

Brevet N° **85115**
 du **5 décembre 1983**
 Titre délivré : **- 2 AVR. 1984**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 Service de la Propriété Intellectuelle
 LUXEMBOURG

Demande de Brevet d'Invention

I. Requête

La société dite: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite (1)
S.p.A., 47, Viale Shakespeare, à 00144 ROME, Italie, repré-
sentée par Monsieur Jacques de Muyser, agissant en qualité (2)
de mandataire

dépose(nt) ce cinq décembre 1983 (3)
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg :

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant :
"Procédé de préparation de L-carnitine et produits chimiques (4)
intermédiaires utilisés dans ce procédé".

2. la délégation de pouvoir, datée de ROME le 16 novembre 1983

3. la description en langue française de l'invention en deux exemplaires;

4. // planches de dessin, en deux exemplaires;

5. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg,

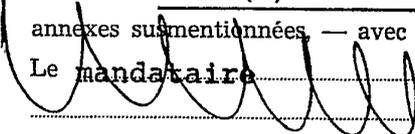
le 30 novembre 1983

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont) :
- Charles J. SIH, 6322 Landfall Drive, à MADISON, Wisconsin (5)
53705, Etats-Unis d'Amérique

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de
 (6) brevet déposée(s) en/ (7) aux Etats-Unis d'Amérique
 le 6 décembre 1982 (No. 447,171) et le 21 octobre 1983
(No. 544,957) (CIP application)

au nom de l'inventeur
 élu(élisent) pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg
35, bld. Royal (10)

sollicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les
 annexes susmentionnées — avec ajournement de cette délivrance à // mois. (11)

Le mandataire 

II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des
 Classes Moyennes, Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du :

5 décembre 1983

à 15 heures



Pr. le Ministre
 de l'Économie et des Classes Moyennes
 d.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

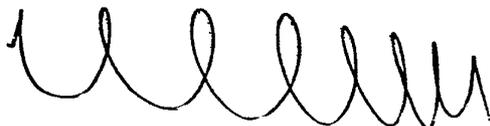
D. 52.163

de la demande de brevet / du modèle d'utilité

AUX ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Du 6 décembre 1982

du 21 octobre 1983 (CIP appl.)



Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de: SIGMA-TAU Industrie farmaceutiche riunite s.p.a.

pour: Procédé de préparation de L-carnitine et produits
chimiques intermédiaires utilisés dans ce procédé.



Procédé de préparation de L-carnitine et produits chimiques intermédiaires utilisés dans ce procédé.

La présente invention concerne des procédés de préparation de L-carnitine. Spécifiquement, l'invention concerne un procédé pour la réduction microbiologique d'amides ou d'esters acéto-acétiques γ -substitués en leurs dérivés respectifs d'acides L- β -hydroxy-butyriques γ -substitués, ces dérivés pouvant être transformés aisément en chlorure de L-carnitine. L'invention concerne également de nouveaux produits chimiques intermédiaires utilisés dans ce procédé.

Comme on le sait très bien, la carnitine (acide β -hydroxy- γ -triméthyl-amino-butyrique) contient un centre d'asymétrie et, par conséquent, la carnitine existe sous deux formes stéréoisomères, à savoir les formes D et L.

La L-carnitine est normalement présente dans le corps où elle fonctionne pour véhiculer des acides gras libres activés à longue chaîne à travers la membrane mitochondriale. Etant donné que la membrane mitochondriale est imperméable aux dérivés acyl-CoA, les acides gras libres à longue chaîne ne peuvent pénétrer que lorsque l'estérification avec la L-carnitine a eu lieu. La L-carnitine exerce sa fonction de véhiculeur à la fois en transportant des acides gras actifs à longue chaîne des sièges de leur biosynthèse, par exemple, les microsomes, vers la mitochondrie où ils sont oxydés, ainsi qu'en transportant l'acétyl-CoA de la mitochondrie où il est formé, vers les sièges extramitochondriaux où la synthèse d'acides gras à longue chaîne a lieu, par exemple, dans les microsomes dans lesquels l'acétyl-CoA peut être utilisé pour synthétiser le cholestérol et les acides gras.

Bien qu'il ait été établi que l'isomère lévogyre (L-carnitine) exclusivement soit la forme biologique (jusqu'à présent, la D-carnitine n'a jamais été détectée dans des tissus de mammifères), pendant un certain nombre d'années, le racémate de D,L-carnitine a été utilisé pour des indications différentes. Par exemple, la D,L-carnitine est vendue en Europe comme stimulant de l'appétit et il a été mentionné que cette matière exerçait un effet sur le rythme de croissance des enfants (voir, par exemple, Borniche et al., Clinica Chemica Acta, 5, 171-176, 1960 et Alexander et al., "Protides in the Biological Fluids", 6e colloque, Bruges, 1958, 306-310). Dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.830.931, on décrit des perfectionnements apportés à la contractilité du myocarde et au rythme systolique en cas de défaillance cardiaque congestive, ces améliorations pouvant souvent être obtenues par l'administration de D,L-carnitine. Dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.968.241, on décrit l'utilisation de la D,L-carnitine dans des arythmies cardiaques. Dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.810.994, on décrit l'utilisation de la D,L-carnitine pour le traitement de l'obésité.

Toutefois, récemment, on a de plus en plus souligné l'importance de l'utilisation exclusive de l'isomère lévogyre de carnitine du moins pour certaines applications thérapeutiques. En fait, il a été démontré que la D-carnitine était un inhibiteur compétitif d'enzymes liées à la carnitine, par exemple, l'acétyl-transférase de carnitine et la palmityl-transférase de carnitine. De plus, une preuve récente suggère que la D-carnitine peut épuiser la L-carnitine du tissu cardiaque. En conséquence, il est essentiel que la L-carnitine exclusivement soit admi-

nistrée à des patients sous traitement médical pour maladies cardiaques ou pour diminuer la teneur en lipides du sang.

5 Plusieurs procédés ont été proposés pour produire la carnitine à l'échelle industrielle. Toutefois, la synthèse chimique de la carnitine aboutit inévitablement à un mélange racémique des isomères D et L. En conséquence, il convient d'adop-
10 ter des procédés de dédoublement pour obtenir les antipodes optiques séparés à partir du racémate. Toutefois, ces procédés de dédoublement sont compliqués et coûteux.

Un objet de la présente invention est de préparer la L-carnitine avec un bon rendement moyen-
15 nant une combinaison de procédés microbiologiques et chimiques.

Un objet de la présente invention est de fournir un procédé perfectionné pour la synthèse de la L-carnitine à partir de matières premières d'un
20 coût modéré et aisément disponibles.

Un autre objet de la présente invention est de décrire la préparation de nouveaux produits intermédiaires utiles et optiquement actifs pour la synthèse de la L-carnitine, ainsi que de ses sels
25 ou esters.

Un autre objet de la présente invention est de fournir des procédés de préparation de L-carnitine moyennant le déplacement à la triméthylamine du groupe halo d'un 4-halo-3(R)-hydroxybutyrate.

30 Un autre objet encore de la présente invention est de fournir un procédé pour la préparation de 4-iodo- ou 4-bromo-3(R)-hydroxybutyrates à partir de 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrates.

Ces différents objets de l'invention, ainsi
35 que d'autres, apparaîtront plus clairement à la lec-



ture de la description ci-après.

A la lecture de la description détaillée qui va suivre, l'homme de métier reconnaîtra de toute évidence les avantages de la présente invention.

5

Il est connu que la fonction β -céto occupant la position 3 dans les dérivés d'acides acéto-acétiques γ -substitués peut être réduite par hydrogénation sur Pt/C (voir, par exemple, le brevet des Etats-Unis d'Amérique n° 3.969.406). Toutefois, le composé hydroxy résultant de ce procédé est racémique. En revanche, en utilisant l'action fermentante d'un micro-organisme suivant le procédé de la présente invention, l'hydrogénation de la fonction oxo occupant la position 3 peut être effectuée de manière stéréosélective pour donner des dérivés d'acides β -hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs.

10

15

20

En particulier, en choisissant judicieusement (comme décrit ci-après) le substrat devant être exposé à l'action fermentante des micro-organismes suivant le procédé de la présente invention, on obtient la configuration épimère 3(R) ou L. Cette configuration est requise pour la transformation en L-carnitine naturelle.

