

(19) Országkód:

HU



MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201352 B

(51) Int. Cl.⁵

C 12 P 13/02
C 12 P 13/04
C 12 P 17/02
C 12 P 41/00

(22) Bejelentés napja: 1987.07.27. (21) 3428/87

(30) Bejelentés elsőbbsége:
(8618324) 1986.07.28. GB

(40) Közzététel napja: 1988.03.28.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1990.10.28.

(72) Feltalálók:

PHILLIPS Gareth Thomas,
Sittingbourne, Kent, (GB)
BERTOLA Mauro Attilio,
MARX Arthur Friedrich, Delft,
KÖGER Hein Simon, Spaarndam, (NL)

(73) Szabadalmas:

Gist-Brocades N.V., Delft, és
Shell Internationale Research
Maatschappij B.V., Hága, (NL)

**(54) ELJÁRÁS 4-(2,3-EPOXI-PROPOXI)-FENIL-
-ECETSAV ÉS 4-[2-HIDROXI-3-(IZOPROPIL-
-AMINO)-PROPOXI]-FENIL-ECETSAV ÉSZTEREI,
VALAMINT 4-[2-HIDROXI-3-(IZOPROPIL-
-AMINO)-PROPOXI]-FENIL-ACETAMID
SZTEREOSPECIFIKUS ELŐÁLLÍTÁSÁRA**

(57) KIVONAT

A találmány S-(-)-atenolol {4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-acetamid} előállítási eljárására vonatkozik. Az eljárás során 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észterből *Pseudomonas oleovorans* mikroorganizmussal olyan, megfelelő 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észtert állítanak elő, amely főleg S-konfigurációjú.

A kapott epoxi-propoxi-vegyület a nagyarányú S-konfiguráció megtartásával atenolollá alakítható át az epoxi propoxi-vegyület izopropil-aminnal való reagáltatásával és az észtercsoport ammóniával való amidálással.

A leírás terjedelme: 7 oldal, rajz nélkül

HU 201352 B

Találmányunk sztereospecifikus atenolol {4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-acetamid} és gyógyászati lag elfogadott sói, pl. savaddíciós sói, valamint 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észterek és 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-észterek előállítási eljárására vonatkozik.

Számos, biológiailag aktív vegyületet állítanak elő sztereoizomerelegy formában. Ezek az elegyek gyakran használatosak különböző agrokémiai és gyógyászati területeken. Általában csak egyetlen sztereoizomer igazán hatásos, és mivel az elegy többnyire két vagy több sztereoizomerből áll, az elegy hatása kisebb. A fő ok, amiért a sztereoizomer elegyeket továbbra is alkalmazzák az, hogy a sztereoizomerek szétválasztási költsége meghaladja az aktivitás lehetséges növekedéséből származó előnyöket. Azonban napjaink gyógyszerészei számára egyre nyilvánvalóbbá válik, hogy a sztereoizomer elegyek alkalmazása nemcsak gyógyhatással nem rendelkező, szennyező anyagok együttes alkalmazását jelenti, hanem ezeknek az anyagoknak egyéb, nemkívánatos, biológiai, pl. mérgező hatása is van.

A későbbi példákban bemutatjuk az egyetlen sztereoizomert tartalmazó hatóanyag biológiai hatását.

A gyógyászat területén alkalmazott legtöbb béta-adrenerg-blokkoló sztereoizomerek elegye; a biológiai hatás azonban egyetlen sztereoizomernak tulajdonítható. Ennek egyik példája a labetalol néven ismert, kombinált alfa-adrenerg- és béta-adrenerg-blokkoló hatású gyógyszer, amelyben a négy sztereoizomer párból csak két izomer pár bizonyult hatásosnak.

N. Toda és munkatársai ismertetik a J. Pharmacol. Exp. Ther. 207. (1978) 311 cikkben, hogy a (-)-metoprolol (270-300)-szor hatásosabb a nyúl szív- és légcsőizom izoproterenollal (béta-adrenerg-receptor stimúlálószer) szembeni reakciójának gyengítésére. A J. Pharm. and Exp. Ther. 250, 759-763 (1989) sz. (S)-atenolol sztereoszelektív központi vérnyomáscsökkentő hatásáról számol be.

