PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2002 - 3202

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 P 13/00

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.03.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **28.03.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/89182**

(33) Země priority: **JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.03.2003**
(Věstník č. 3/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/JP01/01628**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/073100**

(71) Přihlašovatel:
DAIICHI FINE CHEMICAL CO. LTD., Takaoka-shi, JP;

(72) Původce:
Sakamoto Keiji, Takaoka-shi, JP;
Kita Shinji, Takaoka-shi, JP;
Tsuzaki Kazuya, Takaoka-shi, JP;
Morikawa Tadanori, Takaoka-shi, JP;
Shimizu Sakayu, Kyoto, JP;
Kataoka Michihiko, Kyoto, JP;

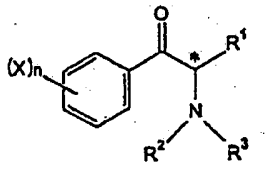
(74) Zástupce:
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

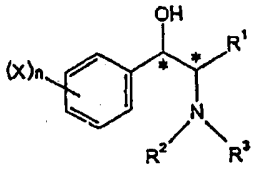
Způsob výroby opticky aktivního beta-aminoalkoholu

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu, kdy se alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganismy rodu Morganella a dalších rodů, ponechá působit na enantiomerní směs α-aminoketonu nebo jeho soli obecného vzorce I, čímž se připraví opticky aktivní β-aminoalkohol s požadovanou optickou aktivitou mající obecný vzorec II, a to s vysokým výtěžkem a vysoce selektivním způsobem.



(I)



(II)

CZ 2002 - 3202 A3

29.10.02

Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu výroby opticky aktivních β-aminoalkoholů. Konkrétně se týká způsobu výroby opticky aktivních β-aminoalkoholů, které jsou cenné jakožto léčiva nebo jejich meziprodukty.

Dosavadní stav techniky

Efedriny byly dříve používány pro pocení, jako antipyretika a pro tlumení kašle, a konkrétně d-pseudoefedrin je znám svým protizánětlivým účinkem. Farmakologické účinky, jako je například vasokonstrikce, zvýšení krevního tlaku nebo pocení, jsou známy pro l-efedrin, který je užíván v terapii jako sympatomimetikum. l-efedrin se také používá v léčení bronchiálního astmatu. Specificky, způsoby produkce opticky aktivních β-aminoalkoholů, včetně opticky aktivních efedrinů, jsou použitelné při výrobě léčiv a jejich meziproduktů, takže zde existuje potřeba účinného způsobu výroby těchto látek.

Při obvyklém způsobu výroby β-aminoalkoholů s požadovanou optickou aktivitou se užívá postup, kdy se získá racemický β-aminoalkohol a pak se specifická opticky aktivní forma získá optickou rezolucí (štěpením) nebo asymetrickou syntézou, kromě dalších postupů.

Avšak jelikož racemický β-aminoalkohol má dva asymetrické atomy uhlíku ve své molekule, pro získání specifické opticky aktivní formy musí být provedeny složité kroky. Například, podle patentového dokumentu Německa (bývalé NDR) č. 13683

(27. srpen 1957) byl opticky aktivní fenylacetylkarbinol vyráběn z benzaldehydu pomocí fermentace s použitím kvasinek, a tedy *erythro*-1-2-methylamino-1-fenyl-1-propanol (tj. l-efedrin) mohl být vyráběn redukční kondenzací methylaminu na opticky aktivní fenylacetylkarbinol.

Příprava pseudoefedrinu je možná i postupem popsaným v patentu USA č. 4,237,304: oxazolin je vytvořen z l-efedrinu, který byl připraven způsobem podle patentového dokumentu Německa (bývalé NDR) č. 13683 (27. srpen 1957), s použitím acetanhydridu, a pak se oxazolin hydrolyzuje inverzí na *threo* formu (tj. d-pseudoefedrin).

Jak bylo již uvedeno výše, k výrobě pseudoefedrinu s požadovanou optickou aktivitou z 2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu jsou nezbytné kroky, kdy je připraven efedrin v opticky aktivní *erythro* formě a pak je invertován na *threo* formu. To vede k problému, že počet kroků roste, celý proces se komplikuje a výtěžky jsou proto nižší.

Navíc i když při výrobě pseudoefedrinu vzniká jako vedlejší produkt značné množství diastereomerů v průběhu redukce výchozího ketonu, získání diastereomerů pro jejich použití jako suroviny je obtížné, což je ekonomicky nevýhodné.

Kromě toho podle způsobu, který byl popsán publikaci JP 8-98697 A, je možné vyrábět opticky aktivní 2-amino-1-fenylethanolový derivát z 2-amino-1-fenylethanolové sloučeniny mající ve své molekule jeden asymetrický atom uhlíku, a sice využitím specifických mikroorganizmů. Dosavadní stav techniky je však takový, že dosud nebyl popsán žádný účinný způsob výroby β-aminoalkoholů obsahujících dva asymetrické atomy uhlíku.

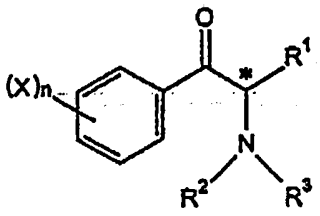
Podstata vynálezu

Předkládaný vynález byl vytvořen vzhledem k výše zmíněné skutečnosti a jeho cílem je výroba β-aminoalkoholu s požadovanou optickou aktivitou ze směsi anantiomerů α-aminoketonových sloučenin nebo jejich solí, a to s vysokým výtěžkem a vysoce selektivním způsobem, navíc v jednoduchém procesu, při kterém je dostatečně zabráněno tvorbě diastereomerních vedlejších produktů.

Původci předkládaného vynálezu opakovali uvedené studie pečlivě, aby vyřešili zmíněný problém, a tak bylo zjištěno, že pomocí specifických mikroorganizmů pouze jeden enantiomer z enantiomerní směsi α-aminoketonových sloučenin nebo jejich solí může být redukován za vzniku pouze požadovaného druhu ze čtyřech odpovídajících druhů β-aminoalkoholů, a to s vysokým výtěžkem a vysoce selektivním způsobem. Tu vedlo k realizaci předkládaného vynálezu

Konkrétně způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle předkládaného vynálezu je takový způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu, který je charakterizován tím, že se alespoň jeden z mikroorganizmů vybraný skupiny, kterou tvoří mikroorganizmy rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus*, rodu *Amycolatopsis*, rodu *Coprinus*, rodu *Serratia*, rodu *Rhodococcus* a rodu *Rhodotorula*, užije k působení na enantiomerní směs α-aminoketonu obecného

vzorce (I) nebo jeho soli:



(I)

kde

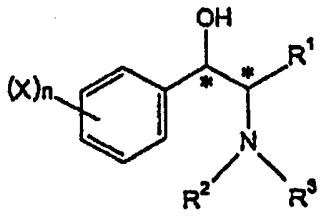
X mohou být shodné nebo odlišné, přičemž X představuje alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom halogenu, nižší alkylová skupina, hydroxylová skupina volitelně chráněná chránící skupinou, nitroskupina a sulfonylová skupina, přičemž n představuje celé číslo 0 až 3,

R^1 představuje nižší alkylovou skupinu,

R^2 a R^3 mohou být shodné nebo odlišné, a představují alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a nižší alkylová skupina,

"*" označuje asymetrický atom uhlíku,

pro výrobu opticky aktivní β-aminoalkoholové sloučeniny s požadovanou optickou aktivitou obecného vzorce (II):



(II)

kde X, n, R^1, R^2, R^3 a "*" jsou jak byly definovány výše.

Mikroorganizmus podle vynálezu je výhodně alespoň jeden mikroorganiszmus vybraný ze skupiny, kterou tvoří

mikroorganizmus *Morganella morganii*, *Microbacterium arborescens*, *Sphingobacterium multivorum*, *Nocardioides simplex*, *Mucor ambiguus*, *Mucor javanicus*, *Mucor fragilis*, *Absidia lichtheimi*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*, *Aspergillus foetidus* var. *acidus*, *Penicillium oxalicum*, *Grifola frondosa*, *Eurotium repens*, *Ganoderma lucidum*, *Hypocrea gelatinosa*, *Helicostylum nigricans*, *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Fusarium roseum*, *Tritirachium oxyzae*, *Mortierella isabellina*, *Armillariella mellea*, *Cylindrocarpon sclerotigenum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aureobacterium esteraromaticum*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium diernhoferi*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chlorphfenolicum*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Sporobolomyces coralliformis*, *Sporidiobolus johnsonii*, *Amycolatopsis alba*, *Amycolatopsis azurea*, *Amycolatopsis coloradensis*, *Amycolatopsis orientalis lurida*, *Amycolatopsis orientalis orientalis*, *Coprinus rhizophorus*, *Serratia marcescens*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous a Rhodotorula aurantiaca*.

Podle předkládaného vynálezu je mikroorganizmus výhodně alespoň jeden mikroorganizmus vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmus patřící k rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus* a rodu *Rhodococcus*.

Konkrétněji, výhodný mikroorganizmus je vybrán ze skupiny, kterou tvoří *Morganella morganii, Microbacterium arborescens, Sphingobacterium multivorum, Nocardioides simplex, Mucor ambiguus, Mucor javanicus, Mucor fragilis, Absidia lichtheimi, Aspergillus awamori, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus candidus, Aspergillus oryzae var. oryzae, Aspergillus foetidus* var. *acidus, Penicillium oxalicum, Grifola frondosa, Eurotium repens, Ganoderma lucidum, Hypocrea gelatinosa, Helicostylum nigricans, Helicostylum nigricans, Verticillium fungicola* var. *fungicola, Fusarium roseum, Tritirachium oxyzae, Mortierella isabellina.*

S použitím těchto mikroorganizmů se získají (1S,2S)-amino alkoholy jednoduchým procesem jakožto opticky aktivní β-aminoalkoholy obecného vzorec (II) s vysokým výtěžkem a také vysoce selektivním způsobem.