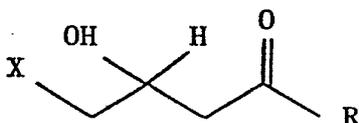
25

30

Dans ses grandes lignes, la présente invention concerne l'utilisation de l'enzyme réductase microbienne, à savoir la déshydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35] pour catalyser l'hydrogénation stéréosélective de dérivés d'acides acéto-acétiques γ -substitués comme défini ci-après.

35

En conséquence, sous son aspect le plus large, la présente invention fournit un procédé de préparation de dérivés d'acides β -hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs répondant à la formule :



dans laquelle

5 X est choisi parmi Cl, Br, I et OH, et
R est un radical à chaîne droite, à chaîne ramifiée ou à configuration cyclique choisi parmi la classe comprenant :

les radicaux alcoxy contenant 1 à environ
10 15 atomes de carbone ;

les radicaux alkylamino contenant environ
5 à environ 15 atomes de carbone ;

les radicaux cycloalcoxy et cycloalkylamino
contenant environ 5 à environ 12 atomes de carbone ;

15 les radicaux phénoxy et phénylalcoxy contenant 7 à environ 14 atomes de carbone ;

les radicaux phénylamino et phénylalkylamino répondant aux formules :

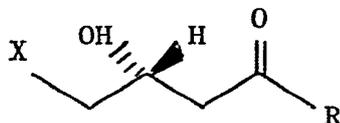
20 $\begin{matrix} Y \\ | \\ -N-\phi-A \end{matrix}$ et $\begin{matrix} Y & Z \\ | & | \\ -N-CH-\phi-A \end{matrix}$ où Y et Z sont choisis parmi H, un groupe alkyle contenant 1 à environ 8 atomes de carbone, un groupe phényle ou un groupe benzyle et A est choisi parmi H, CH₃, Cl et Br,
à partir d'amides ou d'esters d'acides acéto-acétiques
25 γ -substitués correspondants,

ce procédé comprenant les étapes consistant à :

soumettre ces amides ou esters d'acides acéto-acétiques γ -substitués à l'action enzymatique
30 fermentante d'un micro-organisme qui élabore la déhydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35], et récupérer les dérivés d'acides β -hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs désirés.

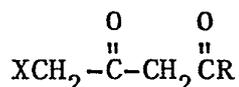
En particulier, afin de préparer des dérivés
35 d'acides 3(R)-hydroxybutyriques γ -substitués optique-

ment actifs ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



5

le procédé comprend les étapes consistant à soumettre des composés répondant à la formule :



10 dans laquelle X et R ont les significations indiquées ci-dessus, avec cette restriction que, si R est un radical alcoxy, il contient 5 à environ 15 atomes de carbone,

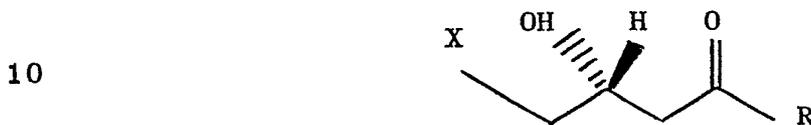
à l'action enzymatique fermentante d'un micro-organisme qui élabore la déshydrogénase de L-β-hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35] et
15 récupérer, du mélange réactionnel fermentant, les dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques 4-substitués optiquement actifs désirés.

20 On a trouvé que n'importe quel micro-organisme produisant l'enzyme désirée était capable d'agir pour catalyser la réduction stéréosélective. Sont particulièrement appropriés, les micro-organismes de la classe Ascomycetes, des ordres Endomycetales, Mucorales, Moniliales et Eurotiales, ainsi que du
25 genre Saccharomyces. Saccharomyces Cerevisiae est particulièrement préféré.

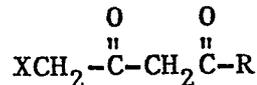
Pour préparer des esters 3(R)-hydroxybutyrates 4-substitués optiquement actifs et contenant 1 à 4 atomes de carbone, il est nécessaire
30 d'utiliser la déshydrogénase de L-β-hydroxyacyl-CoA purifiée [EC 1.1.1.35] telle que celle du coeur de porc, car un micro-organisme intact possède des oxydo-réductases interférentes d'une configuration opposée. Dès lors, la réduction microbienne, par
35

exemple, d'esters 4-chloro-acéto-acétiques contenant 1 à 4 atomes de carbone donne des 4-chloro-3-hydroxy-butyrates ayant des puretés optiques insatisfaisantes.

En conséquence, la présente invention fournit également un procédé de préparation de dérivés d'acides 3(R)-hydroxy-butyriques γ -substitués optiquement actifs ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



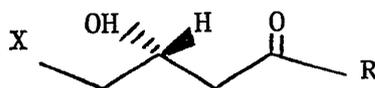
dans laquelle X représente Cl, Br, I ou OH et R est un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, ce procédé comprenant les étapes consistant à soumettre des composés répondant à la formule :



dans laquelle X et R ont les significations indiquées ci-dessus, à l'action enzymatique de la déshydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35] sous forme purifiée et

20 récupérer, du mélange réactionnel enzymatique, les dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs désirés.

25 Dès lors, la présente invention fournit des composés ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



30 dans laquelle X est choisi parmi Cl, Br, I et OH, et R est un radical à chaîne droite, à chaîne ramifiée ou à configuration cyclique choisi parmi la classe comprenant :

les radicaux alcoxy contenant 1 à environ 15 atomes de carbone ;

35

les radicaux alkylamino contenant environ 5 à environ 15 atomes de carbone ;

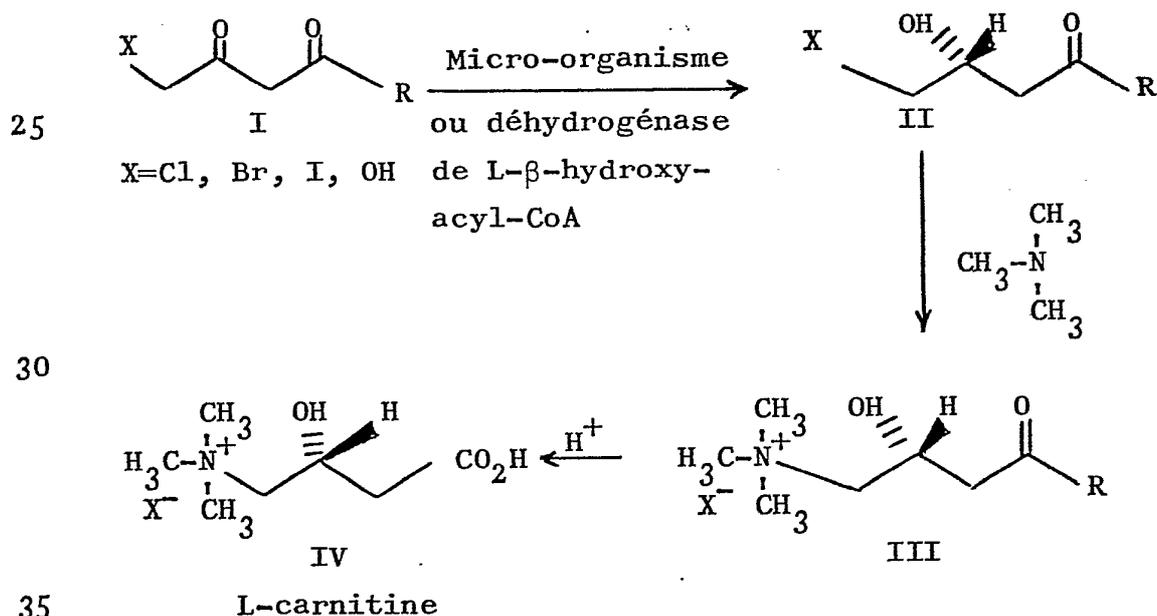
les radicaux cycloalcoxy et cycloalkylamino contenant environ 5 à environ 12 atomes de carbone,

les radicaux phénoxy et phénylalkoxy contenant 7 à environ 14 atomes de carbone,

les radicaux phénylamino et phénylalkylamino répondant aux formules :