Az egyedi béta-blokkoló hatású sztereoizomerek előállítása jelenleg általában vegyi újraoldó eljárásokkal történik vagy sztereoizomer elővegyületekből meglehetősen hosszú, kémiai szintézissel. Ilyen eljárást ismertetnek pl. a 4 408 063 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban és L.M. Weinstok és munkatársai: J. Org. Chem. 41, (1976) 3121 közleményben. Ezek az eljárások nem teszik lehetővé az atenolol S enantiomerjének (optikailag aktív sztereoizomer) gazdaságos előállítását ipari méretekben.

A találmány célkitűzése az atenolol bizonyos sztereoizomerje ipari méretű gyártásának gazdaságos megvalósítása.

A mikroorganizmusoknak azt a képességét, hogy sztereospecifikus szempontból rövidláncú (2-4 szénatomos) alkéneket a megfelelő epoxi-alkánvegyületekké alakítanak át gáz-folyadék vagy folyadék-folyadék fázisú bioreaktorban, J. Tramper és munkatársai ismertetik a 3rd European Congress of Biotechnology, München, 10-14. September 1984 kiadványban. Az epoxi-alkánok mikrobiológiai előállításának másik példáját a 4 106 986 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban ismertetik, a leírt eljárásban 2-20 szénatomos egyenesláncú 1-alkén szénhidrogének 1,2-epoxi-alkán-vegyületekké való konverzióját valósították meg. A 0099 609 számú európai nyilvánosságra hozott szabadalmi bejelentésben a propén és 1-oktén megfelelő epoxi-alkán-vegyületekké való konverzióját ismertetik. Azonban a szubsztituált alkének, pl. a 4-allil-oxifenil-acetátok nem állíthatók elő ezekkel az ismert, de csak egyenes vagy csak ritkán, elágazó láncú alkének konverziójához alkalmazható eljárásokkal.

Az 0166 527 számú európai nyilvánosságra hozott szabadalmi bejelentésben epoxid-vegyületek, elsősorban 2,3-epoxi-propil-éter-vegyületek megfelelő allil-éterekből mikroorganizmusok segítségével megvalósított előállítási eljárását ismertetik. Ebben a leírásban azonban csak nyolc fenil-allil-éter előállítását mutatják be, és ezek közül csak három alkalmas béta-adrenerg blokkolószer kiindulási anyagaként.

Ezen túlmenően ezeknek az epoxi-vegyületeknek az optikai tisztasága kicsi, az epoxidtól és az alkalmazott mikroorganizmuskól függően 71-79% között változik. Emiatt a kapott terméket két enantiomerre kell szétválasztani.

Találmányunk olyan sztereo-szelektív epoxidáló eljárásra vonatkozik, amelyben 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észtereket sztereo-szelektív epoxidáló hatású mikroorganizmusokkal főleg S konfigurációjú 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észterekké alakítunk át.

A „főleg S konfigurációjú” kifejezésen azt értjük, hogy gyakorlatilag a keletkezett epoxi-propoxi-vegyület több, mint 50 t%-ban S konfigurációjú; a találmányunk szerinti eljárással készített termék legalább 70 t%, előnyösen legalább 80 t% és gyakorlatilag legalább 90 t% S konfigurációjú terméket tartalmaz.

A főleg S konfigurációjú epoxi-propoxi-vegyületet ezután a szakterületen ismert eljárások valamelyikével atenollá alakítjuk úgy, hogy a propoxi oldalláncban a kívánt S konfiguráció megmaradjon. Bár elvileg bármilyen 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észter felhasználható a találmányunk szerinti eljárásban, a gyakorlati megfontolások miatt ez az észter kis szénatomszámú, legfeljebb 6 szénatomos, általában legfeljebb 4 szénatomos alkilészter, előnyös a metil- vagy etil-észter. Az epoxi-

-propoxi-fenil-ecetsav-észter ezután izopropil-aminnal reagáltatható, és így a megfelelő 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-észtert kapjuk, amelyet ezután ammóniával reagáltatva amidálunk, és így az S-konfigurációjú atenololt kapjuk. Az így kapott atenololt azután, kívánt esetben, átalakíthatjuk gyógyászatiilag megfelelő sókká a szakirodalomban ismert eljárások szerint valamilyen, megfelelő sav segítségével.

Az eljárás kivitelezése előnyösen úgy történik, hogy olyan, megfelelő mikroorganizmust alkalmazunk, amely hatására az atenolol legalább 70%-ban, előnyösen legalább 80%-ban, még előnyösebben legalább 90%-ban S konfigurációjú lesz.