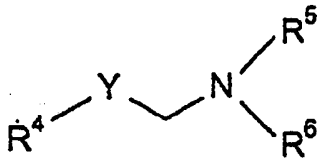
Dále je mikroorganizmus výhodně alespoň jeden z mikroorganizmů vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmy patřící k rodu *Amycolaptopsis,* rodu *Coprinus,* rodu *Serratia,* rodu *Rhodococcus a* rodu *Rhodotorula.* Konkrétněj je mikroorganizmus výhodně vybrán ze skupiny, kterou tvoří *Amycolatopsis alba, Amycolatopsis azurea, Amycolatopsis coloradensis, Amycolatopsis orientalis lurida, Amycolatopsis orientalis orientalis, Coprinus rhizophorus, Serratia marcescens, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous a Rhodotorula aurantiaca.*

S použitím těchto mikroorganizmů se získají (1S,2S)-amino alkoholy jednoduchým procesem jakožto opticky aktivní β-aminoalkoholy obecného vzorec (II) s vysokým výtěžkem a také vysoce selektivním způsobem.

A dále mikroorganizmus podle předkládaného vynálezu může být pěstován v médiu, ke kterému byl přidán induktor aktivity

29.10.02

obecného vzorce (III):



(III)

kde

R^4 je nižší alkylová skupina,

R^5 a R^6 mohou být shodné nebo odlišné a každý představuje atom vodíku, nižší alkylovou skupinu nebo acylovou skupinu, a

Y představuje skupinu C=O nebo skupinu CH-OH.

Přítomnost takového induktoru aktivity zajišťuje účinnější produkci opticky aktivního β-aminoalkoholu.

Popis obrázků

Obrázky 1A až 1D představují ukázky struktury opticky aktivních β-aminoalkoholů popisovaných dále, včetně jejich absolutní konfigurace.

Obrázek 1A ukazuje β-aminoalkohol s konfigurací (1S,2S) získaný způsobem podle předkládaného vynálezu.

Obrázek. 1B ukazuje (1S, 2S)-(+)-pseudoefedrin připravený způsobem podle vynález.

Obrázek. 1C ukazuje β-aminoalkohol s konfigurací (1R,2R) získaný způsobem podle vynálezu.

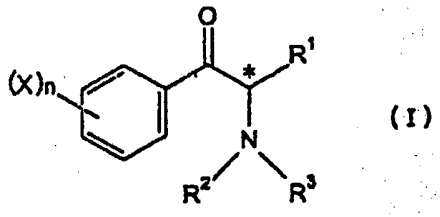
29.10.02

Obrázek. 1D ukazuje (1R, 2R)-(-)-pseudoefedrin připravený způsobem podle vynálezu.

Nejlepší způsob realizace vynálezu

V následující části popisu jsou podrobně popsána výhodná provedení předkládaného vynálezu.

Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle tohoto vynálezu je způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu založený na tom, že se nechá alespoň jeden z mikroorganizmů vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmy patřící k rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus*, rodu *Amycolatopsis*, rodu *Coprinus*, rodu *Serratia*, rodu *Rhodococcus* a rodu *Rhodotorula* působit na enantiomerní směs α-aminoketonové sloučeniny nebo její soli obecného vzorce (I):



(I)

kde

X mohou být shodné nebo odlišné, a představují alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom halogenu, nižší alkylová skupina, hydroxylová skupina volitelně chráněná chránící skupinou, nitroskupina a sulfonylová skupina,

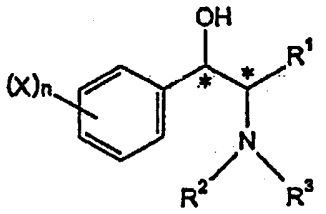
n představuje celé číslo 0 až 3,

R^1 představuje nižší alkylovou skupinu,

R^2 a R^3 mohou být shodné nebo odlišné, a představuje alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku, anižší alkylová skupina, a

"*" označuje asymetrický atom uhlíku,

aby vznikla opticky aktivní aminoalkoholová sloučenina s požadovanou optickou aktivitou mající obecný vzorec (II):



(II)

kde X, n, R^1, R^2, R^3 a "*" mají význam jak byl výše definován.

Výchozím materiálem ve způsobu výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle předkládaného vynálezu je enantiomerní směs α-aminoketonové sloučeniny nebo její soli mající obecný vzorec (I), kde X mohou být shodné nebo odlišné, a představuje alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom halogenu, nižší alkylová skupina, hydroxylová skupina volitelně chráněná chránící skupinou, nitroskupina a sulfonylová skupina, n představuje celé číslo 0 až 3, R^1 představuje nižší alkylovou skupinu, R^2 a R^3 mohou být shodné nebo odlišné, a představují alespoň jeden člen vybraný ze

skupiny, kterou tvoří atom vodíku a nižší alkylová skupina, a "*" představuje asymetrický uhlík.

Skupina X obsažená α-aminoketonu je definována následovně:

Atom halogenu zahrnuje atom fluoru, atom chloru, atom bromu a atom jodu.

Nižší alkylová skupina je výhodně alkylová skupina obsahující jeden až šest atomů uhlíku, jako je methylová skupina, ethylová skupina, propylová skupina, isopropylová skupina, butylová skupina, isobutylová skupina, s-butylová skupina, t-butylová skupin, pentylová skupina, isopentylová skupina, hexylová skupina apod. Tyto skupiny mohou mí buďto přímý řetězec nebo rozvětvenou strukturu a mohou jako substituent obsahovat atom halogenu jako je například atom fluoru nebo chloru, hydroxylovou skupinu, alkylovou skupinu, aminoskupinu nebo alkoxyskupinu.

Chránící skupina hydroxylové skupiny volitelně chráněné chránící skupinou je kromě jiných např. skupina, která může být odstraněna působením vody, skupina, která může být odstraněna hydrogenací, skupina, která může být odstraněna Lewisovou kyselinou jakožto katalyzátorem nebo thiomočovinou. Chránící skupiny zahrnují acylovou skupinu volitelně substituovanou, alkoxyalkylovou skupinu volitelně substituovanou, alkoxyalkylovou skupinu, nižší alkylovou skupinu volitelně substituovanou, benzylovou skupinu, p-methoxybenzylovou skupinu, 2,2,2-trichlorethoxykarbonylovou skupinu, allyloxykarbonylovou skupinu, tritylovou skupinu apod.

K acylovým skupinám patří acetylová skupina, chloracetylová skupina, dichloracetylová skupina, pivaloylová skupina, benzoylová skupina, p-nitrobenzoylová skupina apod.,

která může mít navíc substituent jako je například hydroxylová skupina, alkylová skupina, alkoxyskupina, nitroskupina, atom halogenu apod. Silylová skupina zahrnuje trimethylsilylovou skupinu, t-butyldimethylsilylovou skupinu, triarylsilylovou skupinu apod., která může mít substituent jako je například alkylová skupina, arylová skupina, hydroxylová skupina, alkoxyskupina, nitroskupina, atom halogenu apod. Alkylová skupina zahrnuje methoxymethylovou skupinu, 2methoxy-ethoxymethylovou skupinu apod. K nižším alkylovým skupinám patří alkylové skupiny obsahující jeden až šest atomů uhlíku, jako je např. methylová, ethylová, propylová, isopropylová, butylová, isobutylová, s-butylová, t-butylová, pentylová, isopentylová a hexylová skupina, apod. Tyto skupiny mohou mít buďto přímou nebo rozvětvenou strukturu a mohou obsahovat substituent jako je například atom halogenu (včetně fluoru a chloru), hydroxylová skupina, alkylová skupina, aminoskupina nebo alkoxyskupina.

X je nitroskupina nebo sulfonylová skupina, zejména mimo jiné methylsulfonylová skupina.

Kromě toho, počet n skupin X je celé číslo 0 až 3, výhodně je to 0.

R^1 v obecném vzorci (I) představuje nižší alkylovou skupinu. Takové nižší alkylové skupiny jsou výhodně alkylové skupiny obsahující jeden až šest atomů uhlíku: jsou to např. methylová, ethylová, propylová, isopropylová, butylová, isobutylová, s-butylová, t-butylová, pentylová, isopentylová a hexylová skupina, apod. Tyto skupiny mohou být buďto přímým řetězcem nebo mít rozvětvenou strukturu.

R^2 a R^3 představují atom vodíku nebo nižší alkylovou skupinu. Nižší alkylové skupiny jsou výhodně alkylové skupiny obsahující jeden až šest atomů uhlíku: jsou to např.

methylová, ethylová, propylová, isopropylová, butylová, isobutylová, s-butylová, t-butylová, pentylová, isopentylová a hexylová skupina, apod. Tyto skupiny mohou mít buďto přímou nebo rozvětvenou strukturu.

Soli α-aminoketonové sloučeniny zahrnují soli anorganických kyselin jako je například hydrochlorid, síran, dusičnan, fosforečnan a uhličitan, a také soli organických kyselin jako je například acetát a citrát.

α-aminoketony mohou být snadno syntetizovány pomocí halogenace α-uhlíku odpovídajícího 1-fenylketonového derivátu (např. bromací) a substitucí atomu halogenu, například nahrazení bromu aminoskupinou (viz patentový dokument bývalé NDR z r. 1956, citován výše).