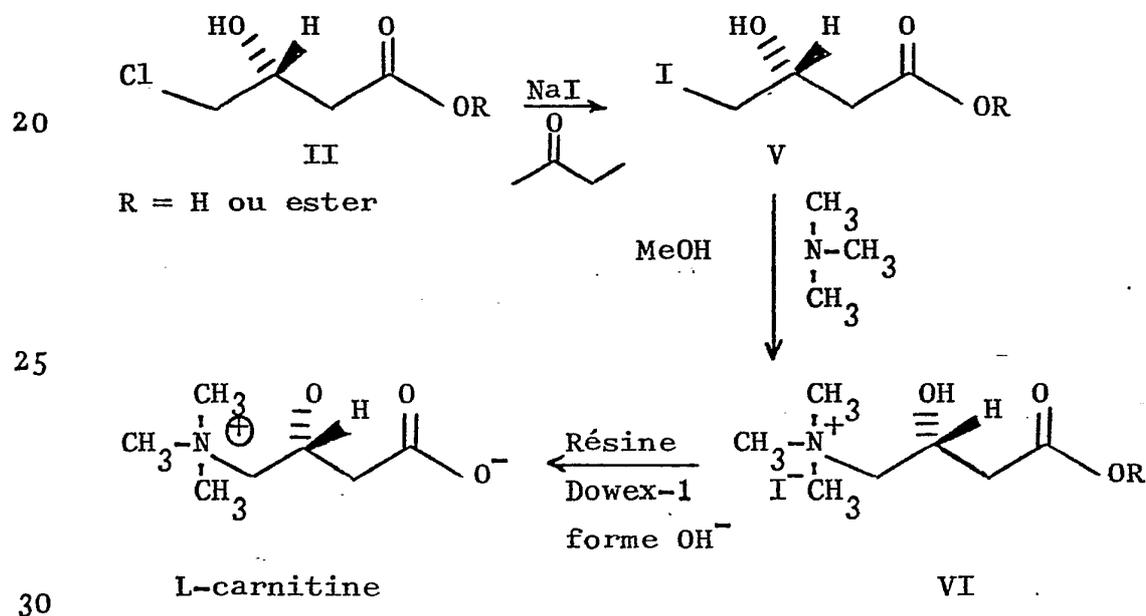
10 $\begin{array}{c} \text{Y} \\ | \\ -\text{N}-\phi-\text{A} \end{array}$ et $\begin{array}{c} \text{Y} \text{ Z} \\ | \quad | \\ -\text{N}-\text{CH}-\phi-\text{A} \end{array}$ où Y et Z sont choisis parmi H, un groupe alkyle contenant 1 à environ 8 atomes de carbone, un groupe phényle ou un groupe benzyle et A est choisi parmi H, CH₃, Cl et Br.

15 Ensuite, on peut faire réagir les dérivés d'acides L-β-hydroxybutyriques γ-substitués optiquement actifs avec la triméthylamine pour obtenir le dérivé correspondant d'acide γ-triméthylammonium-L-β-hydroxybutyrique que l'on peut aisément transformer en L-carnitine par traitement avec des acides aqueux. On donnera ci-dessous un schéma des étapes réactionnelles de ce procédé.



On a trouvé que la réaction ci-dessus
 I → II avait lieu plus aisément lorsque X = Cl.
 Toutefois, étant donné que la réaction ultérieure
 II → III a lieu avec de meilleurs rendements lors-
 5 que X = iode ou brome, il est préférable de préparer
 tout d'abord le dérivé Cl, puis de le transformer
 en dérivé I ou Br correspondant.

La présente invention concerne également
 un procédé perfectionné consistant tout d'abord à
 10 transformer l'ester 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate
 en 4-iodo- ou 4-bromo-3(R)-hydroxybutyrates corres-
 pondants. Pour des raisons de simplicité, il sera
 fait référence ci-après au dérivé I. On peut faire
 réagir doucement l'iodohydrine (V) avec la triméthyl-
 15 amine à la température ambiante pour obtenir VI que
 l'on transforme aisément en L-carnitine suivant le
 schéma réactionnel ci-dessous :



De nombreuses variantes peuvent être ap-
 portées au procédé illustré par l'équation ci-dessus.
 Quelle que soit la forme rendue disponible, on fait
 réagir l'ester avec l'iodure de sodium dans un solvant
 35 approprié tel que la 2-butanone, l'acétone, le butanol,

etc. La réaction principale désirée à ce point de la réaction avec l'iodure de sodium est une réaction de déplacement formant l'iodohydrine V sans perturber le centre chiral sur l'atome de carbone adjacent.

5 Pour cette réaction, il faut au moins une quantité suffisante d'iodure de sodium pour déplacer tout le chlorure de II. Généralement parlant, on utilise un léger excès d'iodure de sodium.

La réaction de V avec la triméthylamine
10 peut être effectuée à une température modérée (par exemple, à 25°C) (voir S.G. Boots et M.R. Boots, J. Pharm. Sci., 64, 1262, 1975) dans différents solvants tels que le méthanol ou l'éthanol contenant un excès de triméthylamine. Il est remarquable que,
15 suivant le solvant alcoolique utilisé, il se produise un échange d'ester. Par exemple, lorsqu'on utilise le méthanol comme solvant, on obtient l'ester méthyl-
lique de L-carnitine lors de la réaction. Cette réaction d'échange est avantageuse, car on sait que
20 l'ester méthyl-lique de L-carnitine peut être transformé directement en base libre de L-carnitine par passage à travers une colonne échangeuse d'ions (OH^-) [voir E. Strack et J. Lorenz, J. Physiol. Chem. (1966) 344, 276].

25 D'après la description des procédés ci-dessus, on peut constater qu'il se forme un certain nombre de nouveaux produits intermédiaires optiquement actifs et hautement utiles. Sont particulièrement utiles, les esters alkyliques d'acides 4-iodo-
30 3(R)-hydroxybutyriques dans lesquels les groupes alkyle contiennent 6 à 10 atomes de carbone chacun. L'ester octylique est particulièrement préféré.

Des micro-organismes ayant l'activité d'oxydo-réductase désirée sont bien connus dans la
35 technique microbiologique et l'on peut utiliser



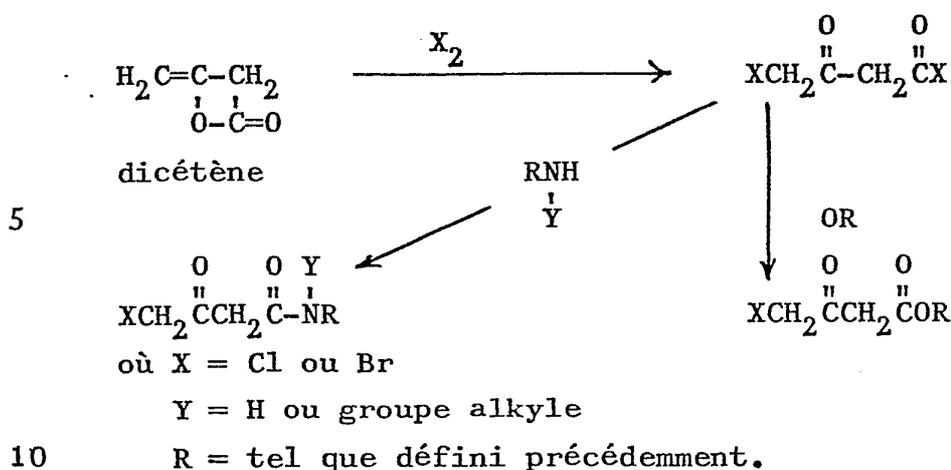
n'importe quel micro-organisme de ce type pour effectuer le procédé de la présente invention (voir K. Kieslich, "Microbial Transformations of Non-Steroid Cyclic Compounds" (Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1976)), l'un ou l'autre des genres de micro-organismes décrits spécifiquement ici étant particulièrement applicable. On a trouvé que des micro-organismes aisément disponibles et peu coûteux du genre Saccharomyces, par exemple, la levure de brasserie, la levure de boulangerie et la levure de vinificateur (Saccharomyces vini) produisaient la déhydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EL 1.1.1.35] et qu'ils étaient éminemment avantageux pour effectuer le procédé de l'invention. L'enzyme est décrite par S.J. Wakil et E.M. Barnes Jr. dans "Comprehensive Biochemistry", volume 185 (1971), pages 57-104.