A „sztereoszелеktiv epoxidáló hatású mikroorganizmus” kifejezés baktériumokat, élesztő- és egyéb gombákat jelent. Megfelelően alkalmazható baktériumok a *Pseudomonas* oleovorans mikroorganizmusok.

Azok a mikroorganizmusok amelyek új, genetikai anyagok beépítésével nyerik sztereoszелеktiv epoxidáló képességüket, úgy állíthatók elő, hogy olyan klónozott gént, amely képes polipeptid, pl. enzim sztereoszелеktiv epoxidáló hatású kódolására, áttesszünk egy megfelelő mikroorganizmusból egy másikba, elsősorban *Escherichia coli*-ba. Egyéb törzsekhez tartozó mikroorganizmusokat is alkalmazhatunk, ezek képviselői, pl. a *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Escherichia* és a *Corynebacterium* baktériumok. A klónozott gének kiválasztása aszerint történhet, hogy képesek legyenek a 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észterek sztereo-epoxidáló átalakítását végző enzim kódolására.

A klónozott gének kiválasztása történhet egy, már kiválasztott génnel való kereszt-hibridizálással is úgy, hogy egy enzimet sztereo-szelektiv epoxidáló hatásúra kódolunk.

A mikroorganizmusokat előnyösen pl. valamilyen polimer gélen lekötjük. Ez történhet élő sejtekkel, elhalt sejtekkel és/vagy nyugvó sejtekkel, vagy megfelelő, ezekből származó enzimekkel. Az enzimeket bizonyos mértékig tisztíthatjuk is, abban az esetben, ha specifikus, nagyobb aktivitás szükséges.

Ennek megfelelően a „mikroorganizmusok vagy az ebből származó anyagok” kifejezés élő, elhalt vagy nyugvó mikroorganizmusokra vagy extraktumaikra, adott esetben koncentrált és/vagy tisztított formákra vonatkozik. Például adott esetben mesterséges vagy természetes kofaktorokkal kombinált enzimek is alkalmazhatók. A 4-allil-oxi-fenil-ecetsav-észterek epoxidálására olyan sejtek is alkalmazhatók, amelyeknek nincs fermentáló hatásuk. Azt tapasztaltuk, hogy megfelelő körülmények között, élő vagy elhalt sejtekből származó enzimek hatására a kívánt S-izomer képződik. A mikroorganizmusok vagy a belőlük

származó anyagok többször alkalmazhatók, és általában legalább két hétig hatásosak. A mikroorganizmusok még koszubsztrátum (pl. glükóz) nélkül is aktívak maradhatnak. A 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észter S-izomer dúsítása megfelelő puffer, valamint fiziológiai sóoldatban megy végbe. Azt tapasztaltuk, hogy a provokált sejtek tárolás után is közvetlenül képesek az S-izomerben dús termék képezésére.

A 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észterek epoxidálására alkalmasak a *Pseudomonas* oleovorans fajták (egy ehhez a fajtához tartozó törzset az ATCC-nél letétbe helyeztek a 29 347 letéti számon 1976. június 21-én) vagy ezek változatai vagy mutánsai.

A találmányunk szerinti eljárás gyakorlati alkalmazásánál olyan, az előzőekben említett 0,5-10 napig tenyésztendő mikroorganizmust választunk, amely képes 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észterekből kiindulva 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észterek képzésére úgy, hogy a kapott termékben az S-konfigurációjú vegyület legalább 70%, előnyösen legalább 80%, még előnyösebben legalább 90% legyen. Az alkalmazandó sejteket szuszpendálhatjuk folyékony tápközegben, és a 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észtert az így készített sejtek hatásának tesszük ki. A másik megoldás, hogy elpusztított sejteket pl. lizáló közegben szuszpendálunk, és a 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észtert a sejtekből származó anyagok hatásának tesszük ki.