Mikroorganizmus podle předkládaného vynálezu je mikroorganizmus, který působí na enantiomerní směs α-aminoketonu majícího obecný vzorec (I) nebo jeho sůl. Takový mikroorganizmus je vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmy patřící k rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus*, rodu *Amycolatopsis*, rodu *Coprinus*, rodu *Serratia*, rodu *Rhodococcus a* rodu *Rhodotorula*

Konkrétně výhodné mikroorganizmy zahrnují následující: *Morganella morganii* IFO 3848, *Microbacterium arborescens* IFO 3750, *Sphingobacterium multivorum* IFO 14983, *Nocardioides simplex* IFO 12069, *Mucor ambiguus* IFO 6742, *Mucor javanicus*

IFO 4570, *Mucor fragilis* IFO 6449, *Absidia lichtheimi* IFO 4009, *Aspergillus awamori* IFO 4033, *Aspergillus niger* IFO 4416, *Aspergillus oryzae* IFO 4177, *Aspergillus oryzae* IAM 2630, *Aspergillus candidus* IFO 5468, *Aspezyillus oryzae var. oryzae* IFO 6215, *Aspergillus foetidus var. acidus* IFO 4121, *Penicillium oxalicum* IFO 5748, *Grifola frondosa* IFO 30522, *Eurofium repens* IFO 4884, *Ganoderma lucidum* IFO 8346, *Hypocrea gelatinosa* IFO 9165, *Helicostylum nigricans* IFO 8091, *Verticillium fungicola var. fungicola* IFO 6624, *Fusarium roseum* IFO 7189, *Tritirachium oryzae* IFO 7544, *Mortierella isabellina* IFO 8308, *Armillariella mellea* IFO 31616, *Cylindrocarpon sclerotigenum* IFO 31855, *Klebsiella pneumoniae* IFO 3319, *Aureobacterium esteraromaticum* IFO 3751, *Xanthomonas sp.* IFO 3084, *Pseudomonas putida* IFO 14796, *Mycobacterium smegmatis* IAM 12065, *Mycobacterium diernhoferi* IFO 14797, *Mycobacterium vaccae* IFO 14118, *Mycobacterium phlei* IFO 13160, *Mycobacterium fortuitum* IFO 13159, *Mycobacterium chlorophenolicum* IFO 15527, *Sporobolomyces salmonicolor* IFO 1038, *Sporobolomyces coralliformis* IFO 1032, *Sporidiobolus johnsonii* IFO 6903, *Amycolatopsis* alba IFO 15602, *Amycolatopsis azurea* IFO 14573, *Amycolatopsis coloradensis* IFO 15804, *Amycolatopsis orientalis lurida* IFO 14500, *Amycolatopsis orientalis orientalis* IFO 12360, IFO 12362, IFO 12806, *Coprinus rhizophorus* IFO 30197, *Serratia marcescens* IFO 3736, *Rhodococcus erythropolis* IFO 12540, *Rhodococcus erythropolis* MAK-34, *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564, *Rhodococcus rhodochrous* IAM 12126, *Rhodotorula aurantiaca* IFO 0951 apod.

Takové mikroorganizmy podle vynálezu dovolují výrobu odpovídajících opticky aktivních β-aminoalkoholové sloučeniny mající obecný vzorec (II), přičemž sloučenina má požadovanou optickou aktivitu.

V obecném vzorci (II) mají X, n, R^1, R^2, R^3 a "*" stejný význam jako v obecném vzorci (I). β-aminoalkoholy mající požadovanou optickou aktivitu zahrnují (1S,2S)-aminoalkohol, (1S,2R)-aminoalkohol, (1R,2S)-aminoalkohol a (1R,2R)-aminoalkohol.

Podle předkládaného vynálezu je mikroorganizmus výhodně alespoň jeden mikroorganizmus vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmus patřící k rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus* a rodu *Rhodococcus*.

Konkrétněji, výhodný mikroorganizmus je vybrán ze skupiny, kterou tvoří *Morganella morganii*, *Microbacterium arborescens*, *Sphingobacterium multivorum*, *Nocardioides simplex*, *Mucor ambiguus*, *Mucor javanicus*, *Mucor fragilis*, *Absidia lichtheimi*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*, *Aspergillus foetidus* var. *acidus*, *Penicillium oxalicum*, *Grifola frondosa*, *Eurotium repens*, *Ganoderma lucidum*, *Hypocrea gelatinosa*, *Helicostylum nigricans*, *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Fusarium roseum*, *Tritirachium oxyzae*, *Mortierella isabellina*, *Armillariella mellea*, *Cylindrocarpon sclerotigenum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aureobacterium esteraromaticum*, *Xanthomonas sp.*, *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium diernhoferi*, *Mycobacterium vaccae*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium*

fortuitum, Mycobacterium chlorphenolicum, Sporobolomyces salmonicolor, Sporobolomyces coralliformis, Sporidiobolus johnsonii, Rhodococcus erythropolis a *Rhodococcus rhodochrous.*

Užitím těchto mikroorganizmů mohou být (1S,2S)-aminoalkoholy získány jednoduchým způsobem jako opticky aktivní β-aminoalkoholy představované sloučeninou obecného vzorec (II) vysoce selektivním způsobem a s vysokým výtěžkem.

Dále podle předkládaného vynálezu mikroorganizmus je výhodně alespoň jeden z mikroorganizmů vybraný ze skupiny, kterou tvoří mikroorganizmy patřící k rodu *Amycolaptopsis,* rodu *Coprinus,* rodu *Serratia,* rodu *Rhodococcus* a rodu *Rhodotorula.* Konkrétně je mikroorganizmus výhodně vybrán ze skupiny, kterou tvoří *Amycolatopsis alba, Amycolatopsis azurea, Amycolatopsis coloradensis, Amycolatopsis orientalis lurida, Amycolatopsis orientalis orientalis, Coprinus rhizophorus, Serratia marcescens, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous* a *Rhodotorula aurantiaca.*

Užitím konkrétně těchto mikroorganizmů mohou být (1R,2R)-aminoalkoholy získány jednoduchým způsobem jako opticky aktivní β-aminoalkoholy představované sloučeninou obecného vzorec (II) vysoce selektivním způsobem a s vysokým výtěžkem.

Navíc k mikroorganizmům podle předkládaného vynálezu patří také baktérie produkující (1S,2S)-aminoalkoholy, které mezi opticky aktivními β-aminoalkoholovými sloučeninami tvoří selektivně (1S,2S)-formy a baktérie produkující (1R,2R)-aminoalkoholy, které mezi opticky aktivními β-aminoalkoholovými sloučeninami tvoří selektivně (1R,2R)-formy.

Působením baktérií produkujících (1S,2S)-aminoalkoholy mohou být připraveny např. následující sloučeniny:

d-*threo*-2-methylamino-1-fenylpropanol (d-pseudoefedrin),

d-*threo*-2-dimethylamino-1-fenylpropanol (d-methylpseudoefedrin),
(1S,2S)-α-(1-aminoethyl)-benzylalkohol (d-norpseudoefedrin),
(1S,2S)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanol,
(1S,2S)-α-(1-aminoethyl)-2,5-dymethoxybenzylalkohol,
(1S,2S)-1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol,
(1S,2S)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol,
(1S,2S)-1-fenyl-2-ethylamino-1-propanol,
(1S,2S)-1-fenyl-2-amino-1-butanol a
(1S,2S)-1-fenyl-2-methylamino-1-butanol.

Působením baktérií produkujících (1R,2R)-aminoalkoholy mohou být získány například následující sloučeniny:

1-*threo*-2-methylamino-1-fenylpropanol (1-pseudoefedrin),
1-threo-2-dimethylamino-1-fenylpropanol (1-methylpseudoefedrin),
(1R,2R)-α-(1-aminoethyl)-benzylalkohol (1-norpseudoefedrin),
(1R,2R)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanol,
(1R,2R)-α-(1-aminoethyl)-2,5-dimethoxybenzylalkohol,
(1R,2R)-1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol,
(1R,2R)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol,
(1R,2R)-1-fenyl-2-ethylamino-1-propanol,
(1R,2R)-1-fenyl-2-amino-1-butanol a
(1R,2R)-1-fenyl-2-methylamino-1-butanol.

Navíc takto získaný (1S,2S)-1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol může být snadno invertován na (1R,2S)-1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol (metaraminol).

Z mikroorganizmů podle předkládaného vynálezu ty mikroorganizmy, u kterých je uvedeno přístupové číslo IFO, jsou podrobně popsány v "Seznamu kultur", 10. Vydání (1966), publikovaného Ústavem pro fermentaci (Institute for Fermentation, IFO) (nezisková organizace) a jsou k dispozici od IFO. Mikroorganizmy, u kterých je uvedeno přístupové číslo IAM, byly popsány v "Katalogu kmenů, 1993" publikovaném

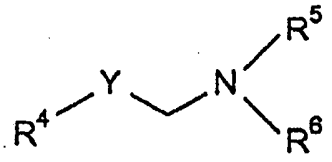
Ústavem molekulárních a buněčných věd Tokijské Univerzity (Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The Cell and Functional Polymer General Center, University of Tokyo) a jsou k dispozici od této instituce. Mikroorganizmus *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 je nový mikroorganizmus izolovaný z přírody a byl uložen v Národním ústavu biologických věd a medicínských technologií (National Institute of Bioscience and Human-Technology, National Institute of Advanced Science and Technology, METI 1-3, Higashi 1-Chome, Tsukuba, Ibaraki, 3058566 JAPAN) jako položka č. FERM BP-7451 (datum původního uložení 15. únor 2001).