Le substrat acéto-acétique 4-substitué peut être incorporé dans un milieu nutritif d'une composition classique dans lequel ces organismes sont cultivés et l'on peut alors adopter les conditions habituelles de fermentation pour effectuer la transformation réductrice. En variante, le principe actif peut être éliminé de la culture en croissance du micro-organisme, par exemple, par lyse des cellules pour libérer les enzymes ou en formant une suspension des cellules au repos dans un système aqueux frais. Dans l'une ou l'autre de ces techniques, la fonction β -cétolase sera réduite sélectivement pour autant que l'enzyme active élaborée par les micro-organismes soit présente dans le milieu. Bien entendu, les conditions de température, de temps et de pression dans lesquelles est effectué le contact du dérivé acéto-acétique 4-substitué avec l'enzyme réductrice, sont interdépendantes, comme le comprendra l'homme de métier. Par exemple, lors d'un chauffage modéré et

sous pression atmosphérique, le temps requis pour effectuer la transformation réductrice sera plus court que si cette transformation se déroule à la température ambiante dans des conditions par ailleurs identiques. Bien entendu, ni la température, ni la pression, ni le temps ne doivent atteindre des valeurs entraînant une dégradation du substrat. Lorsqu'on doit utiliser une culture en croissance de l'organisme, les conditions opératoires doivent également être suffisamment modérées pour que l'organisme ne soit pas tué avant qu'il élabore suffisamment d'enzymes hydrolytiques pour permettre le déroulement de la réaction. En règle générale, sous pression atmosphérique, la température peut se situer entre environ 10°C et environ 35°C et la durée peut se situer entre environ 12 heures et environ 10 jours.

Dans les exemples ci-après qui sont donnés pour illustrer la présente invention et qui ne limitent nullement le cadre des revendications ci-après, on a préparé les substrats de dérivés d'acides γ -halo-acéto-acétiques devant être soumis à une réduction microbiologique, à partir d'un dicétène, conformément au procédé général de C.D. Hurd et H.L. Abernethy (J. Am. Chem. Soc., 62, 1147, 1940) pour les dérivés γ -chloro-acéto-acétiques et, conformément au procédé général de F. Chick, N.T.M. Wilsmore [J. Chem. Soc. 1978 (1910)], pour les dérivés γ -bromo-acéto-acétiques conformément au schéma réactionnel suivant :





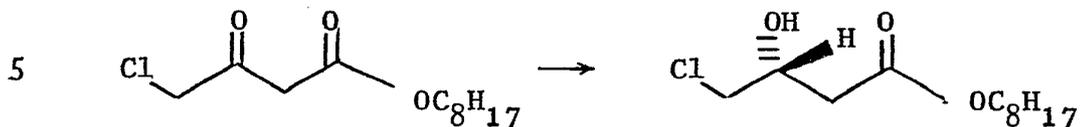
En variante, on peut éventuellement préparer les dérivés d'acides γ -halo-acéto-acétiques à partir d'esters γ -halo-acétiques via une réaction classique de Grignard. Par exemple, on a préparé aisément l'ester octylique d'acide γ -chloracéto-acétique en chauffant à reflux l'ester γ -chloro-octylique avec deux équivalents de magnésium dans de l'éther pendant 48 heures. Après élimination du solvant, on a récupéré l'ester octylique d'acide acéto-acétique avec un rendement d'environ 70%.

On a préparé des dérivés d'acide γ -hydroxy-acéto-acétique à partir de leurs dérivés correspondants d'acide γ -bromo-acéto-acétique par agitation dans une solution de dioxanne/eau (1:1) contenant du CaCO_3 à 25°C pendant 12 heures.

On a identifié la structure de chacun des produits préparés conformément aux exemples ci-après par résonance magnétique nucléaire, par les spectres d'absorption des rayons infrarouges et par les mobilités de chromatographie sur couche mince. La pureté optique et la configuration absolue des produits ont été établies par leur transformation en L-carnitine, ainsi que par transformation en leurs esters qui sont aisément analysés par le spectre de résonance magnétique nucléaire et par la rotation optique.

Exemple 1 (levures)

On a préparé l'ester octylique d'acide (+)-4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique comme suit :



A. Fermentation. On a formé une suspension d'une croissance superficielle à partir d'une culture inclinée d'une semaine de Candida keyfr. NRRL Y-329, développée sur de l'agar-agar de la composition suivante :

	<u>Grammes</u>
Agar-agar	20
Glucose	10
15 Extrait de levure	2,5
K_2HPO_4	1
Eau distillée, pour compléter à	1 litre
(Stérilisation pendant 15 minutes à 1,4 kg/cm ²)	
20 dans 5 ml d'une solution saline à 0,85%. On a utilisé des portions de 1 ml de cette suspension pour inoculer un ballon Erlenmeyer de 250 ml (stade F-1) contenant 50 ml du milieu suivant (milieu de Vogel) :	

	<u>Grammes</u>
Extrait de levure	5
25 Casamino-acides	5
Dextrose	40
Citrate de $Na_3 \cdot 5 \frac{1}{2} H_2O$	3
KH_2PO_4	5
NH_4NO_3	2
30 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
Solution d'oligo-éléments	0,1 ml
Eau distillée, pour compléter à	1 litre
pH 5,6 (stérilisation pendant 15 minutes à 2,1 kg/cm ²)	

	<u>Solution d'oligo-éléments</u>	<u>g/100 ml</u>
	Acide citrique 1H ₂ O	5
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7
	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	1
5	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25
	MnSO ₄ ·1H ₂ O	0,05
	H ₃ BO ₃	0,05
	NaH ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,05

On a incubé le ballon à 25°C sur un agitateur rotatif (250 cycles/minute - rayon : 50,8 mm) pendant 24 heures, après quoi on a effectué un transfert de 10% en volume dans un autre ballon Erlenmeyer de 250 ml (stade F-2) contenant 50 ml de milieu de Vogel. Après incubation pendant 24 heures sur un agitateur rotatif, on a ajouté 150 mg d'ester octylique d'acide γ -chloro-acéto-acétique dans 0,1 ml de "Tween 80" à 10%.

On a ensuite incubé le ballon de stade F-2 pendant une période supplémentaire de 24 heures dans les conditions adoptées pour l'incubation des ballons du stade F-1.

B. Isolation. 24 heures après l'addition de l'ester octylique d'acide γ -chloracéto-acétique, on a éliminé les cellules par centrifugation. On a extrait trois fois complètement le produit surnageant avec 50 ml d'acétate d'éthyle. On a séché l'acétate d'éthyle sur du Na₂SO₄ et on l'a évaporé pour obtenir un résidu huileux (186 mg). On a dissous le résidu dans 0,5 ml de la phase mobile et on a ajouté la solution obtenue dans une colonne (1 x 25 cm) de gel de silice (MN-kieselgel 60). On a élué la colonne avec un mélange 8:1 de "Skelly B" et d'acétate d'éthyle et on a recueilli des fractions de 14 ml. On a rassemblé les fractions 6 et 7 contenant le produit désiré et on les a concentrées jusqu'à sic-

35

cité pour obtenir 120 mg de résidu cristallin. Par
 recristallisation dans un mélange d'acétate d'éthyle
 et d'hexane, on a obtenu 107 mg d'ester octylique
 d'acide 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique, $[\alpha]^{23} +13,3^\circ$
 5 (c, 4,45) (CHCl_3) ; spectre de résonance magnétique
 protonique (δ CDCl_3) : 0,88 [3H, tr. distorsion,
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$] ; 1,28 [10H, s, $-(\text{CH}_2)_5-$] ; 1,65 (2H,
 m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{O}-\text{C}-$) ; 2,62 (2H, d, $J = 6$ Hz,

10 $-\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}-\text{COOR}$) ; 3,22 (1H, large, $-\text{OH}$) ; 3,60 (2H, d,
 $J = 6$ Hz, $\text{ClCH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{R}$) ; 4,20 (3H, $-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2$ et
 $-\text{C}-\text{O}-\underset{\text{O}}{\text{CH}_2}\text{CH}_2$). Analyse : pour $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Cl}$:
 15

calculé : C 57,47 ; H 9,25

trouvé : C 57,52 ; H 9,07.