Az 0,5-10 napon keresztül tenyésztett sejteket a folyékony tápközegben vagy a lizáló közegben való szuszpendálás előtt elválaszthatjuk a tenyészetből. A 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észter sztereoszелеktiv epoxidálására alkalmas mikroorganizmusok szaporodásához alkalmazhatunk olyan, szokásosan alkalmazott tenyészközeget, amely valamilyen, asszimilálható szénforrást, pl. glükózt, glicerint, tejcukrot, szénhidrogéneket, így hexánt, stb. valamilyen nitrogénforrást, pl. ammónium-szulfátot, ammónium-nitrátot, ammónium-kloridot és valamilyen szervetlen tápforrást, pl. nyomnyi mennyiségű foszfátot, magnéziumot, káliumot, cinket, vasat és egyéb fémeket tartalmaz. Előnyösen alkalmazható olyan PSX közeg, amely adott esetben egyéb adalékanyagot is tartalmaz. Adott esetben valamilyen indukálószer, pl. dietoxi-metán is adható a tenyészközeghez. A mikroorganizmusok szaporodásához előnyösen 0-45 °C hőmérséklet és 3,5-9 pH szükséges. A mikroorganizmusok szaporodása előnyösen 20-37 °C-on és 5-7 pH érték mellett történik.

A mikroorganizmusok szaporodásához levegőztetés szükséges. Bármely olyan, bevált eljárás megfelel, amelyben a mikroorganizmusok anyagcseréjéhez elegendő oxigén áll rendelkezésre. A legmegfelelőbb oxigénforrás a levegő. A 4-allil-oxi-fenil-ecetsav-észter 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észterre történő konverziójához a mikroorganizmuso-

kat hozzáadhatjuk az előzőekben ismertetett tenyészközegben, szaporodási állapotban. A mikroorganizmusokat kiegészíthetjük valamilyen koszubsztrátummal is.

A 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észter 4-(2,3-epoxi-propil)-fenil-ecetsav-észterre való konverziója közben a mikroorganizmusok lehetnek szaporodási fázisban vagy a minimális tenyészközeg alkalmazásával lényegében nem szaporodó fázisban. Minimális tenyészközegként olyan, szokásos tenyészközeget alkalmazhatunk, amely szükség esetén valamilyen asszimilálható szénforrást, pl. glükózt, etanolt, hexánhoz (Cs) hasonló szénhidrogéneket, valamilyen nitrogénforrást, pl. ammónium-szulfátot, ammónium-nitrátot és ammónium-kloridot, valamint valamilyen szervetlen tápanyagforrást, pl. nyomnyi mennyiségű foszfátot, magnéziumot, káliumot, cinket, vasat és egyéb fémeket tartalmaz. A mikroorganizmusokat tarthatjuk nem szaporodó állapotban is, pl. az asszimilálható szénforrás vagy a nitrogénforrás kiiktatásával. Előnyösen alkalmazható az adott esetben egy vagy több adalékanyaggal dúsított PSX közeg. Az ilyen fázisban lévő mikroorganizmusok alkalmazása esetén előnyösen 0-45 °C hőmérsékletet és 3,5-9 pH értéket tartunk. A mikroorganizmusokat előnyösen 30-45 °C-on és 5-8 pH értéken tartjuk. Az ilyen fázisú mikroorganizmusok alkalmazása esetén olyan levegőztetés szükséges, amely lehetővé teszi az előzőekben ismertetett eljárásnak megfelelően, hogy elegendő oxigén álljon rendelkezésre mind a mikroorganizmusok anyagcseréjéhez, mind a 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észter 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észterre való konverziójához.

Az előzőekben ismertetett mikroorganizmusokkal előállított 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észter bármely, jól bevált eljárással kinyerhető és tisztítható.

A találmány szerinti eljárással előállított R(-)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észter, S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észter vagy ezek elegyei a megfelelő R-(+)-atenolollá, S-(+)-atenolollá vagy ezek elegyivé alakíthatók át az ezt követő, izopropil-amminnal és ammóniával megvalósított kémiai reakcióban. Az S-(+)-atenolol előállításának egyik példáját ismertetik a 2 453 324 számú nyilvánosságra hozott német szövetségi köztársasági szabadalmi bejelentésben. Ebben az eljárásban az abszolút S-konfigurációjú vegyületet a kémiai úton előállított abszolút S-konfigurációjú aril-glicidil-éterekből állítják elő izopropil-amminnal.

Az S- vagy R-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilészter S- vagy R-atenolollá való kémiai konverziója ammónium-hidroxid oldattal vagy vízmentes ammóniával történhet. Az ammónium-hidroxid oldat alkalmazása az S-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilészterből kiinduló S-atenolol előállításánál kis

termékhozamot eredményez, és az észter hidrolízise következtében nagy mennyiségű, szabad sav keletkezik, azonban vízmentes ammónia alkalmazásával a kívánt termék jó kihozattal nyerhető ki. A keletkezett atenolol kívánt esetben gyógyászatilag elfogadható, pl. savaddíciós sóvá alakítható.