Jako mikroorganizmy podle vynálezu mohou být použity jakékoliv kmeny divokého typu, mutantní kmeny a rekombinantní kmeny získané metodami buněčného inženýrství, jako je například buněčná fúze, nebo metodami genového inženýrství, jako je například genová manipulace, pokud je mikroorganizmus schopen působit na enantiomerní směs α-aminoketonové sloučeniny obecného vzorce (I) a tvořit tak odpovídající opticky aktivní β-aminoalkohol obecného vzorce (II).

Nejsou zde žádná specifická omezení pokud jde o odlišné podmínky v kultivaci mikroorganizmů, a lze užít běžné metody, kdy se baktérie, houby nebo kvasinky pěstují ve vhodném médiu. Normálně mohou být použita tekutá média obsahující zdroje uhlíku, zdroje dusíku a další živiny. Lze užít jakýkoliv vhodný zdroj, pokud ho daný mikrooroganizmus je schopen využít. Mohou být použity sacharidy jako je například glukóza, fruktóza, sacharóza, dextrin, škrob a sorbitol, alkoholy, jako je například methanol, ethanol a glycerol, organické kyseliny jako je například kyselina fumarová, kyselina citronová, kyselina octová a kyselina propionová, a jejich soli, uhlovodíky jako jsou parafíny, a také směsi výše uvedených

sloučenin. Jako zdroj dusíku může být použit jakýkoliv zdroj, pokud je mikroorganizmus schopen ho využít. Tak mohou být použity amonné soli anorganických kyselin, jako je například chlorid amonný, síran amonný a fosforečnan amonný, amonné soli organických kyselin, jako je například amoniumfumarát a amoniumcitrát, soli kyseliny dusičné jako dusičnan sodný a dusičnan draselný, dusík-obsahující anorganické nebo organické sloučeniny jako je například hovězí extrakt, kvasinkový extrakt, sladový extrakt a pepton, a také směsi výše uvedených sloučenin. Do médií, která se běžně užívají, se mohou přidat zdroje živin, jako jsou anorganické soli, soli vzácných kovů a vitamíny. Do média mohou být látky pro indukci aktivity, látky působící jako pufr pro udržování pH apod.

Látky pro indukci aktivity mikroorganizmu zahrnují induktory aktivity mající obecný vzorec (III):



(III)

kde

R^4 představuje nižší alkylovou skupinu,

R^5 a R^6 mohou být stejné nebo odlišné, a představují atom vodíku, nižší alkylovou skupinu nebo acylovou skupinu,

Y představuje skupinu C=O nebo CH-OH.

Nižší alkylová skupina a acylová skupina zahrnují skupiny, jak byly definovány již výše. Specificky k výhodným induktorům aktivity patří 1-amino-2-propanol, 1-amino-2-hydroxybutan, 1-acetylamino-2-propanol, 1-methylamino-2-propanol, 1-amino-2-oxopropan, 2-amino-3-hydroxybutan apod. Když- jsou v těchto sloučeninách přítomny asymetrické atomy

uhlíku, sloučeniny mohou být v opticky aktivních formách a racemátu, a lze je vhodně vybrat. Přidání induktoru aktivity do k média indukuje aktivitu mikroorganizmu a následnou tvorbu opticky aktivního β-aminoalkoholu s vyšší účinností při srovnání s případem, kdy není takový induktor přidán. Induktor aktivity může být použit jednotlivě nebo může být použita směs více induktorů. Hladina, ve které je žádoucí takové induktory aktivity přidávat je 0,01 až 10 % (hmot.) média.

Kultivace mikroorganizmů se provádí v podmínkách vhodných pro jejich růst. Specificky se mohou mikroorganizmy kultivovat při pH média 3 až 10, výhodně při pH 4 až 9, a při teplotě 0 až 54 °C, výhodně 20 až 40 °C. Mikroorganizmy se mohou kultivovat v aerobních nebo anaerobních podmínkách. Doba kultivace je výhodně z 10 až 150 hodin a měla by být vhodně stanovena individuálně pro každý mikroorganizmus.

Reakční metody při produkci β-aminoalkoholů podle předkládaného vynálezu nejsou konkrétně omezující, pokud jde v zásadě o způsob, kdy mikroorganizmus působí na enantiomerní směs aminoketonově sloučeniny obecného vzorce (I) nebo jejich směsi za vzniku odpovídající opticky aktivní β-aminoalkoholové sloučeniny obecného vzorce (II). Reakce se nastartuje tím, že se bakteriální buňky promyté pufrem nebo vodou vmíchají do vodného roztoku výchozí α-aminoketonové sloučeniny.

Reakční podmínky mohou být vybrány ze skupiny, kterou tvoří celý rozsah podmínek, kdy tvorba opticky aktivních β-aminoalkoholových sloučenin obecného vzorce (II) není narušena. Kvantita bakteriální buněk vzhledem k výchozímu aminoketonu je výhodně 1/100 až 1000x a výhodněji 1/10 až 100x množství racemického aminoketonu. Koncentrace racemického aminoketonu, který je substrátem, je výhodně 0,01 až 20 %, výhodněji z 0,1 až 10 %. A dále pH reakčního roztoku je

výhodně 5 až 9, výhodněji 6 až 8, reakční teplota je výhodně 10 až 50 °C, výhodněji 20 až 40 °C a doba reakce je výhodně 5 až 150 hodin a měla by být stanovena individuálně pro každý mikroorganizmus.

Aby reakce probíhala účinněji, mohou být přidány sacharidy (např. glukóza), organické kyseliny (např. octová kyselina) a zdroje energie (např. glycerol). Tyto látky mohou být použity samotné nebo může být použit směs více takových látek. Hladina přidaných látek je výhodně 1/100 až 10x množství substrátu. Mohou být také přidány koenzymy apod. Koenzymy jako je například nikotinamidadenindinukleotid (NAD), redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH), nikotinamid-adenindinukleotidfosfát (NADP) a redukovaný nikotinamid-adenindinukleotidfosfát (NAPH) mohou být použit samotné nebo jako směs několika z uvedených sloučenin. Hladina přidaných sloučenin je výhodně 1/1000 až 1/5 množství racemického aminoketonu. Kromě koenzymů mohou být přidány ještě enzymy regenerující koenzymy jako je například glukózodehydrogenáza, a sice výhodně v hladině 1/100 až 10x vzhledem k množství racemického aminoketonu. A dále může být použita kombinace látek jako jsou sacharidy (např. glukóza), organické kyseliny (např. octová kyselina), energetické sloučeniny (např. glycerol), koenzymy, enzymy regenerující koenzymy a substráty pro enzymy regenerující koenzymy. Tyto látky jsou přirozeně akumulovány v bakteriálních buňkách, ale jejich přidání může zvýšit rychlost reakce a výtěžek, takže kde je to shledáno jako nezbytné, vhodné látky jsou vybrány.

Když je přidána určitá sůl, a reakční roztok je jak byl popsán výše, a reakce se nechá probíhat v těchto podmínkách, racemizace nezreagovaného aminoketonového izomeru může být urychlena a jeho konverze na enantiomer, který slouží jako

substrát pro mikroorganizmus může probíhat mnohem účinněji. To umožňuje produkovat aminoalkohol podle vynálezu z výchozího materiálu s výtěžkem 50 % nebo více.

Soli pro urychlení racemizace nezreagovaných aminoketonů mohou být soli slabých kyselin jako je například acetát, tartrát, benzoát, citrát, malonát, fosforečnan, uhličitan, p-nitrofenolát, siřičitan a borát. Výhodně se užijí například fosforečnany (např. dihydrogenfosforečnan sodný, dihydrogenfosforečnan draselný a dihydrogenfosforečnan amonný), uhličitany (např. uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, uhličitan draselný a uhličitan amonný), citráty (např. citrát sodný, citrát draselný a citrát amonný). Mohou být užity také jejich směsi. Pufry s pH 6,0 až 8,0 jsou přidány do vzniku konečné koncentrace 0,01 až 1 mol/l (M). Například v případě fosfátu se výhodně smíchají dihydrogenfosforečnan sodný a monohydrogenfosforečnan sodný v poměru 9:1 až 5:95.

Opticky aktivní β-aminoalkoholy připravené způsobem podle vynálezu mohou být purifikovány obvyklými postupy separace/purifikace. Například přímo z reakčního roztoku nebo po oddělení bakteriálních buněk mohou být získány opticky aktivní β-aminoalkoholy obvyklými purifikačními metodami jako je například membránová separace nebo extrakce organickým rozpouštědlem (např. toluenem a chloroformem), chromatografie na koloně, koncentrace za sníženého tlaku, destilace, rekrystalizace a krystalizace.

Optická aktivita takto připraveného opticky aktivního β-aminoalkoholu se stanoví pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

Příklady provedení vynálezu

Předkládaný vynález je dále konkrétně popsán pomocí příkladů. Tyto příklady však nijak neomezují rozsah patentových nároků.

Přípravný příklad 1

Příprava dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu

51,6 ml brominu se po kapkách přidalo ke směsi 134 g 1-fenyl-1-propanonu, 42 g uhličitanu sodného a 200 ml vody a reakce byla ponechána probíhat v 70 ° C po dobu 3 hodin za vzniku reakční směsi. K reakční směs byla přidáno 350 ml 40% vodného roztoku monomethylaminu. Reakce se ponechala 1 hodinu ve 40 °C a reakční produkt byl extrahován do 1 litru chloroformu. Reakční produkt v chloroformové vrstvě pak byl extrahován 100 ml naředěné chlorovodíkové kyseliny, 3 g aktivního uhlí bylo přidáno k vodné vrstvě, a pak filtrováno. Filtrát byl koncentrován za vzniku 89 g hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu.