[Chromatographie sur couche mince $R_f - 0,5$, plaque
 de gel de silice de Brinkmann, 0,25 cm EM ; mélange
 20 de 5:1 de "Skelly B" et d'acétate d'éthyle].

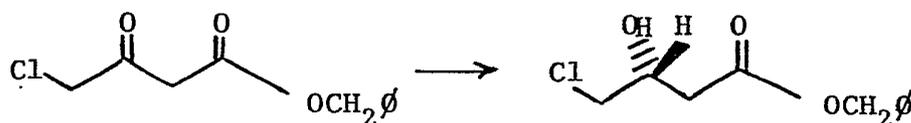
Exemple 2

Cellules au repos. On a formé une sus-
 pension de 100 g de levure commerciale fraîche de
 boulangerie Saccharomyces cerevisiae ("Red Star")
 25 dans 250 ml d'eau du robinet à laquelle on a ajouté
 10 g de sucrose et 3,6 g d'ester octylique d'acide
 γ -chloracéto-acétique. Après avoir incubé le contenu
 à 25°C sur un agitateur rotatif (250 cycles/minute -
 rayon : 50,8 mm) pendant 24 heures, on a ajouté une
 30 quantité supplémentaire de 10 g de sucrose dans le
 ballon et on a laissé se dérouler la réaction pendant
 24 heures supplémentaires. On a ensuite éliminé les
 cellules par filtration à travers un tampon de célite.
 On a lavé les cellules avec de l'eau et de l'acétate
 35 d'éthyle. On a combiné les produits de lavage avec

le filtrat et on les a extraits complètement avec de l'acétate d'éthyle. On a séché la couche d'acétate d'éthyle sur du MgSO_4 et on l'a évaporée pour obtenir un résidu huileux que l'on a soumis à une chromatographie dans une colonne de gel de silice pour obtenir 2,52 g d'ester octylique d'acide 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique sous forme d'un solide à bas point de fusion ; $[\alpha]^{23}_{\text{D}} +13,2^\circ$ (c, 4,0, CHCl_3).

Exemple 3

On a préparé l'ester benzylique d'acide (+)4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique comme suit :



A. Fermentation. On a formé une suspension d'une croissance superficielle provenant d'une culture inclinée d'une semaine de Gliocladium virens ATCC 13362 développée sur de l'agar-agar de la composition suivante :

	<u>Grammes</u>
Extrait de malt	20
Glucose	20
Peptone	1
Agar-agar	20
Eau distillée, pour compléter à	1 litre
(Stérilisation pendant 15 minutes à 1,4 kg/cm ²)	
dans 5 ml d'une solution saline à 0,85%. On a utilisé des portions de 1 ml de cette suspension pour inoculer un ballon Erlenmeyer de 250 ml (stade F-1)	
contenant 50 ml du milieu suivant (milieu de soya/dextrose) :	

[Handwritten signature]

	<u>Grammes</u>
Farine de soya	5
Dextrose	20
NaCl	5
5 KH ₂ HPO ₄	5
Levure	5
Eau	1 litre
pH : réglé à 7.	
10	Traitement en autoclave à 1,05 kg/cm ² pendant 15 minutes.

On a incubé le ballon à 25°C sur un agitateur rotatif (250 cycles/minute - rayon : 50,8 mm) pendant 24 heures, après quoi on a effectué un transfert de 10% en volume dans un autre ballon Erlenmeyer de 250 ml (stade F-2) contenant 50 ml de milieu de soya/dextrose. Après incubation pendant 24 heures sur un agitateur rotatif, on a ajouté 150 mg d'ester benzylique d'acide γ -chloracéto-acétique dans 0,1 ml de "Tween 80" à 10%. On a ensuite incubé le ballon de stade F-2 pendant une période supplémentaire de 24 heures dans les conditions adoptées lors de l'incubation des ballons de stade F-1.

20 B. Isolation. 24 heures après l'addition de l'ester benzylique d'acide γ -chloracéto-acétique, on a éliminé les mycéliums par filtration. On a extrait trois fois complètement le filtrat avec 50 ml d'acétate d'éthyle. On a séché la couche d'acétate d'éthyle sur du MgSO₄ et on l'a concentrée sous vide pour obtenir un résidu (160 mg). On a soumis le résidu à une chromatographie dans une colonne (1 x 25 cm) de gel de silice ("MN-Kieselgel 60"). On a élué la colonne avec un mélange 10:1 de "Skelly B" et d'acétate d'éthyle et on a recueilli des fractions de 12 ml. On a rassemblé les fractions 11-16 contenant le produit désiré et on les a concentrées jusqu'à siccité pour obtenir

25 -

30

35

115 mg d'ester benzylique d'acide 4-chloro-3(R)-
 hydroxybutyrique, $[\alpha]_D^{23} +8,7^\circ$ (c, 5,26 ; CHCl_3) ;
 spectre de résonance magnétique protonique
 (δ CDCl_3) 2,65 (2H, d, J = 6 Hz, $-\text{CH}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}\text{COOR}$),
 5 3,20 (1H, large, $-\text{OH}$) ; 3,54 (2H, d, J = 6 Hz,
 $\text{Cl}-\underset{\text{OH}}{\text{CH}_2}\text{CH}$) ; 4,20 (1H, m, $-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-$), 5,12 (2H,
 10 s, $-\text{C}-\underset{\text{O}}{\text{O}}-\underset{\text{O}}{\text{CH}_2}\text{C}_6\text{H}_5$) ; 7,31 (5H, s, 5 protons aromatiques).

Analyse : pour $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{Cl}$
 Calculé : C 57,77 ; H 5,73
 Trouvé : C 57,64 ; H 5,67

[Plaque de gel de silice EM Brinkmann pour chromato-
 15 graphie sur couche mince, 0,25 cm, $R_f = 0,43$, mélange
 5:1 de "Skelly B" et d'acétate d'éthyle].

Exemples 4-23

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec
 chacun des organismes repris dans le tableau 1, avec
 20 cette exception que l'on a ajouté l'ester octylique
 d'acide γ -chloracéto-acétique à une concentration
 de 1 mg/ml. On a obtenu une transformation en pro-
 duit désiré, à savoir l'ester octylique d'acide
 25 (+)4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique. On a répété les
 procédés de ces exemples en ajoutant continuellement
 le substrat aux milieux de levure. Le rapport pon-
 déral substrat/levure était d'environ 1:1,5 et l'on
 a obtenu une excellente transformation en produit
 désiré.

Exemples 24-48

On a répété le procédé de l'exemple 3 avec
 chacun des organismes repris dans le tableau 2, avec
 cette exception que l'on a utilisé l'ester octylique
 d'acide γ -chloracéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu
 35 une transformation en composé désiré, à savoir

l'ester octylique d'acide (+)-4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 49-68

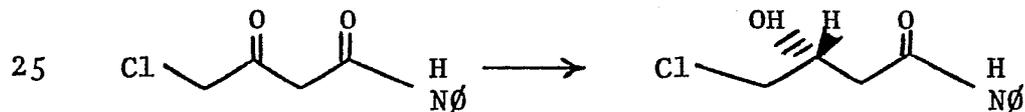
On a répété le procédé de l'exemple 1 avec
 5 chacun des organismes repris dans le tableau 1, avec
 cette exception que, comme substrat, on a utilisé
 l'ester benzylique d'acide γ -chloracéto-acétique
 (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en produit
 désiré, à savoir l'ester benzylique d'acide (+)4-
 10 chloro-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 69-93

On a répété le procédé de l'exemple 3 avec
 chacun des organismes repris dans le tableau 2 en
 utilisant, comme substrat, l'ester benzylique d'acide
 15 γ -chloracéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu une
 transformation en composé désiré, à savoir l'ester
 benzylique d'acide (+)4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemple 94

On a préparé l'anilide d'acide (+)4-chloro-
 20 3(R)-hydroxybutyrique conformément au procédé de
 l'exemple 2, avec cette exception que, comme substrat,
 on a utilisé le 4-chloracéto-acétanilide à une con-
 centration de 1 mg/ml



pour obtenir une transformation en produit désiré
 optiquement actif ; point de fusion : 110-111°C ;
 30 $[\alpha]^{23} +17,5^\circ$ (c, 3,0, CHCl₃) ; spectre de résonance

magnétique protonique (δ CD₃⁰CCD₃) : 2,67 (2H, d,
 J = 6 Hz, -HOHCH₂-CONHR), 3,66 (2H, d, J = 6 Hz,
 ClCH₂CHOH-R), 4,43 (1H, m, -CH₂-CH₂-), 7,03-7,44
 (3H, m, protons aromatiques, méta et para), 7,69
 35 (2H, d, J = 6 Hz, protons aromatiques, ortho),

9,24 (1H, large, -C-N- ϕ).
 $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$

Analyse pour $C_{10}H_{12}NO_2Cl$:

Calculé : C 56,21 ; H 5,66

5 Trouvé : C 56,17 ; H 5,47.

Exemples 95-114

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec chacun des organismes repris dans le tableau 1, avec cette exception que l'on a ajouté le γ -chloracéto-
 10 acétanilide à une concentration de 1 mg/ml. Dans tous les cas, on a obtenu une transformation en produit désiré, à savoir l'anilide d'acide (+)4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 115-139

15 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2. On a introduit le γ -chloracéto-acétanilide à une concentration de 1 mg/ml. Dans tous ces cas, on a obtenu une transformation en anilide d'acide (+)4-chloro-3(R)-hydroxy-
 20 butyrique désiré.