Ennek megfelelően a találmány szerinti eljárással az (S)-atenolol terméket úgy állítjuk elő, hogy az (S)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilészter ammóniával reagáltatjuk, majd az atenololt kinyerjük és/vagy gyógyászatilag elfogadható sóvá alakítjuk.

Gyógyászati termékekhez előnyösen az olyan elegyek alkalmazhatók, amelyek főleg S-(+)-atenololt tartalmaznak. Előnyösen azok a vegyületek alkalmazhatók, amelyek legalább 80%, még előnyösebben azok, amelyek legalább 90% S-konfigurációjú vegyületet tartalmaznak.

4-(Allil-oxi)-fenil-ecetsav-észter Pseudomonas oleovorans mikroorganizmusokkal megvalósított epoxidálásával 25 mg/g/h termelékenység érhető el egy 3 órás termelési ciklus alatt, és a termékkoncentráció 1,3 g/l. Növelhető a termelékenység, ha szubsztátumként 4-allil-oxi-fenil-ecetsav-észter és ko-szubsztátumként glükózt alkalmazunk, az így elérhető termelékenység 94 mg/h/h értékig, a termékkoncentráció 4,1 értékig felmehet egy 3 órás ciklus alatt. A kapott termék a kísérleti hibahatáron belül enantiomerikusan tiszta.

Az optikai tisztaságot - ezt a kifejezést a leírásunkban a későbbiekben alkalmazzuk - az enantiomer többlet százalékos értékében fejezzük ki a következő képlettel:

$$S - R$$

$$S + R$$

A következő példákat találmányunk részletesebb ismertetésére mutatjuk be, anélkül, hogy az igénypontok terjedelmét korlátoznánk.

1. példa

4-(Allil-oxi)-fenil-ecetsav-metilészter átalakítása 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészterre Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 alkalmazásával

Előtenyésztett Pseudomonas oleovorans ATCC 29347 kultúrával oltottunk be olyan, 7,0 pH-jú PSX közeget, amely 0,75% glicerint és 0,05% dietoxi-metánt tartalmazott. A PSX közeg összetétele: 8,92 g/l koncentrációjú KH_2PO_4 oldat, 2,94 g/l koncentrációjú Na_2HPO_4 oldat, 1,0 g/l koncentrációjú $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oldat, 0,2 g/l koncentrációjú $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oldat, 0,2 g/l koncentrációjú KCl oldat, 0,294 g/l koncentrációjú Na-citrát oldat, 0,005 g/l koncentrációjú $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ol-

dat, 0,2 g/l koncentrációjú $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oldat és 10 ml/l koncentrációjú PS II nyomelem oldat. [A PS II nyomelem oldat összetétele: 0,25 g/l koncentrációjú $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,05 g/l koncentrációjú $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,03 g/l koncentrációjú $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,015 g/l koncentrációjú $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,015 g/l koncentrációjú $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,005 g/l koncentrációjú H_3BO_3 oldat, 0,0055 g/l koncentrációjú $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oldat, 0,01 g/l koncentrációjú KJ oldat és HCl pH=3 beállításához].

A 15 liter tenyészetet 30 °C-on 24 órán át szaporítottuk. A sejteket kinyertük, és újraszuszpendáltuk 1,5 liter 0,5% glükózt tartalmazó PSX közegben. Ebből 100-100 ml mennyiséget inkubáltunk 2,5% mennyiségű 4-allil-oxi-fenil-ecetsav-metilészterrel 6 órán át. Ezekből 1 ml-es mintákat extraháltunk meghatározott intervallumonként metilén-kloriddal, és gázkromatográfiás analízissel (glc) meghatároztuk az S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészter tartalmát.

Gázkromatográfiás elemzés

Az elemzést Varian 3700 típusú készülékkel, (Varian Instrument Group, Walnut Creek Division) 3%-os OV1-t tartalmazó, WHP 100-120 (50 cm x 2 mm) oszlopon (Chrompack, Middelburg, Hollandia) végeztük.

Az analízis körülményei: N_2 : 30 °C/perc; lángionizációs detektor: 280 °C; injektor: 200 °C. Program: 120-190 °C; 10 °C/perc.

A 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-metilészter retenciósideje 1,5 perc, a 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészter retenciósideje 3,1 perc volt.

A kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-metilészter átalakítása S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészterre *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 alkalmazásával

Biomassza g/l	S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)- -fenil-ecetsav-metilészter mg/g/h (g/l)			
	t = 1h	t = 3h	t = 4h	t = 6h
16,3	48 (0,8)	78 (3,8)	71 (4,6)	58 (5,6)
14,6	77 (1,1)	94 (4,1)	72 (4,2)	49 (4,3)
15,5	53 (0,8)	69 (3,2)	68 (4,2)	55 (5,1)

2. példa

4-(Allil-oxi)-fenil-ecetsav-metilészter átalakítása S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészterre *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 alkalmazásával, majd az így kapott vegyület ezt követő átalakítása S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilészterre

15 liter, ásványi sókat tartalmazó, pH=7 értékű, 0,75% glicerint és 0,05% dietoximetánt tartalmazó PSX közeget oltottunk be előszaporított *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 folyadék kultúrával, és inkubáltuk 24 órán át 30 °C-on orbitalis rázóberendezésben. A sejteket centrifugálással kinyertük, és 1,5 liter 7,5 pH-ju PSX közegben újraszuszpendáltuk. Ebből 100-100 ml mennyiséget tettünk 2,0 l-es rázólabikba, és inkubáltuk 0,5% glükózzal és 2,5% 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-metilészterrel 6 órán át 37 °C-on. 6 óra után a sejteket 2,5 l diklórmetánnal extraháltuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítottuk, és az oldószert elpárologtattuk, és így 42,7 g tömegű, 26% 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilésztert kaptunk.

A nyers izolátumot 550 g szilikagélén 4:6 arányú éter és hexán eleggyel eluálva tisztítottuk, és így 11,04 g S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilésztert kaptunk. $[\alpha]_D^{25} = +8,27^\circ$ (c=1,39, EtOH). A mérést Optical Activity Ltd. AA 100 polariméterrel végeztük. PMR spektruma (CDCl₃): $\delta = 2,72/2,90$ (2d, 2H, $-\text{CH}(\text{CH}_2)-$), 3,32 (m, 1H, $-\text{CH}(\text{CH}_2)-$), 3,95/4,18 (2d, 2H, OCH₂), 6,88/7,2 (2d, 4H, aromás), 3,57 (5, 2H, CH₂CO), 3,68 (s, 3H, OCH₃).

Eu (hfc)₃ PMR nem jelzi a jelek szétválását 2,72/2,90-nél, ami csak egy enantiomer jelenlétét jelzi. E.I. tömegspektrum m/z 222. A PMR analízist Brucker WM készülékkel végeztük.

55 S-(-)-4-[2-Hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilészter szintézise

100 ml vízmentes metanolban oldott 6,0 g (27 mól) S-(+)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-metilészterhez hozzáadtunk 37 ml (405 mmól) izopropil-amint. A reakcióelegyet ezután kevertük 24 órán át 22 °C-on. A feleslegben lévő reagenst és az oldószert bepárlással eltávolítottuk, és az olajos maradékot feloldottuk 100 ml diklórmetánban. A

kapott oldatot mostuk 2x75 ml 0,2 N sósavval, a savas fázisokat egyesítettük, és mostuk 2x50 ml diklór-metánnal, és 2N nátrium-hidroxid oldattal meglúgosítottuk. A csapadékot 5x100 ml diklór-metánnal extraháltuk, és vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk, majd az oldószert bepárlással eltávolítottuk, és így 8,73 g félszilárd terméket kaptunk. Ezt a terméket etil-acetát és hexán elegyből átkristályosítottuk, és így 6,08 g tömegű, fehér, kristályos, 87,5-89,5 °C olvadáspontú (nem pontosított) S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilésztert kaptunk. $[\alpha]_D^{25} = -4,8$ (c=1,01, EtOH). PMR spektruma (CDCl₃): δ =1,08 [d, 6H, CH(CH₃)₂], 2,82 [m, 1H, CH(CH₃)₂], 2,7/2,88 (m, 2H, CH₂NH), 3,98 (m, 1H, CHOH), 3,94 (m, 2H, OCH₂), 6,88/7,2 (2d, 4H, Ar), 3,55 (s, 2H, CH₂CO), 3,68 (s, 3H, OCH₃). E.I. tömegspektrum m/z 282 (m+1).

Az enantiomerek tisztaságának meghatározása 4-[2-Hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilészter 2-oxazolidon származékának szintézise

[lásd: J. Hermansson, J. chromatography p. 379, 325 (1985) cikket.]