Příklad 1

Příprava d-(1S,2S)-pseudoefedrinu

Kmen *Microbacterium arborescens* IFO 3750 byl inokulován do 5 ml média obsahující 1% glukózu, 0,5% pepton 0,3% kvasinkový extrakt a pak kultivován za třepání při 30 °C po dobu 48 hodin. Po stočení a oddělení buněk od kultivačního média byly bakteriální buňky přeneseny do zkumavky. K nim byl přidán 1 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,0) a buňky v něm byly

resuspendovány. Pak bylo přidán 1 mg hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu a reakce byl ponechána probíhat za třepání ve 37 °C po dobu 24 hodin. Po reakci byl reakční roztok stočen, aby byly odstraněny bakteriální buňky a supernatant byl podroben HPLC, aby se získal opticky aktivní pseudoefedrin: kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 M fosfátový pufr (obsahující 7% acetonitril), pH 5,0, průtoková rychlost 0,8 ml/min, a detekce ve vlnové délce 220 nm.

Absolutní konfigurace a optická čistota byly určeny pomocí HPLC (kolona Sumichiral AGP od firmy Sumika Chemical Analyses Service, průměr 4 mm, délka 150 mm, 0,03 M fosfátový pufr, pH 7,0, průtoková rychlost 0,5 ml/minuta, a detekce při vlnové délce 220 nm). Takto byl selektivně získán pouze d-pseudoefedrin, jak je ukázáno v tabulce 1.

Vytvořené množství je vždy uvedeno jako množství konvertovaného hydrochloridu.

Příklady 2 až 12

Příprava d-(1S,2S)-pseudoefedrinu

S výjimkou toho, že v příkladech 2 až 12 byl místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 užit odlišný mikroorganizmus, jak je uvedeno v tabulce 1, opticky aktivní pseudoefedrin byl získán postupem jako v příkladu 1. Tudíž byl selektivně získán pouze d-pseudoefedrin, jak je vidět také v tabulce 1.

Tabulka 1 - Příklady 1 až 12

Č. Př.	Mikroorganizmus		Optická aktivita (%)				Vyrobené množství (mg/ml)
	rod	IFO	d-efedrin	l-efedrin	d-pseudoefedrin	l-pseudoefedrin	
1	*Microbacterium arborescens*	3750	0	0	100	0	0,16
2	*Klebsiella pneumoniae*	3319	0	0	100	0	0,3
3	*Aureobacterium esteraromaticum*	3751	0	0	100	0	0,14
4	*Xanthomonas sp.*	3084	0	0	100	0	0,049
5	*Pseudomonas putida*	14796	0	0	100	0	0,1
6	*Mycobacterium smegmatis*	IAM 12065	0	0	100	0	0,24
7	*Mycobacterium diernhoferi*	14797	0	0	100	0	0,25
8	*Mycobacterium vaccae*	14118	0	0	100	0	0,28
9	*Mortierella isabellina*	8308	0	0	100	0	0,15
10	*Cylindrocarpon sclerotigenum*	31855	0	0	100	0	0,09
11	*Sporidiobolus johnsonii*	6903	0	0	100	0	0,07
12	*Rhodococcus erythropolis*	MAK-34	0	0	100	0	0,3

Příklady 13 až 37

Produkce d-(1S,2S)pseudoefedrinu

S výjimkou toho, že v příkladech 13 až 37 byl místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 užit odlišný mikroorganizmus, jak je uvedeno v tabulce 2, opticky aktivní pseudoefedrin byl získán postupem jako v příkladu 1. Připravená množství a optická čistota pseudoefedrinu jsou ukázány v tabulce 2.

Tabulka 2

Č. Př.	Mikroorganizmus		Produkované množství (mg/ml)	Optická čistota (%) d-pseudoefedrinu
	rod	IFO		
13	*Nocardioides simplex*	12069	0,35	99
14	*Mycobacterium phlei*	13160	0,27	95,6
15	*Mucor ambiguus*	6742	0,07	93
16	*Mucor javanicus*	4570	0,04	95
17	*Mucor fragilis*	6449	0,17	90
18	*Absidia lichtheimi*	4009	0,04	93
19	*Aspergillus awamori*	4033	0,18	93
20	*Aspergillus niger*	4416	0,11	90
21	*Aspergillus oryzae*	4177	0,18	91
22	*Aspergillus candidus*	5468	0,07	94
23	*Aspergillus oryzae*	IAM 2630	0,08	92

Tabulka 2 -pokračování

24	*Aspergillus oryzae* var. *Oryzae*	6215	0,05	95
25	*Penicillium oxalicum*	5748	0,06	94
26	*Grifola frondosa*	30522	0,08	92
27	*Eurotium repens*	4884	0,08	92
28	*Ganoderma lucidum*	8346	0,05	92,2
29	*Hypocrea gelatinosa*	9165	0,27	92,2
30	*Helicostylum nigricans*	8091	0,27	93,2
31	*Aspergillus foetidus var. acidus*	4121	0,43	91,9
32	*Verticillium fungicola var. Fungicola*	6624	0,10	92,7
33	*Fusarium roseum*	7189	0,40	89,6
34	*Tritirachium oxyzae*	7544	0,34	92
35	*Armillariella mellea*	31616	0,28	91
36	*Sporobolomyces salmonicolor*	1038	0,14	95
37	*Sporobolomyces coralliformis*	1032	0,2	95

Příklad 38

Příprava d-(1S,2S)-pseudoefedrinu

Mikroorganismus *Morganella morganii* IFO 3848 byl inokulován do média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton a 0,3% kvasinkový extrakt a dále kultivován v protřepávané

aerobní kultuře při 30 °C po dobu 48 hodin. Po té bylo 5 ml kultivačního roztoku stočeno, aby byly získány bakteriální buňky, buňky pak byly usušeny na vzduchu a usušené bakteriální buňky byly resuspendovány v 1 ml 0,05 M Tris-HCl pufru (pH 7,5). K této suspenzi usušených bakteriálních buněk bylo přidáno 50 mg glukózy, 0,2 mg glukózodehydrogenázy, 0,6 mg NADP, 0,6 mg NAD a 10 mg hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu a inkubovalo se za třepání v 300 ot./min. (rpm) při 28 °C. Reakce se nechala probíhat 48 hodin, reakční roztok byl měřen, a množství produktu a optická aktivita pseudoefedrinu byly stanoveny pomocí HPLC podobně jako v příkladu 1. Ukázalo se, že byl selektivně získán pouze d-pseudoefedrin, jak je ukázáno v tabulce 3.

Tabulka 3

Č. Př.	Mikroorganizmus		Optická aktivita (%)				Vyrobené množství (mg/ml)
	rod	IFO	d-efedrin	l-efedrin	d-pseudoefedrin	l-pseudoefedrin	
38	*Morganella morganii*	3848	0	0	100	0	0,79

Příklad 39

Příprava hydrochloridu d-(1S,2S)-pseudoefedrinu

Mikroorganizmus *Mycobacterium smegmatis* IAM-12065 byl inokulován do média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton a 0,3% kvasinkový extrakt a dále kultivován v protřepávané aerobní kultuře při 30 °C po dobu 48 hodin. Po té byl 1 litr kultivačního roztoku stočen, aby byly získány bakteriální buňky, buňky pak byly resuspendovány v 50 ml vody a po přidání

0,5 g hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu se dále inkubovalo 48 hodin za třepání ve 150 ot./min. (rpm) při 30 °C. Reakce se nechala probíhat 100 hodin od zahájení třepání, což vedlo k produkci 7,0 g/l d-pseudoefedrinu v reakčním roztoku. Pak byl reakční roztok stočen, aby se odstranily bakteriální buňky, pH bylo nastaveno na 12 a vyšší přidáním hydroxidu sodného. 100 ml methylenchloridu bylo přidáno k reakčnímu roztoku a reakční produkt byl extrahován. Rozpouštědlo bylo odstraněno, byla přidána kyselina chlorovodíková, a následná koncentrace do sucha poskytla hydrochloridovou sůl. Hydrochlorid byl rozpuštěn přidáním ethanolu a dalším přidáním etheru byl krystalizován reakční produkt. Následně byl získán hydrochlorid d-pseudoefedrinu. Výtěžek 0,32 g krystalů d-pseudoefedrinu byl analyzován na HPLC (kolona Sumichiral AGP od firmy Sumika Chemical Analysis Service, průměr 4 mm, délka 150 mm, 0,03 M fosfátový pufr: pH 7,0, průtoková rychlost 0,5 ml/min, detekce při vlnové délce UV 220 nm) a byla zjištěna 100% optická aktivita.

Příklad 40

Příprava d-(1S,2S)-methylpseudoefedrinu

Mikroorganizmus *Mycobacterium smegmatis* RAM-12065 byl inokulován do média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton a 0,3% kvasinkový extrakt a dále kultivován v protřepávané aerobní kultuře při 30 °C po dobu 48 hodin. Po té byl 1 litr kultivačního roztoku filtrován, aby byly získány bakteriální buňky, buňky pak byly opláchnuty vodou a přidána voda pro vytvoření 50 ml suspenze. K suspenzi bylo přidáno 100 mg hydrochloridu 2-dimethylamino-1-fenyl-1-propanonu (2 g/l) a dále se inkubovala 48 hodin za třepání ve 150 ot./min. (rpm)

při 30 °C. Reakční roztok se analyzoval na HPLC (kolona Sumichiral AGP od firmy Sumika Chemical Analysis Service, průměr 4 mm, délka 150 mm, 0,03 M fosfátový pufr: pH 7,0, průtoková rychlost 0,5 ml/min, detekce při vlnové délce UV 220 nm) a bylo zjištěno, že bylo produkováno 0,23 g/l d-(1S,2S)methylpseudoefedrinu a jeho optická aktivita byla 77%.

