrolyse efter følgende reaktionsskema:



30 hvor R i formel III er en substitueret eller usubstitueret aromatisk eller alifatisk gruppe.

Forbindelsen III er α -D-hydroxysyren.

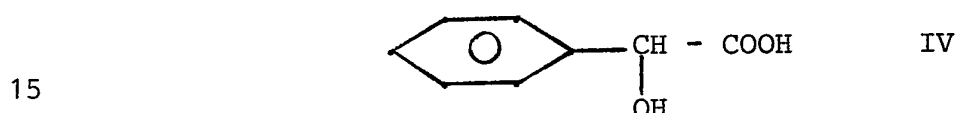
Det har overraskende vist sig muligt enzymatisk at
 35 hydrolysere 5-substituerede DL-2,4-oxazolidindioner således, at der opnås udelukkende D-carbamyld- α -hydroxysyre, dvs. kun én af de to mulige optiske isomere. Den frie α -hydroxysyre med D-konfiguration kan fås ud fra det optisk

aktive carbamylderivat ved simpel hydrolyse.

Forbindelserne med formlen I kan let fremstilles ud fra de tilsvarende α -hydroxysyrer ved omsætning af disse med urinstof, som beskrevet af Helge Aspelund i
5 Acta Acad. Aboensins Math. and Phys. 22 (7) 12 (1961).

Opspaltning af den racemiske blanding sker ved stereoselektiv hydrolyse af oxazolidinringen i forbindelserne med formlen I udført med enzymer, der let fås fra kulturer af de i kravet nævnte mikroorganismer eller fra
10 ekstrakter af kalvelever.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan f.eks. anvendes til fremstilling af D(-)mandelsyre

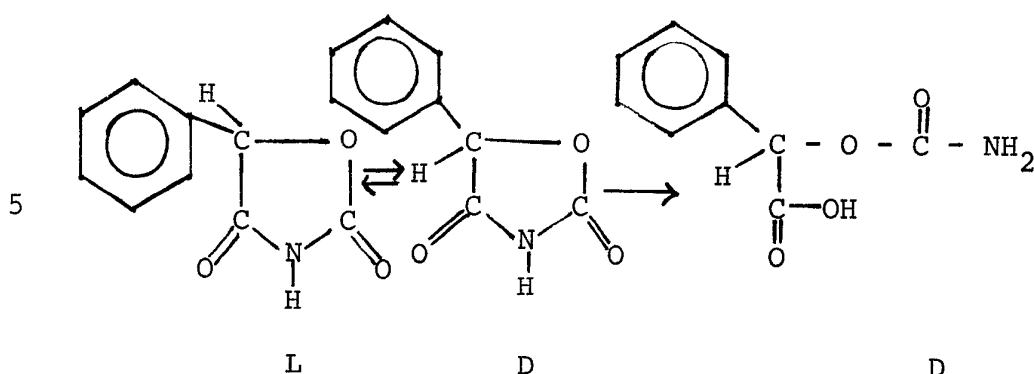


der er et vigtigt mellemprodukt ved fremstilling af semisyntetiske antibiotika.

Dette mellemprodukt fremstilles sædvanligvis ved
20 adskillelse af den racemiske blanding ved dannelse af diastereoisomersalte med optisk aktive naturlige baser, såsom brucin. Disse processer giver i alle tilfælde et maksimalt teoretisk udbytte på 50%, idet L-enantiomeren må racemiseres, før den tilbageføres.

25 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan carbamylderivatet af D(-)mandelsyre med fordel fremstilles ved den stereoselektive enzymatiske hydrolyse af den tilsvarende 5-phenyl-2,4-oxazolidindion. En yderligere væsentlig fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen
30 er, at det enzymatiske reaktionssubstrat spontant racemiserer under hydrolysebetingelserne, således at man ved afslutningen af reaktionen opnår carbamatet af D(-)mandelsyre i støkiometrisk mængde beregnet på udgangsmaterialet.

35 Reaktionsskemaet er som følger:



10 D(-)Mandelsyre fås derpå fra D-mandelsyrecarbamatet ved hydrolyse under sure betingelser.

Ved udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen i de tilfælde, hvor der anvendes et enzymatisk præparat dannet ud fra mikroorganismer, dyrkes disse under aerobe
15 betingelser i et kulturmedium indeholdende kilder for nitrogen, carbon, phosphor og mineralsalte ved en temperatur mellem 20 og 80°C i et tidsrum mellem 10 og 72 timer og ved en pH-værdi mellem 6,0 og 8,0.

Glucose, lactat, acetat, majsstøbevand og lactose
20 kan anvendes som carbonkilder.

Kødhydrolysat, sojakasein, ammoniumsalte, urinstof, hydantoin etc. kan anvendes som nitrogenkilder. Et passende kulturmedium har f.eks. følgende sammensætning:

25	Kødpepton	5 g
	Kødekstrakt	5 g
	Glucose	5 g
	Destilleret vand	1000 cm ³
	pH	7,0 -7,2

30 D(-)carbamatmandelsyre kan fremstilles direkte i fermenteringsmediet indeholdende den tilsvarende DL-2,4-oxazolidindion, eller kan fremstilles ved at anvende en mikroorganismemasse i form af hvilende celler eller ekstrakter deraf. De enzymatiske komplekser kan ekstraheres
35 fra bakteriemassen ved de i enzymologien sædvanligt anvendte metoder.

Til dette formål disintegreres cellerne under anvendelse af passende apparatur, såsom French Pressure-

Cell Press, Manton Gaulin Homogenizer, roterende disintegratorer etc. eller ved anvendelse af ultralyd.