1,0 mg (±) vagy (-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilésztert tettünk 1 ml-es kémcsőbe, és feloldottunk 0,5 ml vízmentes dietil-éterben. Hozzáadtunk 0,05 ml 0,5 N nátrium-hidroxid oldatot, és az elegyet kevertük szobahőmérsékleten 1 percig. Majd 0,05 ml 120 mg/ml koncentrációjú, toluolban oldott foszgent adtunk hozzá, és az elegyet kevertük szobahőmérsékleten még egy órán át. A fázisokat hagyjuk szétválni, az éteres fázist eltávolítottuk, és a vizes fázist mostuk 3x0,5 ml vízmentes dietil-éterrel. Az éteres fázisokat egyesítettük, az oldószert bepárlással elpárologtattuk száraz nitrogén atmoszférában. A kapott maradékot 2 ml 5:95 arányú kloroform és hexán elegyben feloldottuk, majd nagynyomású folyadék kromatográfiás vizsgálatnak vetettük alá.

Az S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilészter optikai tisztaságát úgy határoztuk meg, hogy átalakítottuk oxazolidon származékká, és ezt Gilson-rendszerű, nagynyomású folyadék kromatográfiával (spektrofotometrikus detektálás) elemeztük Spherisorb S5 királis kolonnán (UMIST töltet, szilikagélén kovalensen kötött N-formil-L-izoleucin, 0,25 m x 4,5 mm, fázis szétválasztás), mozgó fázisként 0,75:15:84,25 térfogatarányú propán-2-ol, diklór-metán és hexán elegyet használtunk. A komponens detektálása 229 nm-nél történt.

Az S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilészter elemzési eredményei azt mutatják, hogy a vegyület a kísérleti hibahatáron belül tiszta volt (retenciós ideje 12,6 perc, az R-izomer retenciós ideje 11,9 perc).

S-(-)-4-[2-Hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-acetamid (atenolol) szintézise

500 mg (1,8 mmól) S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilésztert feloldottunk 5 ml metanolban. Ehhez hozzáadtunk 1,0 ml 35%-os ammónium-hidroxid oldatot, és hagytuk lejátszódni a reakciót 22 °C-on 8 napig. A feleslegben lévő reagenseket és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítottuk, majd a maradékot 10 ml diklór-metánban oldottuk. Az oldatot mostuk 2x10 ml 1%-os nátrium-hidrogén-karbonát oldattal a sav eltávolítására, a bázikus mosó folyadékokat egyesítettük, és mostuk 3x10 ml diklór-metánnal. A szerves fázisokat egyesítettük, vízmentes nátrium-szulfáton szárítottuk, és az oldatot bepároltuk, így 0,27 g amidot és kiindulási anyagot tartalmazó, nyers terméket kaptunk. A nyers terméket 15 g semleges alumínium-oxidon tisztítottuk, eluálószerként diklór-metán és metanol elegyet használtunk. A 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxil]-fenil-ecetsav-metilésztert és az atenololt elválasztottuk, és Lichrosorb RP8 (0,25 m x 4,5 mm, Hichrom) tölteten analizáltuk, mozgó fázisként 3,7 pH-jú 2% ammónium-acetátot tartalmazó metanolt használtunk, az elemzést Gilson rendszerű nagynyomású folyadék kromatográfián (spektrofotometriás detektálás) végeztük. A retenciós idő 6,5 perc illetve 3,2 perc volt. Azokat a frakciókat, amelyek S-(-)-atenololt tartalmaztak (a nagynyomású folyadék kromatográfiás vizsgálat szerint), egyesítettük, és az oldószert elpárologtattuk, az így kapott maradékból etil-acetát és hexán elegyből való átkristályosítás után 50 mg (0,19 mmól) 149,5-151 °C olvadáspontú (nem korrigált) S-(-)-atenolol terméket kaptunk. $[\alpha]_D^{25} = -2,82^\circ$ (c=0,332, etanol). PMR spektrum: (CDCl₃) δ = 1,08 [d, 6H, CH(CH₃)₂], 2,82 [m, 1H, CH(CH₃)₂], 2,7/2,88 (m, 1H, CH₂NH), 3,98 (m, 1H, CHOH), 3,98 (m, 2H, OCH₂), 6,92/7,2 (2d, 4H, Ar), 3,52 (s, 2H₂, CH₂CO), 5,38 (s, 2H, CONH₂). E.I. tömegspektrum m/z 267 (m+1).