Exemples 140-159

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec les organismes repris dans le tableau 1, avec cette exception que, comme substrat, on a utilisé l'ester
 25 octylique d'acide γ -bromacéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en produit désiré, à savoir l'ester octylique d'acide (+)4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 160-184

30 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2, avec cette exception que l'on a utilisé l'ester octylique d'acide γ -bromacéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en produit désiré, à savoir l'ester
 35 octylique d'acide (+)4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique.



Exemples 185-204

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec les organismes repris dans le tableau 1, avec cette exception que, comme substrat, on a utilisé
5 l'ester benzylique d'acide γ -bromacéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en produit désiré, à savoir l'ester benzylique d'acide (+)4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 205-229

10 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2, avec cette exception que l'on a utilisé l'ester benzylique d'acide γ -bromacéto-acétique (1 mg/ml). On a obtenu la transformation en produit désiré, à savoir
15 l'ester benzylique d'acide (+)4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique.

Exemples 230-249

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec les organismes repris dans le tableau 1, avec
20 cette exception que, comme substrat, on a utilisé le γ -bromacétanilide (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en anilide d'acide (+)4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique désiré.

Exemples 250-274

25 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2, avec cette exception que, comme substrat, on a utilisé le γ -bromacétanilide (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en anilide d'acide (+)4-bromo-3(R)-
30 hydroxybutyrique désiré.

Exemples 275-294

On a répété le procédé de l'exemple 1 avec les organismes repris dans le tableau 1, avec
35 cette exception que, comme substrat, on a utilisé l'ester octylique d'acide γ -hydroxyacéto-acétique



(1 mg/ml). On a obtenu une transformation en ester octylique d'acide 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutyrique désiré.

Exemples 295-319

5 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2, avec cette exception que, comme substrat, on a utilisé l'ester octylique d'acide γ -hydroxyacéto-acétique. (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en ester
10 octylique d'acide 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutyrique désiré.

Exemples 320-339

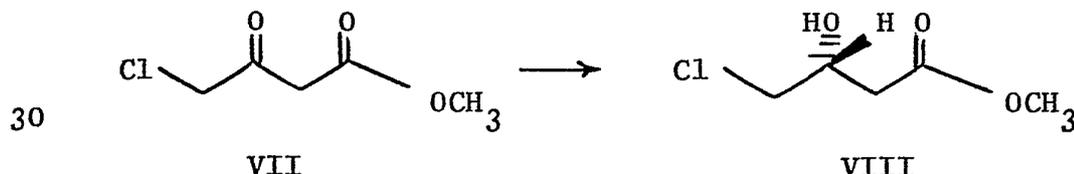
On a répété le procédé de l'exemple 1 avec les organismes repris dans le tableau 1, avec
15 cette exception que, comme substrat, on a utilisé le γ -hydroxyacéto-acétanilide (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en anilide d'acide 4-hydroxy-3(R)-hydroxybutyrique désiré.

Exemples 340-364

20 On a répété le procédé de l'exemple 3 avec les organismes repris dans le tableau 2, avec cette exception que, comme substrat, on a utilisé le γ -hydroxyacéto-acétanilide (1 mg/ml). On a obtenu une transformation en anilide d'acide 4-
25 hydroxy-3(R)-hydroxybutyrique désiré.

Exemple 365

4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de méthyle (VIII)



On a incubé 100 mg de 4-chloroacéto-acétate de méthyle (VII) avec 29 unités de déhydrogénase de β -hydroxyacyl-CoA (Sigma, H4626) de coeur de
35 porc (EC 1.1.1.35) et 1,36 g de NADH (Sigma, 90%)

dans 30 ml d'un tampon de phosphate de sodium 0,1M, pH 6,5.

Après 30 heures à 25°C, on a extrait quatre fois le mélange réactionnel avec 30 ml d'acétate d'éthyle. On a séché la couche organique sur du sulfate de sodium et on l'a évaporée jusqu'à siccité sous pression réduite. On a soumis le résidu (90 mg) à une chromatographie dans une colonne (1,3 x 34 cm) de gel de silice (12 g). On a élué la colonne avec un système solvant constitué d'un mélange 8:1 de "Skelly B" et d'acétate d'éthyle et l'on a recueilli des fractions de 20 ml. On a rassemblé les fractions 9-11 contenant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de méthyle désiré (VIII) comme l'a révélé la chromatographie sur couche mince, $[\alpha]_D^{23} +23,5^\circ$ (c, 5,2 CHCl_3).

Exemple 366

On a répété le procédé de l'exemple 365 en utilisant le 4-chloracéto-acétate d'éthyle comme substrat pour obtenir le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate d'éthyle, $[\alpha]_D^{23} +22,7^\circ$ (c, 4,7 CHCl_3).

Exemple 367

On a répété le procédé de l'exemple 365 en utilisant le 4-chloracéto-acétate de n-propyle comme substrat pour obtenir le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de n-propyle, $[\alpha]_D^{23} +21,5^\circ$ (c, 5,0, CHCl_3).

Exemple 368

On a répété le procédé de l'exemple 365 en utilisant le 4-chloracéto-acétate de n-butyle comme substrat pour obtenir le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de n-butyle, $[\alpha]_D^{23} +20,1^\circ$ (c, 3,1, CHCl_3).

Procédé général de transformation d'amides et d'esters
4-halo-3(R)-hydroxybutyriques en L-carnitine.

Exemple 369

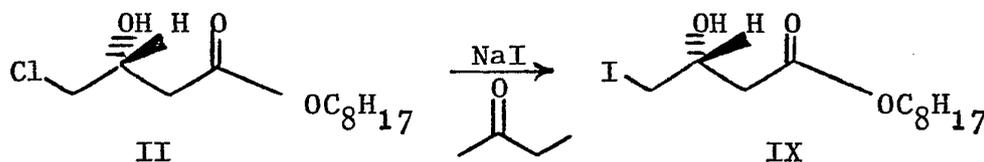
Pendant environ 2 heures, on a chauffé, à
5 80-90°C, un mélange de 1,5 g d'ester octylique d'acide
4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique, de 3 ml d'éthanol et
de triméthylamine (solution à 25% en poids) dans 3 ml
d'eau. On a soumis les solvants et l'excès de tri-
méthylamine à une évaporation sous vide jusqu'à sic-
10 cité pour obtenir 1,8 g d'un résidu brut. On a
chauffé le produit brut (1 g) à 80-90°C dans une
solution de HCl à 10% (7 ml) pendant 1,5 heure.
Après évaporation des solvants sous pression réduite,
on a extrait deux fois le produit brut avec de l'étha-
15 nol absolu (10 ml) et on a évaporé l'éthanol sous
vide. On a dissous le résidu cristallin dans une
petite quantité d'éthanol et, par addition d'éther,
on a précipité le chlorure de L-carnitine avec un
bon rendement (320 mg) ; point de fusion : 142°
20 (décomposition) ; $[\alpha] -23,7^\circ$ (c, 4,5, H₂O).

On peut aisément transformer le chlorure
de L-carnitine en un sel interne de L-carnitine
pharmaceutiquement préféré par échange d'ions de
façon bien connue dans la technique.