Příklad 41

Příprava l-(1R,2R)-pseudoefedrinu

Mikroorganizmus *Amycolatopsis alba* TFO 15602 byl inokulován do média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton a 0,3% kvasinkový extrakt a dále kultivován v protřepávané aerobní kultuře při 30 °C po dobu 48 hodin. Po té bylo 5 ml kultivačního roztoku centrifugováno, aby byly získány bakteriální buňky. Buňky pak byly resuspendována v 1 ml 0,1 M fosfátu sodného (pH 7,0) a k suspenzi byl přidán 1 mg hydrochloridu dl-2-dimethylamino-1-fenyl-1-propanonu (2 g/l) a dále se inkubovala 48 hodin za třepání ve 150 ot./min. (rpm) při 30 °C. Reakční roztok se analyzoval na HPLC (kolona Sumichiral AGP od firmy Sumika Chemical Analysis Service, průměr 4 mm, délka 150 mm, 0,03 M fosfátový pufr: pH 7,0, průtoková rychlost 0,5 ml/min, detekce při vlnové délce UV 220 nm) a bylo zjištěno, že byl produkován selektivně l-pseudoefedrin. Výsledky jsou ukázány v tabulce 4.

Příklady 42 až 46

Příprava l-(1R,2R)-pseudoefedrinu

S výjimkou toho, že místo mikroorganizmu *Amycolatopsis alba* IFO 15602 byly použity mikroorganizmy uvedené v tabulce 4, byl opticky aktivní pseudoefedrin získán podobně jako v příkladu 41. Výsledky uvedené v tabulce 4 ukazují, že byl připraven selektivně pouze l-pseudoefedrin.

Tabulka 4

Č. Př.	Mikroorganizmus		Optická aktivita (%)				Vyrobené množství (mg/ml)
	rod	IFO	d-efedrin	l-efedrin	d-pseudoefedrin	l-pseudoefedrin	
41	*Amycolatopsis alba*	15602	0	0	100	0	0,33
42	*Amycolatopsis azurea*	14573	0	0	100	0	0,064
43	*Amycolatopsis coloradensis*	15804	0	0	100	0	0,5
44	*Amycolatopsis orientalis orientalis*	14500	0	0	100	0	0,18
45	*Amycolatopsis*	12360	0	0	100	0	0,5
46	*Serratia marcescens*	3736	0	0	100	0	0,47

Příklady 47 a 48

Příprava l-(1R,2R)-pseudoefedrinu

S výjimkou toho, že místo mikroorganizmu *Amycolatopsis*

alba IFO 15602 byly použity mikroorganizmy uvedené v tabulce 5, byl opticky aktivní pseudoefedrin získán podobně jako v příkladu 41. Výsledná množství a optická čistota l-pseudoefedrinu jsou ukázány v tabulce 5.

Tabulka 5

Č. Př.	Mikroorganizmus		Optická čistota (%)	Vyrobené množství (mg/ml)
	rod	IFO	l-pseudo-efedrin	
47	*Rhodococcus erythropolis*	12540	0	0,33
48	*Rhodococcus rhodochous*	15564	0	0,064

Příklad 49

Příprava l-(1R,2R)-pseudoefedrinu

Coprinus rhizophorus IFO 30197 byl inokulován do média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton a 0,3% kvasinkový extrakt a dále kultivován v protřepávané aerobní kultuře při 30 °C po dobu 48 hodin. Po té bylo 5 ml kultivačního roztoku stočeno, aby byly získány bakteriální buňky, buňky pak byly usušeny na vzduchu a usušené bakteriální buňky byly resuspendovány v 1 ml 0,05 M Tris-HCl pufru (pH 7,5). K této suspenzi usušených bakteriálních buněk bylo přidáno 50 mg glukózy, 0,2 mg glukózodehydrogenázy, 0,6 mg NADP, 0,6 mg NAD a 10 mg hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu. rEakce byla ponechána probíhat za třepání v 300 ot./min. (rpm) při 28 °C 48 hodin. Reakční roztok byl analyzován pomocí HPLC (kolona Sumichiral AGP od firmy Sumika Chemical Analysis Service, průměr 4 mm, délka 150 mm, 0,03 M fosfátový pufr: pH

7,0, průtoková rychlost 0,5 ml/min, detekce při vlnové délce UV 220 nm) a bylo stanoveno množství a optická aktivita produkovaného pseudoefedrinu. Ukázalo se, že byl selektivně získán pouze l-pseudoefedrin, jak je ukázáno v tabulce 6.

Tabulka 6

Č. Př.	Mikroorganizmus		Optická aktivita (%)				Vyrobené množství (mg/ml)
	rod	IFO	d-efedrin	l-efedrin	d-pseudoefedrin	l-pseudoefedrin	
49	*Coprinus rhizophorus*	30197	0	0	100	0	1,09

Příklad 50

Příprava (1S,2S)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-l-propanolu

Rhodococcus erythropolis MAK-34 byl kultivován za třepání v 5 ml média obsahujícího 1% sacharózu, 0,5% kukuřičný výluh, 0,1% dihydrogenfosforečnan draselný, 0,3% hydrogenfosforečnan draselný a 0,1% 1-amino-2-propanol ve 30 °C po dobu 48 hodin. Bakteriální buňky byly získány buďto centrifugací nebo filtrací. K nim bylo přidáno přiměřené množství vody, 0,2 ml 1M fosfátového pufru, pH 7,0, 10 mg glukózy a 1 mg racemického hydrochloridu 1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-l-propanonu, a vše promícháno. Jeden mililitr byl třepán pro reakci ve 30 °C po dobu 48 hodin. Reakční roztok byl buďto stočen nebo filtrován. Supernatant byl analyzován na HPLC (kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 fosfátový pufr (obsahující 7% acetonitril), pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm). Bylo potvrzeno, že byl produkován

hydrochlorid *threo*-1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanolu v množství 0,6 mg/ml. Pro stanovení optické čistoty produktu byl vzorek analyzován na HPLC (Sumichiral OA-4900 od firmy Sumika Chemical Analysis Service, použit eluent hexan:dichlorethan:methanol:trifluoroctová kyselina = 240:140:40:1, průtoková rychlost 1 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 254 nm). Tak bylo změřeno, že (1S,2S)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanol byl získán ve 100% optické čistotě.

Příklady 51 až 54

Příprava opticky aktivního 1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanolu

S výjimkou toho, že místo *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 byly užity mikroorganizmy a kultivační podmínky popsané v tabulce 7, byly reakce provedeny podobným způsobem jako v příkladu 50, a byl získán opticky aktivní 1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanol.

Kultivační podmínky uvedené v tabulkách 7 až 9 byly následující:

Kultivační podmínky 1: mikroorganizmus byl inokulován do 20 ml média obsahujícího 1% glukózu, 0,5% pepton, 0,3% kvasinkový extrakt (pH 7,0) a kultivace probíhala 48 hodin ve 30 °C za třepání při 150 ot./min. (rpm).

Kultivační podmínky 2: mikroorganizmus byl inokulován do 20 ml média s pH 6,0 obsahujícího 5% sladový extrakt a 0,3% kvasinkový extrakt a kultivace probíhala 48 hodin ve 30 °C za třepání při 150 ot./min. (rpm).

Tabulka 7

Č. Př.	Kmen	IFO	Kult. Podm.	Produk. množství	Stereochem. konfigurace produktu	Optická čistota (%)
51	*Helicostylum nigricans*	8091	1	0,06	1S 2S	90
52	*Amycolatopsis orientalis lurida*	14500	1	0,01	1R 2R	100
53	*Amycolatopsis orientalis orientalis*	12362	1	0,02	1R 2R	100
54	*Amycolatopsis orientalis orientalis*	12806	1	0,01	1R 2R	100

Příklad 55

Příprava (1S,2S)-2-ethylamino-1-fenyl-1-propanolu

Kmen *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 byl kultivován za třepání v 5 ml média obsahujícího 1% sacharózu, 0,5% kukuřičný výluh, 0,5% dihydrogenfosforečnan draselný, 0,3% hydrogenfosforečnan draselný a 0,1% 1-amino-2-propanol, po dobu 48 hodin ve 30 °C. Bakteriální buňky byly získány buďto centrifugací nebo filtrací. K nim bylo přidáno přiměřené množství vody, 0,2 ml 1M fosfátového pufru, pH 7,0, 10 mg glukózy a 1 mg racemického hydrochloridu 1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanonu, a vše promícháno. Jeden mililitr byl třepán pro reakci ve 30 °C po dobu 48 hodin. Reakční roztok byl buďto stočen nebo filtrován. Supernatant byl analyzován na HPLC (kolona μBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril, pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve

vlnové délce UV 220 nm). Bylo potvrzeno, že byl připraven hydrochlorid *threo*-2-ethylamino-1-fenyl-1-propanolu v množství 0,47 mg/ml. Pro stanovení optické čistoty produktu byl vzorek analyzován na HPLC (Kolona OD od firmy Daicel Chemical Industries Ltd., průměr 4,6 mm, délka 250 mm, použit eluent hexan:isopropanol:diethylamin = 90:10:0,1, průtoková rychlost 1 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 254 nm). Bylo zjištěno, že produkt je (1S,2S)-2-ethylamino-1-propanol (100% optická čistota).