Az enantiomerek tisztaságának meghatározása Atenolol diasztereomer származék képzése (R,R)-0,0-dibenzoil-bórkósav-anhidriddel

2,5 ml (±) vagy (-)-atenololt tettünk egy 1 ml-es kémcsőbe. 6 ml diklór-etánban 61 mg triklór-ecetsavat tartalmazó oldatból 0,3 ml-t adtunk az elegyhez, és kevertük 5 percig szobahőmérsékleten. Hozzáadtunk 7 mg dibenzoil-bórkósav-anhidridet, és az elegyet kevertük 50 °C-on 3 órán át. Kivetítettünk 0,2 ml reakcióelegyet, az oldószert elpárologtattuk, a maradékot a nagynyomású folyadék kromatográfiás elemzés előtt feloldottuk 1,0 ml metanolban.

Az elemzést Gilson rendszerű nagynyomású folyadék kromatográfián spektrofotomet-

riás detektálással végeztük Spherisorb RP 18/0,25 m x 4,9 mm) tölteten, mozgó fázisként 2% ammónium-acetátot tartalmazó, 3,7 pH-jú metanolt (35/65 tf/tf) használtunk. A vegyületeket 254 nm-nél detektáltuk.

Az (R,R)-0,0-dibenzoil-bórkósav-anhidriddel képzett származék kromatográfiás elemzése azt mutatta, hogy a vegyület optikai tisztasága 100%-os volt. A racém atenolol-vegyületet ugyanilyen módon elemezve, a vegyület két egyenlő részből álló, 4,4 illetve 6,7 perc retenció idejű, diasztereomerre válik szét, az R- illetve S-enantiomereknek megfelelően.

3. példa

S-(-)-4-[2-Hidroxi-3-(izopropil-amino)-propil-oxi]-fenil-acetamid (S-atenolol) szintézis

1,83 g S-(-)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-metilésztert és 8 ml 11 N vízmentes ammóniát tartalmazó metanolt kevertünk össze üvegcsőben, lezártuk, és mágneses keverővel kevertük, eközben száraz jég és aceton keverékben hűtöttük. Ezután az elegyet 50 °C-os olajfürdőbe helyeztük, és 3 napon át kevertük.

A csövet ezután száraz jég és aceton keverékben hűtöttük, kinyitottuk, és az illó anyagokat elpárologtattuk, így 1,74 g sárga, szilárd anyagot kaptunk. Ezt 80 ml forró etil-acetátból átkristályosítottuk, és így 1,38 g tömegű, 150-151,5 °C olvadáspontú S-(-)-atenololt kaptunk; $[\alpha]_D^{25} = -5,2$ (c=1; etanol).

Az optikai tisztaságot a 2. példában ismertetett eljárással határoztuk meg, az (R,R)-0,0-dibenzoil-bórkósav-anhidriddel képzett diasztereomer-származék elemzése 100% tisztaságot mutatott.

A racém atenololt ugyanilyen módon meghatározva, a vegyület két, egyenlő részből álló diasztereomer párra válik szét.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás 4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észter, 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-észter és 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-acetamid (atenolol) és savaddíciós sói sztereospecifikus előállítására, azzal jellemezve, hogy valamely 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-észtert *Pseudomonas oleovorans* mikroorganizmussal sztereoszelektíven epoxidálunk, és a kapott sztereospecifikus (S)-4-(2,3-epoxi-propoxi)-fenil-ecetsav-észtert elkülönítjük és/vagy izopropil-aminnal reagáltatjuk, majd a kapott sztereospecifikus (S)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-ecetsav-észtert elkülönítjük és/vagy ammóniával reagáltatjuk, majd kívánt esetben a kapott sztereospecifikus (S)-4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-acetamidot savaddíciós sójává alakítjuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Pseudomonas oleovorans* ATCC 29347 törzsszel vagy valamilyen mutánsával vagy változatával epoxidálunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy 4-(allil-oxi)-fenil-ecetsav-metil- vagy -etil-észterből indulunk ki.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás legalább 90 t%-ban (S)-konfigurációjú 4-[2-hidroxi-3-(izopropil-amino)-propoxi]-fenil-acetamid előállítására, azzal jellemezve, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat reagáltatjuk.

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest -
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
R 4966 - KJK

91.3462.66-13-2 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Szabó Viktor vezérigazgató