25

Exemple 370

4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate d'octyle (IX)



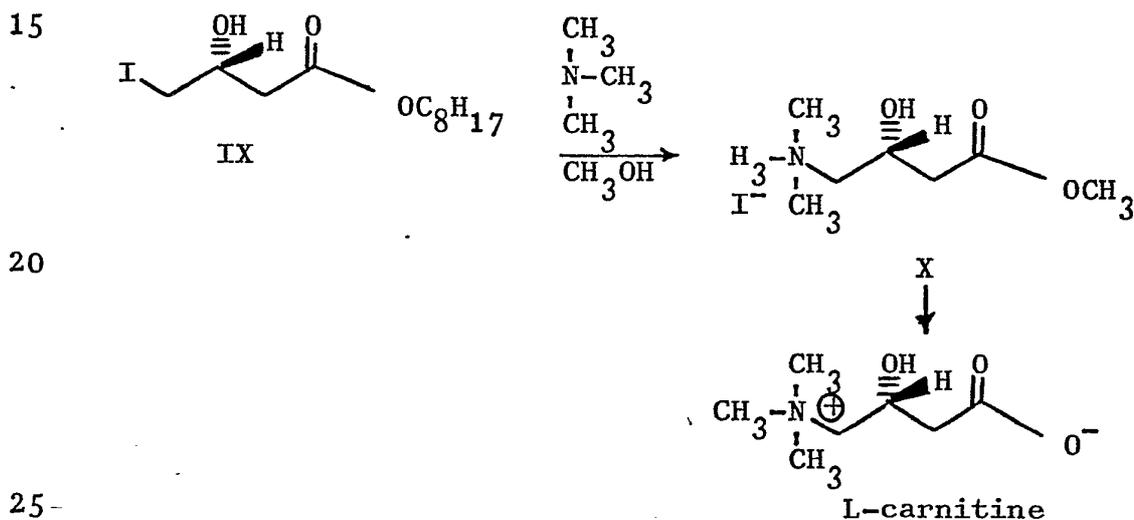
30

Pendant 24 heures, on a chauffé à reflux
un mélange de 1,426 g de 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate
d'octyle (II) et de 1,2 g de NaI anhydre dans 15 ml
de méthyléthyl-cétone. On a évaporé le mélange à
35 l'évaporateur rotatif et on l'a fait réagir avec

Handwritten mark

100 ml d'éther et 50 ml d'eau. On a séparé la phase organique et on l'a lavée avec 150 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 10% et 150 ml de saumure, puis on l'a séchée sur du sulfate de sodium anhydre. On a évaporé le solvant sous pression réduite pour obtenir 1,762 g de IX sous forme d'une huile jaune pâle ; spectre d'absorption des rayons infrarouges (pellicule mince) 3460 cm^{-1} (OH) et 1730 cm^{-1} (ester C=O) ; spectre de résonance magnétique protonique (CDCl_3) : 3,93-4,27 (m, 3H), 3,17 (d, 2H), 2,50 (d, 2H), 1,50-1,87 (m, 2H), 1,30 (s large, 12H), 0,93 (m, 3H).

Transformation du 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate d'octyle (IX) en L-carnitine



A une solution de 1,593 g de IX dans 15 ml de méthanol, on a ajouté 8 ml d'une solution aqueuse à 25% de triméthylamine. On a agité le mélange à 27°C pendant 20 heures. On a séparé les solvants et l'excès de triméthylamine par évaporation sous pression réduite pour obtenir un solide semi-cristallin X. On a lavé ce résidu avec de petites quantités d'éther pour éliminer l'octanol, puis on l'a dissous dans l'eau et on l'a fait passer sur du Dowex 1-x4 [forme OH^- - 50-100 mailles, volume de la

35

colonne : 2,5 x 15 cm]. On a lavé la colonne avec de l'eau distillée. Par élimination du solvant sous vide hors des deux cents premiers millilitres de l'éluat, on a obtenu la L-carnitine sous forme
5 d'un solide cristallin blanc (490 mg, rendement : 65%) $[\alpha]_D^{23} -29,2^\circ$ (c, 6,5 H₂O).

Exemple 371

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate
10 d'hexyle pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate d'hexyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Exemple 372

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate d'heptyle
15 pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate d'heptyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Exemple 373

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de décyle
20 pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate de décyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Exemple 374

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de méthyle
25 le (VIII) pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate de méthyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Exemple 375

On a répété le procédé de l'exemple 370
30 - en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate d'éthyle pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate d'éthyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.



Exemple 376

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de n-propyle pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate de n-propyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Exemple 377

On a répété le procédé de l'exemple 370 en utilisant le 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrate de n-butyle pour obtenir le 4-iodo-3(R)-hydroxybutyrate de n-butyle que l'on a ensuite transformé en L-carnitine.

Les levures représentatives produisant l'enzyme désirée sont reprises dans le tableau 1, tandis que des champignons représentatifs sont repris dans le tableau 2.



TABLEAU 1 (Levures)

1. Candida lipolytica NRRL Y-1095
2. Candida pseudotropicalis NRRL Y-1264
3. Mycoderma cerevisiae NRRL Y-1615
- 5 4. Torula lactosa NRRL Y-329
5. Geotrichum candidum NRRL Y-552
6. Hansenula anomala NRRL Y-366
7. Hansenula subpelliculosa NRRL Y-1683
8. Pichia alcoholophila NRRL Y-2026
- 10 9. Saccharomyces cerevisiae NRRL Y-12.632
10. Saccharomyces lactis NRRL Y-1140
11. Zygosaccharomyces priorianus NRRL Y-12.624
12. Saccharomyces acidifaciens NRRL Y-7253
13. Kloeckera corticis ATCC 20109
- 15 14. Cryptococcus mascerans ATCC 24194
15. Rhodotorula sp. ATCC 20254
16. Candida albicans ATCC 752
17. Dipodascus albidus ATCC 12934
18. Saccharomyces cerevisiae ("Red Star" commercial)
- 20 19. Rhodotorula rubra NRRL Y-1592
20. Oospora lactis ATCC 14318

NRRL - Northern Regional Research Lab. à Peoria,
Illinois.

ATCC - American Type Culture Collection à Rockville,
Maryland.



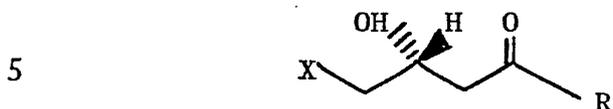
TABLEAU 2 (Champignons)

1. Gliocladium virens ATCC 13362
2. Caldariomyces fumago ATCC 16373
3. Linderina pennisopora ATCC 12442
- 5 4. Aspergillus ochraceus NRRL 405
5. Trichoderma lignorum ATCC 8678
6. Heterocephalum autantiacum ATCC 16328
7. Entomophthora coronata NRRL 1912
8. Scopulariopsis constantini NRRL 1860
- 10 9. Zygorhynchus heterogamus ATCC 6743
10. Scopulariopsis brevicaulis NRRL 2157
11. Rhizopus arrhizus NRRL 2286
12. Penicillium thomii NRRL 2077
13. Mucor hiemalis (-) NRRL 4088
- 15 14. Byssochlamys nivea ATCC 12550
15. Penicillium patulum NRRL 1952
16. Metarrhizium anisopliae ATCC 24942
17. Penicillium islandicum ATCC 10127
18. Cunninghamella elegans ATCC 10028a
- 20 19. Cunninghamella echinulata ATCC 11585a
20. Aspergillus fumigatus ATCC 16907
21. Aspergillus amstelodami NRRL 90
22. Gliocladium roseum ATCC 10521
23. Aspergillus giganteus ATCC 10059
- 25 24. Absidia blakeleeana ATCC 10148b
25. Penicillium roqueforti NRRL 849a



REVENDEICATIONS

1. Composés ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



dans laquelle

X est choisi parmi Cl, Br, I et OH, et

R est un radical à chaîne droite, à chaîne ramifiée ou à configuration cyclique choisi parmi la classe comprenant :

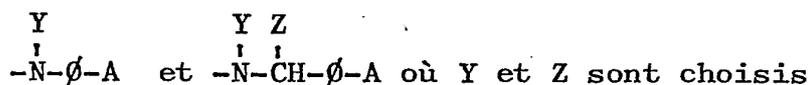
les radicaux alcoxy contenant 1 à environ 15 atomes de carbone ;

les radicaux alkylamino contenant environ 5 à environ 15 atomes de carbone ;

les radicaux cycloalcoxy et les radicaux cycloalkylamino contenant environ 5 à environ 12 atomes de carbone ;

les radicaux phénoxy et phénylalcoxy contenant 7 à environ 14 atomes de carbone ;

les radicaux phénylamino et phénylalkylamino répondant aux formules :



25 parmi H, un groupe alkyle contenant 1 à environ 8 atomes de carbone, un groupe phényle ou un groupe benzyle et A est choisi parmi H, CH₃, Cl et Br.