Příklady 56 až 58

Příprava (1R,2R)-2-ethylamino-1-fenyl-1-propanolu

S výjimkou toho, že místo *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 byly užity mikroorganizmy a kultivační podmínky popsané v tabulce 8, byly reakce provedeny podobným způsobem jako v příkladu 55, a byl získán opticky aktivní (1R,2R)-2-ethylamino-1-fenyl-1-propanol. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 8.

Tabulka 8

Č. Př.	Kmen	IFO	Kult. Podm.	Produk. množství	Stereochem. konfigurace produktu	Optická čistota (%)
56	*Amycolatopsis alba*	15602	1	0,01	1R 2R	100
57	*Amycolatopsis orientalis orientalis*	12806	1	0,01	1R 2R	100
58	*Rhodotorula aurantiaca*	0951	2	0,01	1R 2R	100

Příklady 59 až 61

Příprava opticky aktivního 1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanolu

Mikroorganizmy uvedené v tabulce 9 byly kultivovány v 5 ml média ve 30 ° C po dobu 48 hodin (viz příslušné podmínky 1 nebo 2). Bakteriální buňky byly získány buďto centrifugací nebo filtrací. K nim bylo přidáno přiměřené množství vody, 0,2 ml 1M fosfátového pufru, pH 7,0, 10 mg glukózy a 1 mg racemického hydrochloridu 1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanonu, a vše bylo promícháno. Jeden mililitr byl třepán pro reakci ve 30 °C po dobu 48 hodin. Reakční roztok byl buďto stočen nebo filtrován. Supernatant byl analyzován na HPLC (kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05M fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril, pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm). Bylo potvzeno, že byl připraven hydrochlorid *threo*-1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanolu. Pro stanovení optické čistoty produktu byl vzorek analyzován na HPLC (Kolona Crownpak CR+ od firmy Daicel Chemical Industries Ltd., kyselina chloristá, pH 2,0, 1 ml/min, UV 254 nm). Bylo zjištěno, že produkt byl opticky aktivní 1-(m-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol se stereochemickou konfigurací uvedenou v tabulce 9.

Tabulka 9

Č. Př.	Kmen	IFO	Kult. Podm.	Produk. množství	Stereochem. konfigurace produktu	Optická čistota (%)
59	*Helicostylum nigricans*	8091	1	0,01	1S 2S	100
60	*Amycolatopsis alba*	15602	1	0,01	1R 2R	78
61	*Rhodotorula aurantiaca*	0951	2	0,01	1R 2R	100

Příklad 62

Příprava (1 R, 2R)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanolu

Kmen *Amycolatopsis alba* IFO-15602 byl pěstován v kultivačních podmínkách 1. Bakteriální buňky byly získány buďto centrifugací nebo filtrací. K nim bylo přidáno přiměřené množství vody, 0,2 ml 1M fosfátového pufru, pH 7,0, 10 mg glukózy a 1 mg racemického hydrochloridu 1-(p-hydroxyfenyl)-2-methylamino-1-propanonu, a vše promícháno. Jeden mililitr byl třepán pro reakci ve 30 °C po dobu 48 hodin. Reakční roztok byl buďto stočen nebo filtrován. Supernatant byl analyzován na HPLC (kolona μBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril, pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm). Bylo potvrzeno, že byl produkován hydrochlorid *threo*-1-(hydroxyfenyl)-2-amino-1-fenyl-1-propanolu v množství 0,03 mg/ml. Pro stanovení optické čistoty produktu byl vzorek analyzován na HPLC ((Kolona Crownpak CR+ od firmy Daicel Chemical Industries Ltd., kyselina chloristá, pH 2,0, 1

ml/min, UV 254 nm). Bylo potvrzeno, že produkt je (1 R, 2R)-1-(p-hydroxyfenyl)-2-amino-1-propanol (optická čistota: 82 %).

Příklad 63

Příprava (1S,2S)-1-fenyl-2-amino-1-butanolu

Kmen *Helicostylum nigricans* IFO-8091 byl pěstován v kultivačních podmínkách 1. Bakteriální buňky byly získány buďto centrifugací nebo filtrací. K nim bylo přidáno přiměřené množství vody, 0,2 ml 1M fosfátového pufru, pH 7,0, 10 mg glukózy a 1 mg racemického hydrochloridu 1-fenyl-2-amino-1-butanonu, a vše promícháno. Jeden mililitr byl třepán pro reakci ve 30 °C po dobu 48 hodin. Reakční roztok byl buďto stočen nebo filtrován. Supernatant byl analyzován na HPLC (kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril, pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm). Bylo potvrzeno, že byl připraven hydrochlorid *threo*-1-fenyl-2-amino-1-butanolu v množství 0,62 mg/ml. Pro stanovení optické čistoty produktu byl vzorek analyzován na HPLC (Kolona OD od firmy Daicel Chemical Industries Ltd., průměr 4,6 mm, délka 250 mm, použit eluent hexan:isopropanol:diethylamin = 90:10:0,1, průtoková rychlost 1 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 254 nm). Bylo potvrzeno, že produkt je (1S, 2S)-1-fenyl)-2-amino-1-butanol.

Příklad 64

Příprava (1R,2R)-1-fenyl-2-amino-1-butanolu

Mikroorganizmus *Amycolatopsis orientalis* IFO-12806 byl pěstován v kultivačních podmínkách 1. A podobně jako v příkladu 63 byl produkován (1R,2R)-1-fenyl-2-amino-1-butanol v množství 0,21 mg/ml.

Příklad 65

Účinek přidání induktoru (1)

1-amino-2-hydroxypropanon byl přidán k médiu 1 (viz tabulka 10) tak, aby bylo dosaženo koncentrace 5 g/l. Pět mililitrů pak bylo nalito do zkumavky, uzavřeno silikonovou zátkou a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut. Mikroorganizmy uvedené v tabulce 11 byly inokulovány do tohoto média a také do média bez přidaného induktoru, v daném pořadí, a pak byly pěstovány za třepání při 300 ot./min. (rpm) v 30 °C po dobu 48 hodin. 0,5 ml kultury bylo centrifugováno 20 minut při 10000 g. Z bakteriálních buněk získaných po odstranění supernatantu byla přidáním vody připravena uniformní suspenze. K ní bylo přidáno přiměřené množství vody, pufru a 10 mg hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu, do celkového objemu 1 ml. Jeden mililitr byl přelit do zkumavky a třepán pro reakci ve 30 °C při 150 ot./min. (rpm) po dobu 12 hodin. Po té byly buňky odstraněny centrifugací a supernatant byl analyzován na HPLC, přičemž bylo stanoveno i množství vytvořeného pseudoefedrinu (kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05M fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril,

pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm).

Jak ukazují výsledky shrnuté v tabulce 11, produkovaná množství pseudoefedrinu při použití induktoru při kultivaci byla výrazně vyšší než při kultivaci bez přídavku induktoru.

Tabulka 10

Složení média 1	Složení média 2	Složení média 3	Složení média 4
Sacharóza 1%	Glukóza 0,1%	Glukóza 0,1%	Rozpustný škrob 1%
Kukuřičný výluh 0,5%	Trypton 0,5%	Bactopepton 0,5%	Glukóza 0,5%
Dihydrogenfosforečnan draselný 0,1%	kvasinkový extrakt 0,5%	kvasinkový extrakt 0,3%	Nzamin typ A 0,3%
Hydrogenfosforečnan draselný 0,3%		pH 7,0	Trypton 0,5%
Kyselina p-aminobenzoová 0,01 %	Hydrogenfosforečnan draselný		kvasinkový extrakt 0,2%
pH 7,0	pH 7,0		Hydrogenfosforečnan draselný 0,1%
			Síran hořečnatý x $7H_2O$ 0,05%

Tabulka 11

Č. Př.	Mikroorganizmus	Číslo	Médium	Produkované množství (bez přídavku) (mg)	Produkované množství (přídavek induktoru) (mg)
1	*Rhodococcus erythropolis*	MAK-34	1	0,018	1,26
2	*Mycobacterium chlorophenolicum*	IFO-15527	3	0,032	0,77
3	*Mycobacterium smegmatis*	IFO-12065	3	0,048	0,21
4	*Nocardioides simplex*	IFO-12069	2	0	0,19
5	*Klebsiela pneumonie*	IFO-3319	2	0,018	0,066
6	*Absidia lichtheimi*	IFO-4409	4	0,0035	0,22
7	*Aspergillus awamori*	IFO-4033	4	0,00048	1,17
8	*Aspergillus candidus*	IFO-5468	4	0,0092	0,018
9	*Aspergillus candidus*	IFO-5337	4	0,031	1,26
10	*Hypocrea gelatinosa*	IFO-9165	4	0,0058	0,64
11	*Helicostylum nigricans*	IFO-8091	4	0,0067	0,52
12	*Tritirachium oryzea*	IFO-7544	4	0,0047	0,078
13	*Armilariealla mellea*	IFO-31616	4	0,0042	0,46

Příklad 66

Účinek přidání induktoru (2)

Kmen *Rhodococcus erythropolis* MAK-34 byl inokulován do 5 ml média (pH 7,0) obsahujícího 1,0% sacharózu, 0,5% kukuřičný výluh, 0,1% hydrogenfosforečnan draselný, 0,3% dihydrogenfosforečnan draselný a 0,01% p-aminobenzovou kyselinu a vždy jeden z induktorů, a byl kultivován za třepání po dobu 48 hodin ve 30 °C. Bakteriální buňky byly získány centrifugací a ve zkumavce byly resuspendovány po přidání 1 ml 0,2 M fosfátového pufru. K suspenzi bylo přidáno 10 mg hydrochloridu dl-2-methylamino-1-fenyl-1-propanonu a 20 mg glukózy a reakce byla ponechána probíhat za třepání ve 30 °C po dobu 16 hodin. Po reakci byl reakční roztok stočen, aby se odstranily buňky, a supernatant byl podroben HPLC (kolona µBondapakphenyl od firmy Waters Inc., průměr 4 mm, délka 300 mm, eluent - 0,05 fosfátový pufr obsahující 7% acetonitril, pH 6,5, průtoková rychlost 0,8 ml/min, detekce ve vlnové délce UV 220 nm), čímž byl získán opticky aktivní pseudoefedrin. Jak ukazují výsledky shrnuté v tabulce 12, produkce byla významně vyšší, když byl přidán induktor.