Hydrolyse af den 5-substituerede D,L-2,4-oxazolidindion kan ske ved til reaktionsblandingen at sætte enzy-
 5 zymet i én eller flere af følgende former: friske celler, frysetørrede celler, toluenbehandlede celler, med acetone opnået pulver eller rå eller rensede ekstrakter.

En yderligere teknisk og økonomisk forbedring kan opnås ved at immobilisere enzymerne ved at forene dem
 10 med makromolekylære stoffer til dannelselse af kemiske bindinger med matrixen eller dannelselse af ionbindinger, eller ved fysisk immobilisering.

De nedenfor anførte eksempler illustrerer fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

15

Eksempel 1

Der blev fremstillet et kulturmedium med følgende sammensætning:

	Kødpepton	5 g
20	Kødekstrakt	3 g
	Glucose	5 g
	Destilleret vand	1000 cm ³

pH-Værdien blev indstillet til 7,2 med natriumcarbonat, og mediet blev fordelt i 500 ml kolber i portioner på 100 ml. Efter sterilisering i 30 minutter ved
 25 110°C blev kolberne innokuleret med en kultur af Pseudomonas CBS 145.75 skråkultur indeholdende samme medium med 2% agar (DIFCO) og inkuberet i 24 timer ved 30°C under orbital omrøring (220 omdrejninger pr. minut).

30 1 ml af denne forkultur (optisk tæthed ved 550 nm = 0,250 fortyndet 1:10) blev indført i 5 500 ml kolber indeholdende 100 ml af samme medium, og kulturen blev inkuberet ved 30°C under orbitalomrøring (220 omdrejninger pr. minut) i 24 timer (optisk tæthed ved 550 nm =
 35 0,450 fortyndet 1:10).

Cellerne blev derpå opsamlet, vasket i fysiologisk saltvandsopløsning og til slut suspenderet i 100 ml 0,1 M pyrophosphatstødpude med pH 8,7 indeholdende 2 g DL-

5-phenyl-2,4-oxazolidindion ved en temperatur på 50°C.

Efter 70 timers inkubering under disse omstændigheder var hydrolysen DL-5-phenyl-2,4-oxazolidindionen fuldstændig, hvilket blev konstateret ved polarimetrisk analyse af reaktionsblandingen.

D-mandelsyre-carbamatet blev isoleret fra reaktionsblandingen ved fjernelse af cellemassen ved centrifugering, afkøling og indstilling af pH-værdien til 2,5 med koncentreret HCl. Det således opnåede bundfald blev filtreret fra, vasket med kold H₂O og tørret under vakuum. 1,8 g D-mandelsyre-carbamat blev opnået, og identiteten blev vist ved IR- og NMR-spektra og ved elementæranalyse.

Den specifikke optiske drejningsevne $[\alpha]_D^{25}$ af den alkoholiske opløsning af det som ovenfor beskrevet opnåede D-mandelsyre-carbamat var -141° .

Dets smeltepunkt (under sønderdeling) var 169°C.

1,4 g D-mandelsyre-carbamat blev suspenderet i 100 ml vand, derpå opvarmet og tilbagesvalet i fire timer. Den således opnåede vandige opløsning blev syrnet og derpå ekstraheret med ethylether, og den organiske fase blev under vakuum inddampet til tørhed. Der blev opnået 1,10 g rå mandelsyre med $[\alpha]_D^{25} = -120^\circ$ (optisk udbytte 76%).

Efter krystallisation fra vand havde det rå produkt et smp. på 130°C og en $[\alpha]_D^{25}$ på $-154,5^\circ$ i vand. For D(-)mandelsyre er i litteraturen beskrevet smp. i 133°C og $[\alpha]_D^{25} -158^\circ$.

Eksempel 2

1 g med acetone fremstillet pulver af homogeniseret kalvelever blev sat til en opløsning indeholdende 500 mg DL-5-phenyl-2,4-oxazolidindion i 50 ml 0,1 M pyrophosphatstødpude med pH 8,5.

Den således opnåede reaktionsblanding blev inkuberet ved 30°C i 40 timer.

D-mandelsyrecarbamatet blev derpå udvundet som beskrevet i eksempel 1.

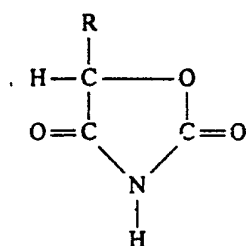
Der blev opnået 380 mg rå carbamat med en specifik optisk drejningsevne $[\alpha]_D^{25}$ på -136° i ethanol.

Der blev derpå foretaget sur hydrolyse af det rå carbamat, og mandelsyren blev ekstraheret som beskrevet i eksempel 1 til opnåelse af 300 mg rå D-mandelsyre med $[\alpha]_D^{25} = -116^\circ$ (optisk udbytte 73,5%).

P A T E N T K R A V

10 Fremgangsmåde til stereospecifik fremstilling af D-carbamylderivater af α -hydroxysyrer, k e n d e t e g - n e t ved, at man hydrolyserer en i 5-stillingen substitueret oxazolidindion med den almene formel I

15



I

20 hvori R betegner en substitueret eller ikke-substitueret aromatisk eller alifatisk gruppe, ved udnyttelse af enzymatisk aktivitet af homogeniseret kalvelever eller af mikroorganismer valgt blandt Agrobacterium radiobacter NRRL B 11291, Bacillus Brevis NRRL B 11080, Bacillus stearo-
 25 thermophilus NRRL B 11079, Pseudomonas sp CBS 145.75, Pseudomonas sp CBS 146.75, Pseudomonas sp ATCC 11299, Pseudomonas desmolytica NCI B 8859, Pseudomonas fluorescens ATCC 11250 og Pseudomonas putida ATCC 12633.

30

35