2. Composé suivant la revendication 1, dans lequel R est un radical alcoxy à chaîne droite contenant 1 à 10 atomes de carbone.

3. Composé suivant la revendication 2, dans lequel R représente OC₁₀H₂₁.

4. Composé suivant la revendication 2, dans lequel R représente OC₈H₁₇.

5. Composé suivant la revendication 2, dans lequel R représente OC_7H_{15} .

6. Composé suivant la revendication 2, dans lequel R représente OC_6H_{13} .

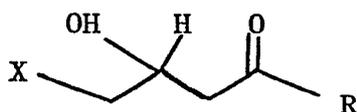
5 7. Composé suivant la revendication 2, caractérisé en ce que R est un radical alcoxy inférieur contenant 1 à 4 atomes de carbone.

8. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que R est choisi entre des groupes phénoxy et phényl alcoxy substitués par un radical alkyle inférieur, un groupe halo ou un groupe nitro.

9. Composé suivant la revendication 8, caractérisé en ce que R est un radical benzyloxy et X est choisi parmi Cl et Br.

15 10. Composé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que R est un groupe phénylamino et X est choisi parmi Cl et Br.

11. Procédé de préparation de dérivés d'acides β -hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs répondant à la formule :



dans laquelle

25 X est choisi parmi Cl, Br, I et OH, et

R est un radical à chaîne droite, à chaîne ramifiée ou à configuration cyclique choisi parmi la classe comprenant :

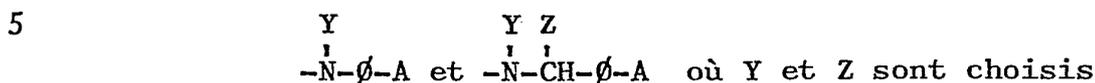
30 les radicaux alcoxy contenant 1 à environ 15 atomes de carbone ;

les radicaux alkylamino contenant environ 5 à environ 15 atomes de carbone ;

35 les radicaux cycloalcoxy et les radicaux cycloalkylamino contenant environ 5 à environ 12 atomes de carbone ;

les radicaux phénoxy et phénylalkoxy contenant 7 à environ 14 atomes de carbone ;

les radicaux phénylamino et phénylalkyl-amino répondant aux formules :

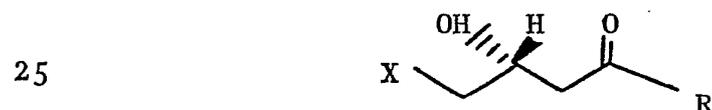


parmi H, un groupe alkyle contenant 1 à environ 8 atomes de carbone, un groupe phényle ou un groupe benzyle et A est choisi parmi H, CH₃, Cl et Br,

10 à partir d'amides ou d'esters d'acides acéto-acétiques Y-substitués correspondants, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

15 soumettre ces amides ou esters d'acides acéto-acétiques Y-substitués à l'action enzymatique fermentante d'un micro-organisme élaborant la déhydrogénase de L-β-hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35], et récupérer les dérivés d'acides β-hydroxybutyriques Y-substitués optiquement actifs désirés.

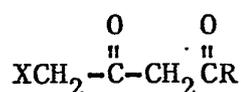
20 12. Procédé suivant la revendication 11 en vue de préparer des dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques Y-substitués optiquement actifs ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



25 dans laquelle X et R ont les significations indiquées ci-dessus, avec cette restriction que, si R est un radical alcoxy, il contient 5 à environ 15 atomes

30 de carbone, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à

soumettre des composés répondant à la formule :



dans laquelle X et R ont les significations indiquées ci-dessus, à l'action enzymatique fermentante d'un micro-organisme élaborant la déshydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35], et

5 récupérer les dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques 4-substitués optiquement actifs désirés du mélange réactionnel fermentant.

13. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi
10 parmi la classe Ascomycetes.

14. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les ordres Endomycetales, Mucorales, Moniliales et Eurotiales.

15 15. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi le genre Saccharomyces.

16. Procédé suivant la revendication 15, caractérisé en ce que le micro-organisme est Saccharomyces cerevisiae.
20

17. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le dérivé d'acide acéto-acétique γ -substitué soumis à l'action enzymatique fermentante est l'ester octylique d'acide γ -chloracéto-acétique.
25

18. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le dérivé d'acide acéto-acétique γ -substitué soumis à l'action enzymatique fermentante est l'ester benzylique d'acide γ -chloracéto-acétique.
30

19. Procédé suivant la revendication 12, caractérisé en ce que le dérivé d'acide acéto-acétique γ -substitué soumis à l'action enzymatique fermentante est le γ -chloracéto-acétanilide.

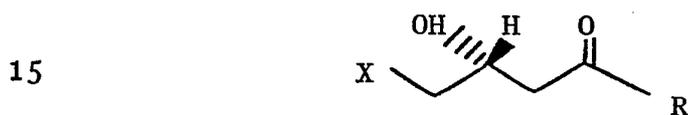


20. Procédé suivant la revendication 17, caractérisé en ce que le micro-organisme est *Saccharomyces cerevisiae*.

5 21. Procédé suivant la revendication 18, caractérisé en ce que le micro-organisme est *Saccharomyces cerevisiae*.

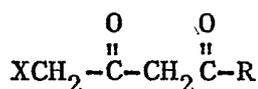
22. Procédé suivant la revendication 19, caractérisé en ce que le micro-organisme est *Saccharomyces cerevisiae*.

10 23. Procédé suivant la revendication 11 en vue de préparer des dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs ayant la configuration 3(R) et répondant à la formule :



dans laquelle X a les significations indiquées ci-dessus et R est un radical alcoxy contenant 1 à 4 atomes de carbone, caractérisé en ce qu'il comprend
20 les étapes qui consistent à :

soumettre des composés répondant à la formule :



25 dans laquelle X et R ont les significations indiquées ci-dessus, à l'action enzymatique de la déhydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35] sous forme purifiée, et

30 récupérer les dérivés d'acides 3(R)-hydroxybutyriques γ -substitués optiquement actifs désirés du mélange réactionnel enzymatique.

35 24. Procédé suivant la revendication 23, caractérisé en ce que la déhydrogénase de L- β -hydroxyacyl-CoA [EC 1.1.1.35] sous forme purifiée est celle isolée du coeur de porc.

25. Procédé de préparation d'un sel interne de L-carnitine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à faire réagir un dérivé d'acide 3(R)-hydroxybutyrique 4-substitué
5 suivant la revendication 1 successivement avec la triméthylamine et l'acide chlorhydrique, extraire le chlorure de L-carnitine, soumettre ce chlorure à un échange d'ions et récupérer le sel interne de L-carnitine.

10 26. Procédé de préparation d'un dérivé d'acide 4-iodo- ou 4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un dérivé d'acide 4-chloro-3(R)-hydroxybutyrique avec
15 de l'iodure de sodium ou du bromure de sodium dans un solvant à une température de 50 à 100°C pour former le dérivé correspondant d'acide 4-iodo- ou 4-bromo-3(R)-hydroxybutyrique.

20 27. Procédé de préparation d'un sel interne de L-carnitine, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

a) faire réagir un ester 4-iodo- ou 4-bromo-3(R)-hydroxybutyrate d'alkyle contenant 1 à
10 atomes de carbone avec la triméthylamine dans du méthanol ou de l'éthanol pour former un sel d'ester
25 méthylique ou éthylique de L-carnitine, et

b) transformer ce sel d'ester de L-carnitine en un sel interne de L-carnitine.