Tabulka 12

Sloučenina	Produkované množství (mg)
1-acetylamino-2-propanol	3,00
1-methylamino-2-propanol	2,83
1-amino-2-oxopropanon	1,97
2-amino-3-hydroxybutan	0,05
1-amino-2-hydroxybutan	0,65
Bez přidání	0,02

Srovnávací příklad 1

S výjimkou toho, že místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 byl užit mikroorganizmus *Brettanomyces anomalus* IFO 0642, reakce produkující pseudoefedrin byla provedena podobně jako v příkladu 1. Avšak nebyl získán žádný redukovaný produkt.

Srovnávací příklad 2

S výjimkou toho, že místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 byl užit mikroorganizmus *Candida guilliermondii* IFO 0566, reakce produkující pseudoefedrin byla provedena podobně jako v příkladu 1. Avšak nebyl získán žádný redukovaný produkt.

Srovnávací příklad 3

S výjimkou toho, že místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 byl užit mikroorganizmus *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0358, reakce produkující pseudoefedrin byla provedena podobně jako v příkladu 1. Avšak nebyl získán žádný redukovaný produkt.

Srovnávací příklad 4

S výjimkou toho, že místo *Microbacterium arborescens* IFO 3750 byl užit mikroorganizmus *Bacillus subtilis* IFO 3037, reakce produkující pseudoefedrin byla provedena podobně jako v příkladu 1. Avšak nebyl získán žádný redukovaný produkt.

Průmyslová využitelnost

Jak bylo popsáno výše, způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle předkládaného vynálezu umožňuje, aby β-aminoalkohol mající požadovaný optickou aktivitu byl získán z enantiomerní směsi α-aminoketonových sloučenin nebo jejich solí s vysokým výtěžkem a také vysoce selektivním způsobem, a to jednoduchým postupem, přičemž je účinně zabráněno vytváření diastereomerních vedlejších produktů.

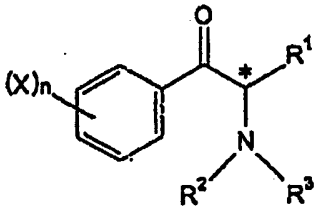
Tudíž předkládaný vynález umožňuje kromě jiného výrobu pseudoefedrinů, které mají požadovanou optickou aktivitu s vysokým výtěžkem a vysoce selektivním způsobem, a je tudíž užitečný pro výrobu léčiv a jejich meziproduktů.

PV 2002-3202
29.10.02

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus*, rodu *Amycolatopsis*, rodu *Coprinus*, rodu *Serratia*, rodu *Rhodococcus* a rodu *Rhodotorula*,

ponechá působit na enantiomerní směs α-aminoketonu nebo jeho soli obecného vzorce (I):



(I)

kde

skupiny X jsou stejné nebo odlišné, přičemž X představuje alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom halogenu, nižší alkylová skupina, hydroxylová skupina volitelně chráněná chránící skupinou, nitroskupina a sulfonylová skupina,

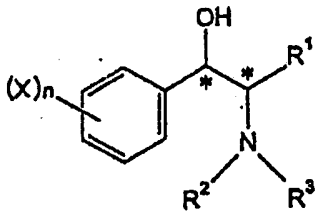
n představuje celé číslo 0 až 3,

R^1 představuje nižší alkylovou skupinu,

R^2 a R^3 jsou shodné nebo odlišné, a představují alespoň jeden člen vybraný ze skupiny, kterou tvoří atom vodíku a nižší alkylová skupina, a

"*" označuje asymetrický atom uhlíku,

čímž se připraví opticky aktivní β-aminoalkoholová sloučenina s požadovanou optickou aktivitou mající obecný vzorec (II):



(II)

kde X, n, R^1, R^2, R^3 a "*" mají význam definovaný výše.

2. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle nároku 1 vyznačující se tím, že mikroorganizmus je alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy patřící k druhu *Morganella morganii*, *Microbacterium arborescens*, *Sphingobacterium multivorum*, *Nocardioides simplex*, *Mucor ambiguus*, *Mucor javanicus*, *Mucor fragilis*, *Absidia lichtheimi*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus oryzae* var. *oryzae*, *Aspergillus foetidus* var. *acidus*, *Penicillium oxalicum*, *Grifola frondosa*, *Eurotium repens*, *Ganoderma lucidum*, *Hypocrea gelatinosa*, *Helicostylum nigricans*, *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Fusarium roseum*, *Tritirachium oxyzae*, *Mortierella isabellina*,

Armillariella mellea, Cylindrocarpon sclerotigenum, Klebsiella pneumoniae, Aureobacterium esteraromaticum, Xanthomonas sp., Pseudomonas putida, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium diernhoferi, Mycobacterium vaccae, Mycobacterium phlei, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium chlorphenolicum, Sporobolomyces salmonicolor, Sporobolomyces coralliformis, Sporidiobolus johnsonii, Amycolatopsis alba, Amycolatopsis azurea, Amycolatopsis coloradensis, Amycolatopsis orientalis lurida, Amycolatopsis orientalis orientalis, Coprinus rhizophorus, Serratia marcescens, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous a Rhodotorula aurantiaca.

3. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganizmus je alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy rodu *Morganella*, rodu *Microbacterium*, rodu *Sphingobacterium*, rodu *Nocardioides*, rodu *Mucor*, rodu *Absidia*, rodu *Aspergillus*, rodu *Penicillium*, rodu *Grifola*, rodu *Eurotium*, rodu *Ganoderma*, rodu *Hypocrea*, rodu *Helicostylum*, rodu *Verticillium*, rodu *Fusarium*, rodu *Tritirachium*, rodu *Mortierella*, rodu *Armillariella*, rodu *Cylindrocarpon*, rodu *Klebsiella*, rodu *Aureobacterium*, rodu *Xanthomonas*, rodu *Pseudomonas*, rodu *Mycobacterium*, rodu *Sporobolomyces*, rodu *Sporidiobolus* a rodu *Rhodococcus*, a že β-aminoalkohol obecného vzorce (II) je (1S,2S)-aminoalkohol.

4. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganizmus je alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy patřící k druhu *Morganella morganii*, *Micrōbacterium arborescens*, *Sphingobacterium multivorum*,

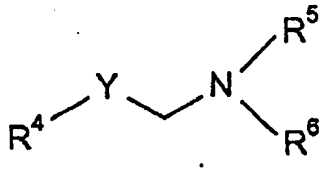
Nocardioides simplex, Mucor ambiguus, Mucor javanicus, Mucor fragilis, Absidia lichtheimi, Aspergillus awamori, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus candidus, Aspergillus oryzae var. *oryzae, Aspergillus foetidus* var. *acidus, Penicillium oxalicum, Grifola frondosa, Eurotium repens, Ganoderma lucidum, Hypocrea gelatinosa, Helicostylum nigricans, Verticillium fungicola* var. *fungicola, Fusarium roseum, Tritirachium oxyzae, Mortierella isabellina, Armillariella mellea, Cylindrocarpon sclerotigenum, Klebsiella pneumoniae, Aureobacterium esteraromaticum, Xanthomonas sp., Pseudomonas putida, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium diernhoferi, Mycobacterium vaccae, Mycobacterium phlei, Mycobacterium fortuitum, Mycobacterium chlorophenolicum, Sporobolomyces salmonicolor, Sporobolomyces coralliformis, Sporidiobolus johnsonii, Rhodococcus erythropolis* a *Rhodococcus rhodochrous.*

5. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganizmus je alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy rodu *Amycolatopsis*, rodu *Coprinus*, rodu *Serratia*, rodu *Rhodocooccus* a rodu *Rhodotorula*, a opticky aktivní β-aminoalkohol obecného vzorce (II) je (1R,2R)-aminoalkohol.

6. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že mikroorganizmus je alespoň jeden z mikroorganismů vybraný ze skupiny obsahující mikroorganizmy patřící k druhu *Amycolatopsis alba, Amycolatopsis azurea, Amycolatopsis coloradensis, Amycōlatopsis orientalis lurida, Amycolatopsis orientalis*

orientalis, Coprinus rhizophorus, Serratia marcescens, Rhodococcus erythropolis, Rhodococcus rhodochrous a Rhodotorula aurantiaca.

7. Způsob výroby opticky aktivního β-aminoalkoholu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 vyznačující se tím, že mikroorganizmus se kultivuje v médiu, do kterého byl přidán induktor aktivity obecného vzorce (III):



(III)

kde

R^4 představuje nižší alkylovou skupinu,

R5 a R6 jsou shodné nebo odlišné, a představují atom vodíku, nižší alkylovou skupinu nebo acylovou skupinu, a

Y představuje skupinu C=0 nebo skupinu CH-OH.